



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE METZ

1993

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention "Toxicologie de l'Environnement"

soutenue le 16 Juillet 1993

**PERFORMANCES DES TESTS D'AMES ET
MICRONOYAUX TRITON, APPLIQUES A L'ETUDE
DE LA GENOTOXICITE D'EFFLUENTS
COMPLEXES ET DES INTERACTIONS
ENTRE POLLUANTS**

Fabrice GODET

MEMBRES DU JURY

Professeur **P. VASSEUR** - Université de Metz - Directeur de thèse.

Professeur **D. BURNEL** - Faculté de Médecine de Nancy - rapporteur.

Professeur **J.M. J** ouen - rapporteur.

Docteur **M. BAB**

Docteur **Y. COU** de Paris.

Docteur **J.F. FER**

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ



022 420446 6

0 78538 .

UNIVERSITE DE METZ

1993

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention "Toxicologie de l'Environnement"

soutenue le 16 Juillet 1993

PERFORMANCES DES TESTS D'AMES ET MICRONOYAUX TRITON, APPLIQUES A L'ETUDE DE LA GENOTOXICITE D'EFFLUENTS COMPLEXES ET DES INTERACTIONS ENTRE POLLUANTS

Fabrice GODET

MEMBRES DU JURY

Professeur **P. VASSEUR** - Université de Metz - Directeur de thèse.

Professeur **D. BURNEL** - Faculté de Médecine de Nancy - rapporteur.

Professeur **J.M. JOUANY** - Laboratoire de Toxicologie de Rouen - rapporteur.

Docteur **M. BABUT** - Agence de l'Eau RHIN-MEUSE.

Docteur **Y. COURTOIS** - Laboratoire d'Hygiène de la Ville de Paris.

Docteur **J.F. FERARD** - Université de Metz.

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19930325
Cote	S/M ₃ 93/11
Loc	Magasin

A mes parents

A Corinne

Quels mots choisir au terme de ces quatre années pour exprimer ma reconnaissance à Paule VASSEUR de m'avoir fait confiance, et guidé tout au long de ce travail ? Comment la remercier pour ses encouragements dans les moments difficiles et pour avoir haussé le ton lorsque cela s'avérait nécessaire ? Comment la remercier... les mots me manquent...

J'espère que ces quelques années de recherche sous sa direction m'auront permis d'acquérir ne serait-ce qu'une parcelle de sa rigueur scientifique.

J'adresse mes sincères remerciement à Jean-François FERARD qui a su me faire profiter de son expérience. Je le remercie également d'avoir accepté d'être rapporteur de ce mémoire.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur Daniel BURNEL pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et la réalisation des dosages de métaux par torche à plasma d'argon.

Mes remerciement s'adressent également au Comité Inter Agence dont le support financier a permis la réalisation de cette étude et plus particulièrement à Monsieur Marc BABUT de l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse pour avoir suivi l'évolution de ce travail et accepté participer à mon jury de thèse.

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Yves COURTOIS d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je voudrais exprimer mon amitié à Anne-Marie VEBER et à Claudine RAST dont l'aide et les conseils et m'ont été précieux.

Un grand merci à Marie-Cécile et Carole pour l'aide qu'elles continuent à m'apporter dans la poursuite de cette étude.

Merci à Maryline et Nathalie pour leur patience et leur participation à l'élaboration de ce mémoire.

Enfin, je ne saurais oublier tous mes amis du laboratoire, Halima, Véronique, Lucie, Ali, Jean-Christophe, Benoit, Jairo... (que celles et ceux que j'ai pu oublier me pardonnent) pour les bons moments que nous avons passés ensemble mais aussi pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de ce travail.

SOMMAIRE

	PAGES
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	
ESSAIS DE GENOTOXICITE <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> APPLICABLES A L'ENVIRONNEMENT HYDRIQUE.	
I-1 INTRODUCTION	3
I-2 METHODES DE CONCENTRATION DES ECHANTILLONS.	
I-3 MILIEUX ENVIRONNEMENTAUX HYDRIQUES ETUDIES.	5
I-3.1 Eaux naturelles et eaux d'alimentations	
I-3.2 Les rejets industriels	7
I-3.3 Sédiments et boues de station d'épuration	8
I-4 COMPARAISON DES PERFORMANCES DES ESSAIS <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i> VIS A VIS DE MUTAGENES CONNUS.	9
I-5 DISCUSSION	10
I-6 CONCLUSION	13
CHAPITRE II :	
EVALUTION DE LA GENOTOXICITE D'EFFLUENTS COMPLEXES A L'AIDE DU TEST D'AMES ET DU TEST MICRONOYAUX SUR LARVES DE TRITON	
II-1 INTRODUCTION	14
II-2 MATERIEL ET METHODES	
II-2.1 Les effluents étudiés	
II-2.2 Préparation de l'extrait organique et du lyophilisat	
II-2.3 Dosage des métaux	15
II-2.4 Le test d'Ames	
II-2.4.1 Principe du test	
II-2.4.2 Protocole	16
II-2.4.3 Interprétation des résultats	17
II-2.4.4 Concentrations en effluent testées	

II-2.5 Le test micronoyau sur larves de triton	17
II-2.5.1 Principe du test	
II-2.5.2 Elevage des larves	18
II-2.5.3 Protocoles expérimentaux (standard et simplifié)	
II-2.5.4 Traitement statistique des résultats	19
II-2.5.5 Concentrations en effluent testés	20
II-3 RESULTATS	
II-3.1 Résultats du test d'Ames	21
II-3.1.2 Les effluents bruts	
II-3.1.3 Extraits organiques et lyophilisats	
II-3.2 Résultats des tests tritons	22
II-3.2.1 Essais réalisés avec le protocole standard	
II-3.2.2 Essais réalisés avec le protocole simplifié	
II-4 DISCUSSION	23
II-5 CONCLUSION	24

CHAPITRE III :

IMPLICATION DES METAUX CHROME, FER ET ZINC DANS LA GENOTOXICITE DES EFFLUENTS BI, BII ENTREE ET BIII : ETUDE D'INTERACTION.

III-1 INTRODUCTION	27
III-2 BIBLIOGRAPHIE SUR LA GENOTOXICITE DES METAUX CHROME, FER ET ZINC.	
III-2.1 Le chrome	27
III-2.1.1 Génotoxicité du chrome	
III-2.1.2 Processus de réduction de CrVI en CrIII	29
III-2.2 Le fer	30
III-2.2.1 Fer et viabilité cellulaire	
III-2.2.2 Incorporation cellulaire du fer	
III-2.2.3 Génotoxicité et carcinogénicité liées au fer	31
III-2.2.4 Fer, stress oxydant et génotoxicité	32
III-2.3 Le zinc	34
III-2.4 Conclusion	35

III-3 ESSAIS MIS EN OEUVRE.	
III-3.1 Essais réalisés avec le test d'Ames	35
III-3.1.1 Concentrations des métaux testés	
III-3.1.2 Préparation des solutions de métaux	
III-3.1.3 Modalités des plans d'interaction étudiés	36
III-3.1.4 Réalisation des essais d'interaction I et II	
III-3.2 Essais réalisés sur larves de pleurodèle	37
III-3.2.1 Etude de l'effet d'un mélange d'hydrocarbures aromatiques	
III-3.2.2 Etude de l'effet des métaux CrIII, CrVI, FeIII et ZnII	38
III-3.2.3 Etude de l'effet d'un mélange polymétallique Chrome/Fer/Zinc	
III-3.2.3.1 Concentrations des métaux testés dans chaque plan d'interaction	39
III-3.2.3.1 Modalités des plans d'interaction étudiés	
III-4 RESULTATS	40
III-4.1 Résultats des tests d'Ames	
III-4.2 Résultats des essais micronoyaux sur larves de pleurodèle	41
III-4.2.1 Effets du mélange d'hydrocarbures aromatiques	
III-4.2.2 Effets des métaux CrIII, CrVI, FeIII, et Zn testés en concentrations croissantes	
III-4.2.3 Résultats des essais d'interaction	43
III-4.2.3.1 Interaction CrVI/FeIII/ZnII	
III-4.2.3.2 Interaction CrIII/FeIII/ZnII	
III-5 DISCUSSION	44
III-5.1 Sources de variations des résultats des essais triton	
III-5.1.1 Sensibilité des larves de pleurodèle	
III-5.1.2 Variabilité liée à la lecture des frottis	45
III-5.2 Les essais d'interaction	47
III-6 CONCLUSION	49

CHAPITRE IV :

ETUDE PRELIMINAIRE DU MECANISME D'ACTION GENOTOXIQUE DU FER III ET DU CHROME VI CHEZ LES LARVE DE TRITON

IV-1 INTRODUCTION	50
IV-2 ESSAIS MIS EN OEUVRE	
IV-2.1 Essai avec FeIII, EDTA et NEM	51
IV-2.2 Essai avec FeIII, EDTA et cyanure	
IV-2.3 Essai avec FeIII, CrVI et vitamine C	
IV-2.4 Essais avec FeIII, CrVI et cyanure	52
IV-3 RESULTATS	53
IV-3.1 Effet d'un traitement des larves par le NEM sur la génotoxicité du fer III	
IV-3.2 Effet d'un traitement des larves par le cyanure sur la génotoxicité du fer III	
IV-3.3 Effet d'un traitement larves à la vitamine C sur la génotoxicité du fer III associé ou non au chrome VI	54
IV-3.4 Effet d'un traitement des larves par le cyanure sur la génotoxicité du fer III associé ou non au chrome VI.	55
IV-4 DISCUSSION	
IV-5 CONCLISION	59
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	60
REFERENCES BILBLOGRAPHIQUES	

FASCICULE 2

TABLEAUX, FIGURES ET ANNEXES

	Pages
TABLEAUX ET FIGURES	
CHAPITRE I : Tableaux 1 à 8	1 à 15
CHAPITRE II : Tableaux 9 à 13. Figures 1 à 16.	16 à 28
CHAPITRE III : Tableaux 14 à 30. Figures 17 à 28.	29 à 46
CHAPITRE IV : Tableaux 31 à 36.	47 à 50
 ANNEXES	
Annexe I : Résultats des tests d'Ames sur effluents bruts, extraits organiques et lyophilysats	
Annexe II : Résultats des essais triton réalisés sur les effluents	
Annexe III : Résultats des test d'Ames réalisés dans le cadre de l'étude d'interaction sur les métaux.	
Annexe IV : Résultats des essais triton réalisés dans le cadre de l'étude d'interaction sur les métaux.	
Annexe V : Résultats bruts des trois numération réalisées pour tous les lots de l'essai 7b FeIII/CrIII/ZnII.	
Annexe VI : Résultats bruts des essais triton réalisés dans le cadre de l'étude préliminaire sur le mécanisme d'action génotoxique du fer et du chrome.	

INTRODUCTION

Le contrôle de la toxicité des micropolluants hydriques se limite encore dans notre pays à la seule évaluation de la toxicité aiguë à l'aide du test daphnie 24 heures et du test Microtox sur bactéries. L'impact à moyen et long terme des polluants hydriques n'est pas encore étudié en routine, même s'il est question dans un avenir proche d'intégrer les essais sur la reproduction des daphnies, et plus tard les tests algues, dans la batterie d'essais pour le contrôle environnemental. Ces essais sont nécessaires certes, mais insuffisants pour appréhender les risques génotoxiques ; des micropolluants peuvent être cancérogènes sans pour autant induire une réponse avec les essais classiques évaluant la mortalité à court terme ou des effets sur la reproduction ou la photosynthèse. Le rejet dans notre environnement d'effluents non contrôlés et considérés à tort inoffensifs, n'est certainement pas sans conséquences pour les écosystèmes et pour l'homme.

Le but de notre travail a été de contribuer à définir une stratégie d'évaluation de la génotoxicité des effluents industriels.

Dans un premier temps nous avons réalisé une revue bibliographique des essais de génotoxicité applicables aux échantillons de l'environnement hydrique. Les avantages et les inconvénients des essais répertoriés ont été évalués.

Nous avons sélectionné deux essais pour notre étude expérimentale : un essai *in vitro*, le test d'Ames et un essai *in vivo*, le test micronoyau sur larves de pleurodèle communément appelé test triton.

Dans un deuxième temps nous avons comparé les capacités de ces deux essais à détecter la génotoxicité d'effluents industriels. Les effluents testés provenaient de l'industrie chimique, de l'industrie du papier et de la métallurgie. Parallèlement nous avons entrepris d'améliorer le protocole du test micronoyau sur triton.

Enfin, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux effluents issus de la métallurgie pour lesquels nous avons entrepris d'identifier les composés responsables de leur pouvoir génotoxique et d'étudier le mécanisme d'action de ces micropolluants.

CHAPITRE I
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

ESSAIS DE GENOTOXICITE *IN VITRO* ET *IN VIVO*
APPLICABLES
A L'ENVIRONNEMENT HYDRIQUE

Ce chapitre est accepté pour publication dans la Revue des Sciences de l'Eau.

ABREVIATIONS

Composés chimiques

B(a)P = benzo(a)pyrène ; Bases Ar. = bases aromatiques ; MMC = mitomycine C ; CP = cyclophosphamide ; DMN = diméthylnitrosamine ; EMS = éthylméthanesulfonate ; HAP = hydrocarbures aromatiques polycycliques ; HC-al = hydrocarbures aliphatiques ; HM = hydrazide maléique ; MMS = méthylméthanesulfonate ; MNNG = N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine ; N-CAP = composés aromatiques polycycliques azotés ; OH-HAP = hydrocarbures aromatiques polycycliques hydroxylés ; S-CAP = composés aromatiques polycycliques soufrés ; Ox = composés oxygénés ; PCB = polychlorobiphényles ; PCP = pentachlorophénol ; TCHF = trichlorohydroxyfuranone.

Essais

AC = aberrations chromosomiques ; HGPRT = hypoxanthine guanine phosphoribosyl transférase ; MN = micronoyau ; RO = résistance à l'ouabaïne ; SCE = échanges de chromatides soeurs ; SOS = SOS chromotest ; TC = transformation cellulaire ; UDS = synthèse non programmée de l'ADN ("unscheduled DNA synthesis")

Types cellulaires

BF2 = lignée cellulaire établie de perche soleil ; CHO = cellules ovariennes d'hamster chinois ; Hpr = hépatocytes primaires de rats ; Lh = lymphocytes humains ; RTG2 = lignée cellulaire de gonades de truite arc-en-ciel.

Autres abréviations

Anaph. ab. = anaphases aberrantes ; chrom = chromosome ; FC = facteur de concentration ; lyoph = lyophilisat ; métaph. ab. = métaphases aberrantes ; rés = résistant(e)s ; rev = révertants ; S9 = S9 mix, fraction métabolique microsomale de foie de rats ; souter. = souterraine.

I-1 INTRODUCTION

Depuis quelques années il s'est développé au sein de la communauté scientifique une réelle prise de conscience du risque génotoxique lié au rejet dans l'environnement de molécules chimiques au caractère mutagène et cancérigène. Cela s'est traduit par le développement d'études de génotoxicité des milieux environnementaux situés dans des zones "à risques" ou contaminées par des rejets d'origine industrielle ou agricole. Ces études ont permis de mettre en évidence et d'évaluer un risque génotoxique, et de déterminer les méthodes et les essais à mettre en oeuvre pour le quantifier.

Les essais utilisés dans un premier temps ont été ceux développés pour l'évaluation du potentiel génotoxique des substances chimiques : ces essais *in vitro*, sensibles et relativement faciles à mettre en oeuvre, ont d'abord été appliqués à une fraction concentrée des micropolluants, obtenue par extraction organique des échantillons hydriques incriminés. La recherche de conditions d'essai plus représentatives de la réalité environnementale a conduit progressivement au développement de méthodes d'essai *in vivo* sur organismes supérieurs et organismes aquatiques en particulier, applicables sur échantillons bruts mais également *in situ*.

La synthèse bibliographique présentée ici est une revue des essais de génotoxicité appliqués au contrôle des milieux environnementaux hydriques et à leurs sources de contamination : eaux continentales et marines, rejets hydriques d'origine domestique, industrielle ou agricole, sédiments de rivières et boues de station de traitement d'épuration. La préparation des échantillons à tester, l'intérêt et le champ d'application des différents essais *in vitro* ou *in vivo* mis en oeuvre seront discutés. Cette revue vise à aider au choix des méthodes d'essais, en fonction de l'objectif poursuivi, du type d'échantillon à examiner, et des ressources en temps et en matériel de l'expérimentateur.

I-2 METHODES DE CONCENTRATION DES ECHANTILLONS

Les niveaux de contamination chimique de l'environnement aquatique sont le plus souvent inférieurs au $\mu\text{g/l}$; ceci implique, pour pouvoir détecter des effets après un temps d'expérimentation relativement court, de faire appel à des essais très sensibles et/ou à une étape de concentration des micropolluants. De ce fait, les essais ne sont pas réalisés directement sur l'échantillon brut prélevé dans l'environnement, mais sur une fraction concentrée des micropolluants de cet échantillon.

Deux techniques principales d'extraction sont utilisées:

- extraction liquide/liquide ou liquide/solide par solvants organiques (tableau 1)

- adsorption des micropolluants sur résine synthétique suivie d'une élution par des solvants organiques (tableau 2).

Ces extractions sont réalisées soit sur l'échantillon brut, soit après ajustement du pH à des valeurs neutres, acides ou basiques. Ces extractions sélectives, qui permettent la séparation des micropolluants selon leur polarité et leurs caractéristiques physico-chimiques, renseigneront sur la contribution relative des différentes fractions à l'effet mutagène. La fraction neutre contiendra des composés organiques apolaires comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques, la fraction acide des micropolluants ionisables à caractère acide de type phénols et acides organiques, et la fraction alcaline des composés à caractère basique tels que les amines.

Les solvants employés par les auteurs sont pour la plupart apolaires ; de sorte que les opérations d'extraction réalisées au pH généralement neutre des milieux hydriques privilégient l'extraction des micropolluants apolaires, tandis que celle des micropolluants polaires (organiques ou minéraux) ne sera que partielle. L'acidification ou l'alcalinisation de l'échantillon, qui peut remédier à ce problème, présente aussi des inconvénients en induisant des modifications physico-chimiques de certains micropolluants ; par exemple leur hydrolyse.

Une des limites de l'extraction par solvants est qu'elle ne permet pas toujours d'opérer avec des volumes importants d'échantillons. En revanche, c'est une méthode facilement applicable à l'étude des échantillons solides tels que les sédiments.

Lorsque le taux de contamination est très faible comme dans le cas des eaux de surface ou des eaux souterraines, l'utilisation d'une technique de concentration des micropolluants par adsorption sur résine ou charbon actif est préférée, en raison de la facilité à traiter de grands volumes d'échantillon (plusieurs dizaines de litres). Toutefois, la filtration sur résine pour les eaux turbides expose au risque de colmatage et d'une perte possible des composés mutagènes liés aux particules.

Pour pallier aux faibles quantités de micropolluants généralement présents dans les milieux analysés, les facteurs de concentration appliqués sont très élevés (tableaux 1 et 2). Cependant, les rendements d'extraction sont rarement précisés par les auteurs, bien que le résultat des essais et leur interprétation soient directement liés à ce paramètre : la préparation d'un échantillon par une méthode n'apportant qu'un faible rendement d'extraction des micropolluants pourrait conduire à un résultat faussement négatif.

I-3 MILIEUX ENVIRONNEMENTAUX HYDRIQUES ETUDIES

I-3.1 EAUX NATURELLES ET EAUX D'ALIMENTATION

Les lacs et les cours d'eaux sont généralement le réceptacle de rejets d'origine industrielle ou domestique ; mais ils peuvent être également l'objet de pollutions d'origine agricole, par lessivage des sols ou encore de pollutions d'origine atmosphérique. Ces rejets augmentent la charge en matières organiques des eaux superficielles. Dans le cas où ces eaux de surface sont utilisées pour la potabilisation, leur contamination peut se répercuter sur la qualité des eaux d'alimentation. Ainsi, dès 1974, Bellar *et al.* et Rook signalaient la formation de composés haloformes mutagènes par action du chlore sur la matière organique, lors de la potabilisation des eaux par chloration.

Dès lors, de nombreux travaux ont été effectués en vue d'étudier l'influence du traitement de potabilisation sur la génotoxicité des eaux d'alimentation. Il existe une abondante littérature et d'excellentes revues de synthèse sur cette question, que nous ne traiterons pas ici (Fiessinger *et al.*, 1981 ; De Kruijf et Kool, 1985 ; Courtois *et al.*, 1986 ; Ram *et al.*, 1986 ; Horth, 1990). Nous ne parlerons des travaux sur les eaux potables qu'au travers de leurs relations avec les eaux des milieux naturels dont elles sont issues. De nombreux auteurs ont étudié le potentiel génotoxique des eaux de surfaces et des eaux souterraines en rapport avec leur contamination initiale et ses conséquences possibles sur la qualité des eaux potables. Les essais *in vitro* et *in vivo* appliqués à ce type d'échantillons et les résultats obtenus par ces auteurs sont présentés dans les tableaux 3 et 4 .

L'essai de génotoxicité le plus fréquemment utilisé est le test d'Ames réalisé à l'aide de mutants *Salmonella typhimurium his⁻* sur les fractions concentrées des micropolluants, plus rarement sur l'échantillon brut. Les souches TA 98 et TA 100, permettant de détecter des mutations, respectivement, par décalage du cadre de lecture et par substitution de paires de bases, sont le plus souvent utilisées. Les résultats obtenus avec cet essai montrent que l'emploi du chlore dans les processus de potabilisation induit souvent la formation de composés mutagènes (Douglas *et al.*, 1986 ; Heartlein *et al.*, 1981) mais cet effet n'est pas systématique, les eaux traitées par chloration pouvant aussi être moins génotoxiques qu'avant traitement (Athanasίου et Kyrtopoulos 1983). Les composés mutagènes formés par chloration sont des mutagènes directs, dont le caractère génotoxique ne requiert pas d'activation métabolique pour s'exprimer (Nazar et Rapson, 1980).

D'autres essais *in vitro* que le test d'Ames ont été employés pour ce type d'étude. Ils mettaient en oeuvre des cultures de cellules de mammifères et faisaient appel à des critères de mesure de la génotoxicité tels que les échanges de chromatides soeurs (SCE), la formation d'aberrations chromosomiques (AC) ou celle de micronoyaux (MN). Ces essais se sont avérés de sensibilité équivalente sinon supérieure à celle des essais sur procaryotes.

Une étude tout à fait intéressante a été réalisée par Gruener et Lockwood (1979) sur une eau produite par recyclage d'eaux usées. Ces auteurs ont recherché des effets épigénétiques par un test de transformation cellulaire sur cellules embryonnaires d'origine humaine afin de détecter les agents cancérigènes agissant par des mécanismes autres que ceux relevant d'une altération structurale de l'ADN. Leurs travaux ont révélé la présence de promoteurs de cancérisation dans l'eau potable étudiée.

Le souci de se rapprocher du contexte environnemental a conduit au développement d'essais *in vivo* sur organismes supérieurs aquatiques (mollusques, poissons, amphibiens), plus rarement sur végétaux (maïs, plantes herbacées) (tableau 4).

Ces essais ont été utilisés pour tester directement les eaux brutes, sans passer par une étape préalable de concentration des micropolluants ; ceci constitue un avantage certain au plan de la représentativité des résultats et de l'évaluation du risque au niveau environnemental. Ces essais utilisent les mêmes critères de mutations chromosomiques que les tests *in vitro* : échanges de chromatides soeurs, aberrations chromosomiques et micronoyaux. La durée d'exposition dans les études de Prein *et al* (1978), et de Jaylet *et al* (1987) reste courte (3 à 12 jours) à l'échelle de la durée de vie de ces organismes aquatiques.

Les études conduites par Prein *et al.* (1978), Heartlein *et al.* (1981) et De Marini *et al.* (1982) sur poissons ou maïs témoignent d'une meilleure sensibilité des essais *in vivo* par rapport au test d'Ames. L'originalité de l'essai de mutation reverse sur maïs réalisé par Heartlein *et al.* (1981) et De Marini *et al.* (1982) mérite d'être soulignée, dans la mesure où l'utilisation de plantes supérieures en mutagénèse est rare par rapport aux essais sur cellules ou organismes animaux.

La recherche d'adduits à l'ADN, reconnus comme indicateurs précoces d'un effet initiateur, est une méthode en plein développement et applicable aux organismes exposés en laboratoire (Shugart *et al.*, 1987 ; Kurelec *et al.*, 1988 ; Mc Carthy *et al.*, 1989) ou prélevés sur des sites contaminés (Kurelec *et al.*, 1990). La méthode du postmarquage au ^{32}P (Randerath *et al.*, 1981), non spécifique, peut être mise en oeuvre sans une connaissance préalable des adduits formés et être appliquée dans le cas d'exposition à des mélanges complexes. Cette technique est sensible et permet de détecter la présence d'adduits à l'ADN avec une fréquence

de $1/10^{10}$ nucléotides (Kurelec *et al.*, 1990). Au contraire, la détection des adduits par des techniques de fluorescence (Mc Carthy *et al.* 1989), ou par utilisation d'anticorps spécifiques, sont des méthodes réservées à la détection d'adduits identifiés ; elle sont utiles pour étudier les niveaux d'exposition des populations à des dérivés génotoxiques donnés.

I-3.2 LES REJETS INDUSTRIELS

L'activité industrielle est souvent à l'origine de la pollution des cours d'eau. Dès lors, l'évaluation de la toxicité, et plus récemment, de la génotoxicité des rejets industriels s'est imposée.

Parmi les tests *in vitro* appliqués à l'étude des rejets, le test d'Ames est encore l'essai le plus utilisé pour tester les fractions concentrées de ces échantillons ; il est plus rarement appliqué directement aux effluents bruts (tableau 5).

Au cours de ces dix dernières années, l'utilisation d'essais *in vivo* s'est multipliée. Les travaux de Das et Nanda (1986), Van der Gaag *et al.* (1990) et de Wrisberg et Van der Gaag (1992), mettent en évidence leur sensibilité et leur capacité supérieure à celle des tests *in vitro* à détecter la mutagénicité d'échantillons non concentrés.

Les résultats des essais, *in vitro* ou *in vivo*, sont néanmoins variables en fonction du type d'industrie et de la nature des effluents. Le blanchiment de la pâte à papier par le chlore est souvent générateur de composés mutagènes, vis-à-vis desquels les souches de *Salmonella typhimurium* his⁻ présentent une sensibilité élevée leur permettant de détecter la mutagénicité de ces micropolluants même sur effluents bruts (Nazar et Rapson, 1980 ; Holmbom *et al.*, 1984 ; Das et Nanda, 1986 ; Wrisberg et Van der Gaag, 1992).

Lors de l'étude d'un effluent épuré provenant d'une usine pétrochimique, Van der Gaag *et al.* (1990) ont comparé les réponses de deux essais *in vitro*, Ames et SOS chromotest, et de trois essais *in vivo*, échanges de chromatides soeurs sur poissons et essais micronoyaux sur moules et amphibiens. Les tests *in vitro* n'ont donné de résultats positifs qu'avec les fractions concentrées ; en revanche, les essais *in vivo* ont révélé la génotoxicité de l'effluent brut (tableau 5). Dans le cadre de cette étude, le test SCE sur *Nothobranchius rachowi*, qui donne une réponse positive après 96 heures d'exposition, est apparu particulièrement sensible. Des études comparatives de cet ordre sont très intéressantes pour évaluer les performances des différents modèles et devraient être plus fréquentes.

I-3.3 SEDIMENTS ET BOUES DE STATION D'EPURATION.

Le compartiment sédimentaire est souvent négligé lors des études environnementales bien qu'il joue un rôle important dans l'accumulation des micropolluants et leur relargage éventuel dans la colonne d'eau.

L'étude de la génotoxicité des sédiments passe généralement par une étape préalable d'extraction des micropolluants adsorbés sur les particules de sédiment, et fait appel à des essais *in vitro*. L'extraction est réalisée par des solvants organiques avec ou sans modification de pH (tableau 1) ; ce protocole est intéressant à des fins analytiques, si l'on souhaite réaliser une extraction totale des micropolluants. Il pose par contre des problèmes de représentativité sur un plan environnemental ; une lixiviation en milieu aqueux (ou élutriation) paraît plus représentative des phénomènes de relargage qui peuvent avoir lieu lors d'épisodes de crue ou à l'occasion de dragages.

En raison des facteurs de concentration élevés, appliqués lors de la préparation des échantillons, les volumes d'extraits disponibles sont faibles, rendant implicite le recours aux essais *in vitro* (tableau 6).

West *et al* (1988) et Fabacher *et al* (1988) ont trouvé une meilleure sensibilité du test de synthèse non programmée de l'ADN (test UDS, qui mesure l'induction des systèmes de réparation de l'ADN), comparé au test de mutation génique HGPR^T aux loci de l'hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transférase induisant une résistance à la 6-thioguanine.

A notre connaissance, aucun essai *in vivo* sur vertébrés ou invertébrés aquatiques, benthiques ou épibenthiques n'a été encore développé et validé pour l'étude directe de la génotoxicité des sédiments. Des essais de mutagénèse sur plantes supérieures ont cependant été appliqués par Plewa (1984) pour évaluer la génotoxicité des boues d'une station d'épuration de Chicago aux USA (tableau 6). Ils consistent en un essai de mutation génique sur maïs et un test micronoyau sur une plante herbacée, *Tradescantia paludosa*. Les plantes sont cultivées dans un sol mélangé au sédiment à tester en proportions déterminées. Les résultats positifs obtenus par cet auteur montrent qu'un transfert de micropolluants génotoxiques peut avoir lieu de la boue vers la plante.

Actuellement, une politique de valorisation agricole des boues de station d'épuration tend à se développer. Du point de vue réglementaire, la décision d'épandage de ces boues est basée sur leur teneur en métaux lourds. Ces tests sur *T. paludosa* et sur maïs seraient donc d'un intérêt certain pour définir la qualité "écotoxicologique" des boues de station d'épuration.

I-4 COMPARAISON DES PERFORMANCES DES ESSAIS IN VITRO ET IN VIVO VIS-A-VIS DE MUTAGENES CONNUS

L'évaluation de la sensibilité des différents tests *in vitro* et *in vivo* employés peut être réalisée en comparant leur réponse à des mutagènes connus, en tenant compte des niveaux de concentrations testées et de la durée d'exposition. Les tableaux 7 et 8 synthétisent les réponses des précédents essais aux substances génotoxiques utilisées comme contrôles positifs.

Les essais réalisés sur bactéries (tableau 7), Ames et SOS-chromotest, rapides (respectivement 48h et 2h d'exposition) et faciles à mettre en oeuvre apparaissent sensibles à une large gamme de mutagènes. Le SOS-chromotest est utilisé pour les échantillons environnementaux, mais moins systématiquement que le test d'Ames (Xu *et al.*, 1987 ; Harwood *et al.*, 1989 ; Van der Gaag *et al.*, 1990). Les études comparatives sur ces échantillons manquent pour juger de la sensibilité relative de ces deux tests ; les éléments de comparaison proviennent essentiellement d'études sur produits purs (Quillardet *et al.*, 1982 ; Von der Hude *et al.*, 1988) qui font apparaître une sensibilité spécifique de l'un ou l'autre réactif bactérien en fonction de la structure chimique des composés étudiés. Ainsi, les acridines et les amines aromatiques positives avec le test d'Ames, n'induisent généralement pas de réponse SOS ; inversement, des furocoumarines positives avec le SOS chromotest, peuvent donner des réponses négatives sur *Salmonella typhimurium his⁻* (Lecointe 1984).

Le test d'aberrations chromosomiques sur cellules de poisson semble être plus sensible que les essais sur cellules de mammifère compte tenu des concentrations d'exposition à des contrôles positifs comme le B(a)P ou le MNNG et de la durée de l'essai. Les essais de résistance à l'ouabaïne et de mutagénicité au locus HGPRT⁻ apparaissent de sensibilité équivalente (tableau 7).

La sensibilité des tests *in vivo* est en partie liée au choix de l'organisme ; ainsi les larves de l'annélide *Neanthes arenaceodentata* sont peu sensibles au B(a)P et au MNNG comparés aux mollusques, poissons et amphibiens (tableau 8). Les deux espèces de poissons, *Umbra pygmaea* et *Nothobranchius rachowi* apparaissent de sensibilité équivalente vis-à-vis de l'EMS ; pour ce qui concerne les bivalves marins, *Mytilus galloprovincialis* semble plus sensible que *Mytilus edulis*.

La sensibilité des tests *in vivo* dépend aussi du critère utilisé pour mesurer l'effet génotoxique. Les critères SCE et AC donnent des résultats du même ordre de grandeur chez *U. pygmaea* et *N. rachowi* (Van der Hoeven *et al.*, 1982 ; Hooftman, 1981 ; Hooftman et Vink, 1981).

Quant au critère micronoyau, il semble moins sensible que les précédents si l'on se base sur les niveaux de concentrations clastogènes plus élevées que celles induisant les échanges de chromatides soeurs ou les aberrations chromosomiques.

I-5 DISCUSSION

L'ensemble de ces résultats montre d'une manière générale que les essais *in vivo*, qui permettent de détecter la présence de micropolluants génotoxiques dans les milieux naturels sans passer par une étape de concentration, sont plus sensibles que les essais *in vitro*. Leur sensibilité dépend toutefois du taux de croissance de l'organisme utilisé ou du taux de division du tissu choisi pour l'étude des critères de génotoxicité. La probabilité de mettre en évidence des aberrations chromosomiques, des échanges entre chromatides soeurs ou des micronoyaux est directement liée à l'index mitotique du tissu cellulaire considéré ; ceci explique le choix privilégié d'individus au stade larvaire, ou l'examen des cellules sanguines ou lymphocytaires pour les études de génotoxicité *in vivo*. Cet élément peut expliquer la sensibilité plus faible d'essais qui seraient réalisés sur des organismes adultes ; ce facteur "développement" mérite donc d'être examiné avant de déclarer telle espèce peu sensible en tant que modèle de génotoxicité *in vivo*. Par le même mécanisme, des micropolluants inhibiteurs de croissance peuvent empêcher l'expression de la génotoxicité d'autres substances présentes conjointement dans des milieux complexes ; d'où l'attention particulière qui doit être portée à la toxicité de l'échantillon aux différentes dilutions testées. Ce problème justifie la démarche de certains auteurs de séparer et tester les différentes fractions des micropolluants.

Si le plus souvent les essais *in vitro* répondent positivement après une étape de concentration des micropolluants, il est des cas où des réponses positives peuvent être obtenues sur échantillons bruts ; ce qui peut témoigner d'un taux de pollution élevé de l'échantillon, mais aussi d'une sensibilité spécifique du système cellulaire utilisé à certaines catégories de micropolluants. C'est le cas de la sensibilité particulière de *Salmonella typhimurium* his- aux produits de chloration des eaux et aux micropolluants présents dans les rejets de la métallurgie ou de la pétrochimie (Nazar et Rarson, 1980 ; Rannug *et al.*, 1981 ; Van der Gaag, 1988).

Cette sensibilité plus faible des essais sur cellules *in vitro* pourrait être liée en partie à la filtration stérilisante sur membrane, utilisée très souvent comme procédé de décontamination bactérienne des milieux hydriques avant leur ajout dans le milieu de culture cellulaire.

La filtration élimine la fraction particulaire de taille égale ou supérieure à 0,22 μm , sur laquelle peut être adsorbé nombre de micropolluants organiques et minéraux.

Parmi les autres procédés de stérilisation possible, la stérilisation gamma a été envisagée par Van der Gaag *et al.* (1990), mais ce procédé n'est pas à la portée de tout laboratoire et une influence du rayonnement sur la structure des micropolluants ne doit pas être exclue.

La sensibilité de certains essais *in vitro* pourrait être optimisée en jouant sur le protocole expérimental : ainsi une préincubation de l'échantillon et de la souche bactérienne avant incorporation au milieu gélosé améliore la sensibilité du test d'Ames, mais au prix d'un alourdissement non négligeable de la procédure expérimentale.

Au plan de la facilité de mise en oeuvre, il est clair que les essais *in vitro* présentent des avantages indéniables en tant que systèmes miniaturisés, se prêtant parfaitement au "screening" de génotoxicité à grande échelle. Ils requièrent de faibles volumes d'échantillons et sont bien adaptés à l'étude des fractions concentrées des micropolluants extraits de milieux contaminés.

Les modèles eucaryotes sont cependant d'une utilisation plus délicate que les modèles procaryotes et demandent une bonne maîtrise des techniques de cultures cellulaires.

Le coût des essais *in vitro* est modéré dans la mesure où leur lecture est aisée et rapide, comme dans le cas des essais basés sur l'examen des mutations reverses (relatives au locus de l'histidine et de l'HGPRT) ou sur l'induction des systèmes de réparation SOS de l'ADN visualisée colorimétriquement. Par contre, ce coût s'accroît s'il s'agit d'essais de cytogénétique sur cellules eucaryotes, dont les lectures microscopiques sont longues et requièrent un personnel expérimenté.

Ces essais *in vitro* sont des outils de choix pour la détection d'un potentiel génotoxique dans le cadre d'essais en séries. Ils posent cependant des problèmes d'interprétation quant à la prédiction de l'impact possible des micropolluants sur l'environnement et la faune aquatique. Il est effectivement difficile d'extrapoler à des organismes supérieurs dotés de systèmes de régulation enzymatiques, hormonaux et immunologiques et exposés pendant des temps très longs aux micropolluants, les résultats obtenus sur des cellules isolées, exposées pendant des temps très courts à des fractions concentrées de ces micropolluants.

Dans un souci de meilleure représentativité, le choix de modèles eucaryotes serait préférable aux modèles bactériens, compte tenu de leur niveau d'organisation supérieur, et le choix de cellules de poissons préférable aux cellules de mammifères pour prévoir un impact en milieu

aquatique. Actuellement, les lignées de cellules de poissons,- cellules RTG2 de truite arc en ciel et cellules BF2 de perche soleil - sont aussi utilisées en génotoxicité pour la détection des adduits à l'ADN des composés électrophiles, au même titre que les hépatocytes de poissons maintenus en survie *in vitro* (Babich et Borenfreund, 1991 ; Masfaraud *et al.*, 1992). Il serait très utile d'avoir des mutants de ces lignées pour un caractère phénotypique donné, qui permettraient de détecter les mutations géniques et compléter ainsi la gamme des essais de cytogénétique relatifs aux mutations chromosomiques.

Mais, ces systèmes cellulaires sont souvent déficients en enzymes nécessaires à la métabolisation des xénobiotiques comme celle réalisée par les monooxygénases chez les organismes supérieurs ; cette déficience peut être constitutionnelle chez les procaryotes ou acquise à la suite de la dédifférenciation des cellules eucaryotes lorsqu'elles sont cultivées *in vitro*.

Ceci implique de compléter le milieu d'essai par des fractions enzymatiques et leurs cofacteurs, capables d'assurer l'activation métabolique des génotoxiques indirects. Ces fractions microsomiales sont généralement préparées à partir d'homogénats hépatiques de mammifères, mais peuvent aussi être obtenues à partir de poissons (Sloof et Van Kreijl, 1982) ou de bivalves.

Au plan de la représentativité, les essais *in vivo* réalisés sur vertébrés et invertébrés aquatiques sont incontestablement supérieurs aux essais sur cellules :

- les organismes supérieurs sont pourvus des systèmes de métabolisation qui participent à la détoxification des micropolluants, mais aussi à l'activation métabolique des procancérogènes,

- ces organismes sont soumis aux contrôles hormonaux et immunologiques qui modulent considérablement les réponses cellulaires face au stress toxique,

- leur sensibilité permet de les utiliser pour l'étude des milieux naturels, des eaux continentales et marines et celle des effluents, sans concentration préalable ; ce qui constitue des conditions plus proches de la réalité environnementale.

Les essais *in vivo* exigent par contre de disposer de volumes importants d'échantillons. De ce fait, les extraits et concentrats dont les volumes disponibles sont généralement faibles, semblent difficilement applicables à ces essais.

Le choix d'un modèle biologique dans les essais *in vivo* sera fonction du type d'échantillon (dulçaquicole ou marin), de la facilité d'élevage des

organismes, de leur disponibilité au cours de l'année, de leur sensibilité et de la facilité de détection de la génotoxicité.

Il semble que les essais micronoyaux sur l'amphibien *Pleurodeles waltl* pour les milieux dulçaquicoles et sur *Mytilus sp.* pour les milieux marins soient intéressants à retenir. A notre connaissance il n'existe pas de test équivalent sur bivalves d'eau douce.

Un développement intéressant des protocoles d'évaluation de la génotoxicité *in vivo* en laboratoire pourrait être leur application *in situ* en écoépidémiologie. L'étude des organismes prélevés au niveau de sites pollués renseignerait sur l'impact réel des contaminants au niveau des populations exposées et constituerait un système de contrôle *a posteriori* des effets de la pollution ; avec la nécessité de disposer d'une zone de référence adéquate permettant de juger valablement de l'influence des contaminants.

A cet égard, la recherche des micronoyaux chez *Mytilus* est très intéressante en milieu marin. Cet organisme se prête bien aux opérations de transfert *in situ* en amont et en aval d'une source de contamination, dont il permettrait de mesurer l'impact réel. En zone fortement contaminée cependant, une sélection "naturelle" des individus les plus résistants ou "adaptés" pourrait conduire à des résultats faussement négatifs (Brunetti *et al.*, 1988) ; ceux-ci devront donc être interprétés avec la prudence et l'esprit critique qui convient aux études épidémiologiques.

I-6 CONCLUSION

Cette étude bibliographique, sans être exhaustive, a permis de recenser les principaux essais *in vitro* et *in vivo* applicables à l'étude des milieux hydriques environnementaux contaminés. Elle devrait aider le chercheur dans le choix de la stratégie et des essais à mettre en oeuvre, selon les objectifs fixés et les moyens disponibles.

Nous voudrions souligner en conclusion, l'intérêt d'une utilisation conjointe des essais *in vitro* et *in vivo*, mettant à profit leurs avantages respectifs pour l'étude de la mutagénicité des milieux hydriques environnementaux : les essais *in vitro* étant bien adaptés au "screening", les essais *in vivo* intéressants par leur représentativité. L'utilisation du test d'Ames, dans le cadre d'un premier dépistage des échantillons à risque, ou d'un essai de mutations chromosomiques sur lignées cellulaires, cellules CHO ou cellules de truite RTG2, associé à un essai *in vivo* tel que le test des micronoyaux sur *Pleurodeles* ou *Mytilus* semble être un bon compromis dans le cadre de l'évaluation de la génotoxicité des échantillons complexes et de la prévision des effets potentiels.

CHAPITRE II

EVALUATION DE LA GENOTOXICITE D'EFFLUENTS COMPLEXES A L'AIDE DU TEST D'AMES ET DU TEST MICRONOYAU SUR LARVES DE TRITON

II-1. INTRODUCTION

Cette partie de notre travail avait pour but d'estimer les capacités de deux tests de génotoxicité à évaluer les potentialités mutagènes d'effluents complexes domestiques et industriels ; nous avons utilisé :

- un test bactérien, le test d'Ames classiquement utilisé en screening.
- un test sur organisme supérieur, le test micronoyau sur larves de pleurodèle (amphibien).

Le test d'Ames a été utilisé comme référence par rapport au test triton encore peu employé et dont il nous fallait déterminer les performances dans le cadre du contrôle ou du suivi de la génotoxicité d'effluents toxiques.

II-2. MATERIEL ET METHODES

II-2.1. LES EFFLUENTS ETUDIES

Cette étude a porté sur huit effluents industriels ou domestiques. Les prélèvements ont été effectués dans des bidons de 30 litres en polyéthylène, puis stockés à 4°C pendant toute la durée des essais. L'origine et la nature des effluents sont données dans le tableau 9. Pour chaque effluent, les essais Ames et triton ont été réalisés à partir du même prélèvement.

Une exception concerne l'effluent BI qui a été prélevé en deux fois (BIa et BIb) à une semaine d'intervalle: le test triton a été commencé avec BIa puis poursuivi avec BIb car le volume du premier prélèvement s'est avéré être insuffisant. Les tests d'Ames ont tous été réalisés sur BIb.

Le pH des effluents BIb, BIIentrée, BIIsortie, BIII, C et D incompatible avec la viabilité des organismes utilisés dans cette étude (*Salmonella typhimurium* et larves de *Pleurodeles waltl*) ont été ajustés aux valeurs indiquées dans le tableau 9 extemporanément à la réalisation des essais.

II-2.2. PREPARATION DE L'EXTRAIT ORGANIQUE ET DU LYOPHILISAT

Dès réception de l'effluent une extraction organique des micropolluants est réalisée, par du dichlorométhane (DCM, Merck 6054), en ampoule à décanter sur un litre d'échantillon sans modification du pH initial (figure 1).

Le mélange échantillon-DCM est agité manuellement pendant cinq minutes puis, après un temps de repos nécessaire à la séparation de la phase aqueuse et de la phase organique, le DCM est récupéré.

Trois extractions par 100 ml de dichlorométhane sont successivement réalisées. Afin d'éliminer toutes traces d'eau dans la phase organique, celle-ci est "séchée" par passage sur du sulfate de sodium anhydre (Na₂SO₄, Prolabo 28114.296).

Le DCM est ensuite évaporé au rotavapor (Rotavapor R, Büchi) à 20°C puis le résidu sec est repris par 10 ml de diméthylsulfoxyde (DMSO).

Parallèlement, la phase aqueuse résiduelle est lyophilisée et le lyophilisat repris par 10 ml d'eau ultra pure (eau Milli-Q).

L'extrait organique et le lyophilisat ainsi obtenus sont donc concentrés 100 fois par rapport à l'effluent brut initial.

Ces fractions concentrées n'ont été testées que par le test d'Ames.

II-2.3 DOSAGE DES METAUX.

II-2.3.1 Dosage des métaux totaux

La concentration totale en fer, chrome et zinc des effluents de la série B a été déterminée par spectrométrie d'émission à plasma d'argon (Beckman Spectra Span 5, type DCP). Les dosages ont été réalisés par le service de chimie de la faculté de médecine de NANCY.

II-2.3.2 Dosage de CrVI

Afin de connaître la part de chrome hexavalent présent dans les effluents de la série B nous avons réalisé un dosage spécifique du chrome VI selon la méthode décrite par la norme NFT 90112. En résumé, CrVI est complexé par un sel d'ammonium de l'acide pyrrolidinodithiocarboxylique (APDC) puis extrait par la méthylisobutylcétone (MIBC) à pH 2,5. Le dosage du chrome VI dans la phase MIBC a ensuite été effectué par spectroscopie d'absorption atomique en flamme (Spectromètre Perkin Elmer 5100).

II-2.4 LE TEST D'AMES.

II-2.4.1 Principe du test.

Le test d'Ames est un test de mutation génique. Il consiste à examiner si une substance chimique est capable d'induire des mutations chez une bactérie: *Salmonella typhimurium* "his⁻" (Maron et Ames 1983).

Les souches de *S. typhimurium* utilisées sont porteuses d'une mutation sur l'un des gènes gouvernant pour la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation "his⁻" rend les souches incapables de se développer sur milieu de culture dépourvu d'histidine. Avec une fréquence propre à

chaque souche, ces mutations "his⁻" peuvent réverter spontanément vers "his⁺". Les bactéries porteuses de cette mutation réverse, peuvent alors pousser sur milieu dépourvu de cet acide aminé.

La fréquence de ces mutations réverses peut être considérablement augmentée en exposant les bactéries à un agent mutagène. Le test d'Ames permet de quantifier l'induction de ces mutations réverses "his⁺".

II-2.4.2 Protocole.

Le protocole que nous avons utilisé est celui décrit par Maron et Ames en 1983 ; il est présenté dans la figure 2.

En résumé, ce test consiste à réaliser une série de mélanges de la souche bactérienne et de quantités croissantes de la substance à tester et à les étaler sur un milieu gélosé où seul les révertants "his⁺" pourront se développer. Certains agents mutagènes n'agissant que sur des bactéries en croissance, des traces d'histidine sont ajoutées au milieu de culture afin de permettre deux à trois cycles de division des bactéries. Après incubation 48 à 72 heures à 37°C les révertants "his⁺" apparaissant sous forme de colonie sont dénombrés.

Une substance peut ne pas être mutagène sous sa forme primitive mais peut agir par l'intermédiaire de l'un ou de plusieurs de ses métabolites. Dans le test d'AMES cette métabolisation est assurée en ajoutant au mélange souche/substance un activateur métabolique appelé S9 mix (homogénat de foie de rat contenant les enzymes plus du NADPH).

Lors de chaque essai des contrôles doivent être réalisés pour chacune des souches utilisées :

- ◆ taux de réversion spontanée
- ◆ absence de réponse du solvant utilisé (témoin négatif)
- ◆ réponse à des mutagènes de référence avec et sans S9 mix (témoins positifs).

De plus la stérilité des échantillons, du ou des solvants et du S9 mix doit être vérifiée.

Au cours de cette étude, les essais ont été réalisés sur les souches TA 97a, TA 98 (détectent des mutations par décalage du cadre de lecture), TA 100 et TA 102 (détectent des mutations de type substitutions de paires de bases), avec et sans activation métabolique (S9 mix à 5% de S9). La souche TA 102 est particulièrement sensible aux mutagènes ayant des propriétés oxydantes.

Les échantillons ont été testés bruts d'une part et après concentrations des micropolluants d'autre part (extraits organiques et lyophilisats). Afin

d'assurer la stérilité des échantillons, ceux-ci ont été filtrés sur filtre de porosité 0,22 μm (Millipore) préalablement à la réalisation du test.

II-2.4.3 Interprétation des résultats

Le résultat du test d'Ames est considéré positif si pour l'une des souches testées, le nombre de révertants induits par l'échantillon est au moins deux fois supérieur au taux de révertants spontanés, avec ou sans activation métabolique, et qu'une relation dose-effet est mise en évidence. Un résultat ne sera déclaré négatif que si les témoins positifs ont donné une réponse positive ; attestant ainsi de la validité de l'essai.

Le nombre de révertants induit par le solvant (témoin négatif) pouvant être légèrement différent (supérieur ou inférieur) du nombre de révertants spontanés, nous avons préféré exprimer la significativité de nos résultats par rapport à ce témoin plutôt que par rapport aux révertants spontanés. Ceux-ci nous servant uniquement à vérifier la validité des souches.

II-2.4.4 Concentrations en effluent testées

Les échantillons ont été testés sur *S. typhimurium* aux concentrations suivantes:

Effluents bruts:	0-100-250-500 μl /boîte
Extraits organiques:	0-50-100-200 " "
Lyophilisats:	0-50-100-250 " "

Les lyophilisats des échantillons BI et BIII s'étant révélés très toxiques nous avons dû refaire les essais avec une gamme de concentrations plus faible:

BI:	0-2,5-5-10 μl /boîte
BIII:	0-2,5-5-10-20 " "

II-2.5 LE TEST MICRONOYAU SUR LARVES DE TRITON

II-2.5.1 Principe du test

Ce test consiste à rechercher la présence de micronoyaux dans le cytoplasme des érythrocytes des larves de *Pleurodeles waltl* (Jaylet *et al.* 1986) exposées pendant douze jours à l'échantillon ou la substance à tester. A l'issue de la période d'intoxication, du sang est prélevé par ponction intracardiaque sur chaque larve ; un frottis est réalisé et coloré (fixation 3 minutes dans le méthanol absolu, coloration

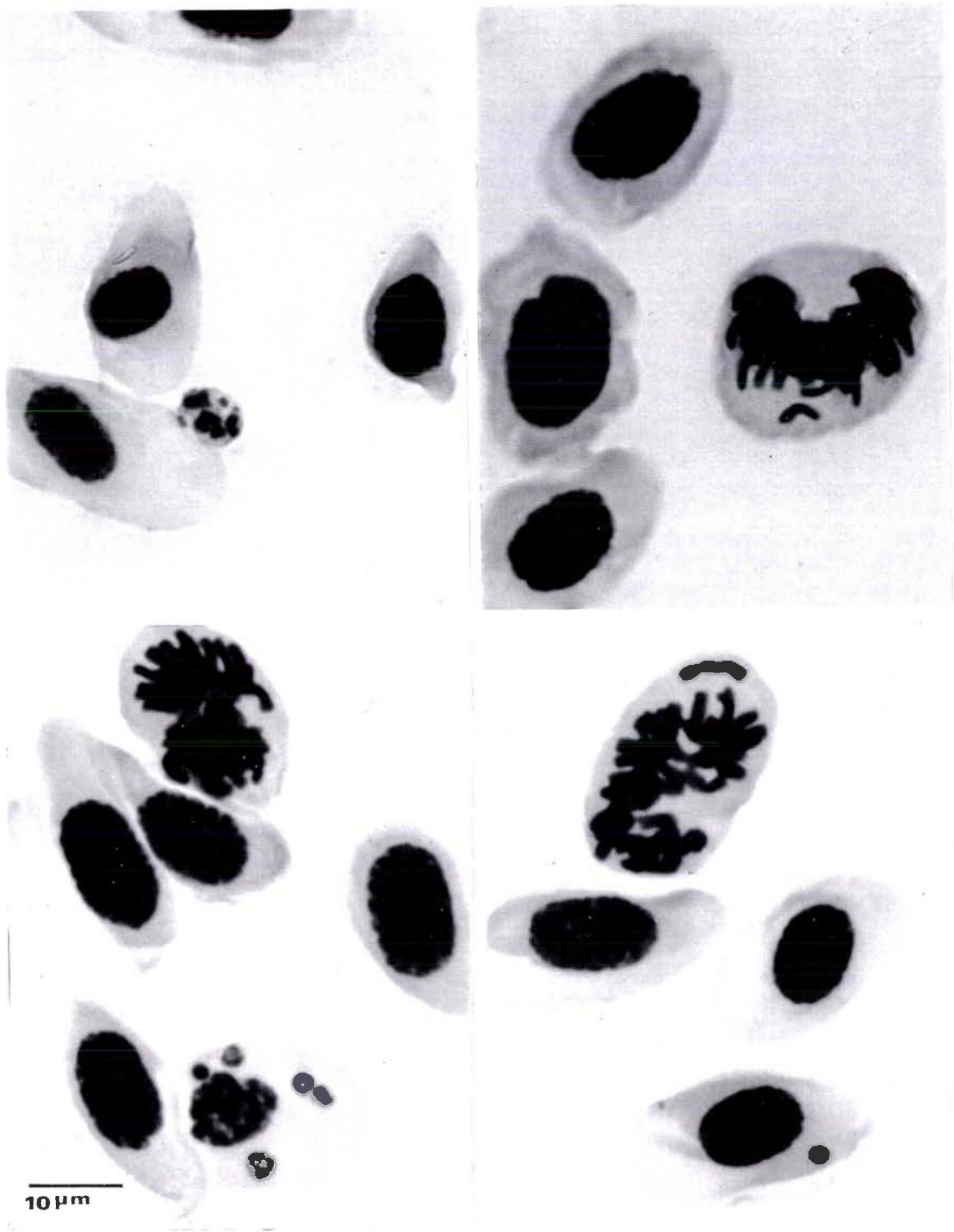


Figure A : Différents types de cellules à micronoyaux observables dans les érythrocytes des larves de pleurodèle exposées à un composé clastogène, (x1000, microscopie optique).

7 minutes à l'hémalun de Meyer (Merck 9249) puis rinçage 10 minutes à l'eau courante).

Les micronoyaux induits sous l'action de substances clastogènes ou de poisons du fuseau mitotique sont des fragments acentriques de chromosomes ou des chromosomes entiers qui ne sont pas intégrés au noyau lors de l'anaphase de la division cellulaire (figure A).

II-2.5.2 Elevage des larves.

Les larves ont été élevées en eau de ville déchlorée et nourries chaque jour, avec des nauplii d'artémia, jusqu'au stade 53 (table chronologique de développement de Gallien et Durocher 1957) requis pour la réalisation des essais. Ce stade correspondant au taux de division cellulaire le plus élevé est favorable à l'action génotoxique des molécules chimiques.

II-2.5.3 Protocoles expérimentaux

II-2.5.3.1 Protocole standard

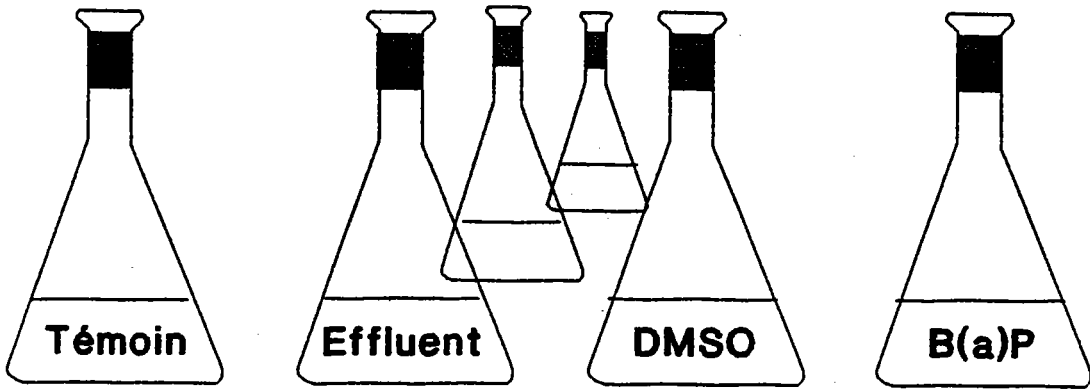
La procédure de réalisation du test triton est explicitée dans la norme AFNOR NF T90325. Nous l'avons résumée dans la figure 3. Nous avons réalisé nos essais avec un milieu synthétique de composition connue (norme AFNOR NF T90305).

KCl	5,75 mg/l	NaHCO ₃	64,75 mg/l
MgSO ₄ ,7H ₂ O	123,25 mg/l	CaCl ₂ ,2H ₂ O	293,75 mg/l

Ces sels sont apportés de la manière suivante :

KCl	0,46 g/l	
NaHCO ₃	5,18 "	---> 12,5 ml/l de milieu
MgSO ₄ ,7H ₂ O	9,86 "	testé.
CaCl ₂ ,2H ₂ O	23,50 "	

Nous avons procédé ainsi afin que la composition minérale de base soit identique dans tous les flacons : témoin ou effluent dilué ou non dilué. Cependant, nous sommes conscients qu'il y aura une augmentation de la minéralité du milieu testé lorsque la concentration en effluent augmentera ; celle-ci tendra vers celle du témoin pour les plus faibles concentrations. D'autre part, du fait de l'ajout des solutions salines, la concentration de l'effluent testé pur sera en fait de 95% (en volume) au lieu de 100% .



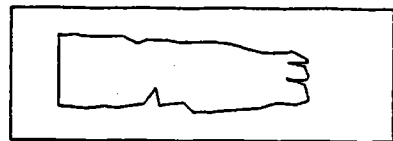
10 à 15 larves de pleurodèle au stade 53
 100 ml de milieu par larve
 T ° C = 20 ± 1, Photopériode naturelle

12 jours d'intoxication

Changement journalier du milieu à tester

Prélèvement sanguin par ponction intracardiaque

1 Frottis par larve
 Fixation, 3 min au méthanol
 Coloration, 7 min à l'hémalun
 Rincer 10 min. à l'eau courante



Compter 1000 érythrocytes par frottis
 Noter le nombre de cellules à micronoyaux
 Traitement statistique des données

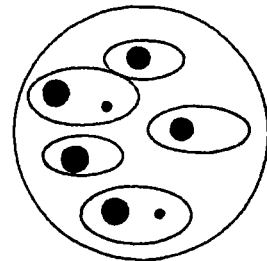


Figure 3 : Protocole standard du test triton

Afin de contrôler la sensibilité du lot de larve utilisé, il est nécessaire de réaliser un témoin positif. La concentration de 50 µg/l de benzo(a)pyrène, B(a)P, nous semblant trop élevée, nous avons choisi de travailler avec 25 µg/l. Cette concentration a été apportée sous un volume de 200 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO) par litre de milieu testé. Cette concentration en DMSO n'est pas toxique pour les larves de pleurodèle.

II-2.5.3.2 Protocole simplifié

Un protocole "simplifié" a été appliqué aux effluents BIb, BIentrée, BIsortie et EI parallèlement au protocole standard. Ce protocole simplifié réalisé en ne renouvelant le milieu d'essais que toutes les 48 heures a été mis en oeuvre en vue d'alléger le travail de l'expérimentateur mais aussi de réduire la quantité d'effluent à prélever; la procédure générale du test restant identique au protocole standard.

II-2.5.4 Traitement statistique des résultats

Nous avons traité nos résultats selon la méthode statistique recommandée par la norme, applicable aux eaux faiblement génotoxiques.

Les taux d'érythrocytes à micronoyaux obtenus pour les différents animaux d'un même lot à l'essai sont rangés par ordre croissant. La distribution de ces valeurs permet de déterminer:

- ♦ les valeurs extrêmes
- ♦ la médiane, valeur située à mi-chemin des extrêmes
- ♦ les quartiles inférieur (Qi) et supérieur (Qs) déterminés de la façon suivante:

* Echantillon à nombre pair, 2p, de valeurs :

$$Q_i = \frac{p + 1}{2} \qquad Q_s = \frac{3p + 1}{2}$$

* Echantillon à nombre impair (2p+1) de valeurs :

$$Q_i = \frac{p}{2} + 1 \qquad Q_s = \frac{3p}{2} + 1$$

Le traitement statistique des résultats fait appel à la méthode de Mac Gill *et al.* (1978) applicable aux petits échantillons ($N \geq 7$) et adaptée dans le sens d'une plus grande sensibilité du test statistique.

Une différence entre deux lots sera significative si les médianes correspondantes sont différentes au risque de 5% ; c'est à dire si les intervalles de confiance des médianes des lots considérés n'ont pas de valeurs communes.

La méthode revient à calculer l'intervalle de confiance de la médiane du témoin au seuil de sécurité de 95% exprimée par la formule :

$$M \pm 1,51 \text{ EIQt}/\sqrt{Nt}$$

où EIQt : écart interquartile du lot témoin (Qs-Qi)

Nt : effectif du lot témoin de taille > 7

Graphiquement, il est possible de juger d'un résultat positif en reportant les valeurs des médianes des différents lots expérimentaux et l'intervalle de confiance calculé à partir de la formule ci-dessus.

Dans ces conditions, la différence observée entre la médiane des lots à l'essai et du lot témoin est significative au seuil de 95% si les intervalles de confiance n'ont pas de points communs. De plus, un résultat ne pourra être déclaré négatif que si une réponse positive a été obtenue avec le B(a)P.

II-2.5.5 Concentrations en effluent testées

Les concentrations que nous avons testées pour chaque effluent sont données dans le tableau suivant.

Tableau 10: Concentrations des effluents testés sur les larves de triton

Effluents	Concentrations testées (% v/v)				
A	6,25	12,5	25		
BI	5	10	20	95	
BII					
Entrée	5	10	20		
Sortie	95				
BIII	2	5	10	20	
C	1	1,25	1,66	2,5	
D	2	4	10		
EI	25	50	95		
EII	12,5	25	50	95	

II-3 RESULTATS

II-3.1 RESULTATS DES TESTS D'AMES

Les résultats des essais sur les effluents bruts et les concentrats sont présentés dans le tableau 11 et les données numériques en annexe I.

II-3.1.1 Les effluents bruts

Les effluents bruts A , BIIentrée et BIIsortie, C, D, EI et EII n'ont pas révélé d'activité mutagène sur les souches de *S. typhimurium* TA 97a, TA 98, TA 100 et TA 102 ; que les essais aient été conduits avec ou sans activation métabolique. La figure 4 donne un exemple de résultats négatifs obtenus pour l'effluent EI. Seuls deux effluents bruts, BI et BIII, ont répondu positivement sur au moins l'une des souches testées (figures 5 et 6). Nous avons remarqué que ces échantillons étaient très toxiques et plus particulièrement en l'absence d'activation métabolique.

La recherche des polluants minéraux, réalisée spécifiquement sur ces deux effluents, a montré qu'ils contenaient du chrome hexavalent (CrVI, 20 à 40 mg/l) et / ou trivalent (CrIII, 10 à 16 mg/l) en fortes concentrations ainsi que du fer (10 à 20 mg/l) et du zinc (5 à 17 mg/l). Les concentrations de ces métaux, mesurées sur les effluents bruts, sont données dans le tableau 12. Nous avons également recherché la présence de micropolluants organiques dans l'effluent BIII (analyse réalisée par l'IRH à Nancy) car celui-ci dégagait une forte odeur d'hydrocarbures. L'analyse a mis en évidence des hydrocarbures benzéniques : benzène 55 µg/l, xylène 74 µg/l (méta plus para 34 µg/l, ortho 40 µg/l) et toluène 260 µg/l.

II-3.1.2 Extraits organiques et lyophilisats

Les fractions organiques et les lyophilisats des effluents A, BIIentrée et BIIsortie, C, EI et EII ainsi que le lyophilisat de l'échantillon D sont dépourvus d'activité mutagène vis-à-vis de *S. typhimurium*, avec et sans activation métabolique, aux concentrations testées. Les concentrations maximales testées étant de 200 µl/boîte pour les extraits organiques (équivalent à 25 ml d'effluent brut) et de 250 µl/boîte pour les lyophilisats (20 ml équivalent effluent). La figure 7 illustre les résultats obtenus pour l'échantillon EI. Seuls, trois concentrats ont répondu positivement ; les lyophilisats des effluents BI et BIII (figures 8 et 9) et l'extrait organiques de l'effluent D.

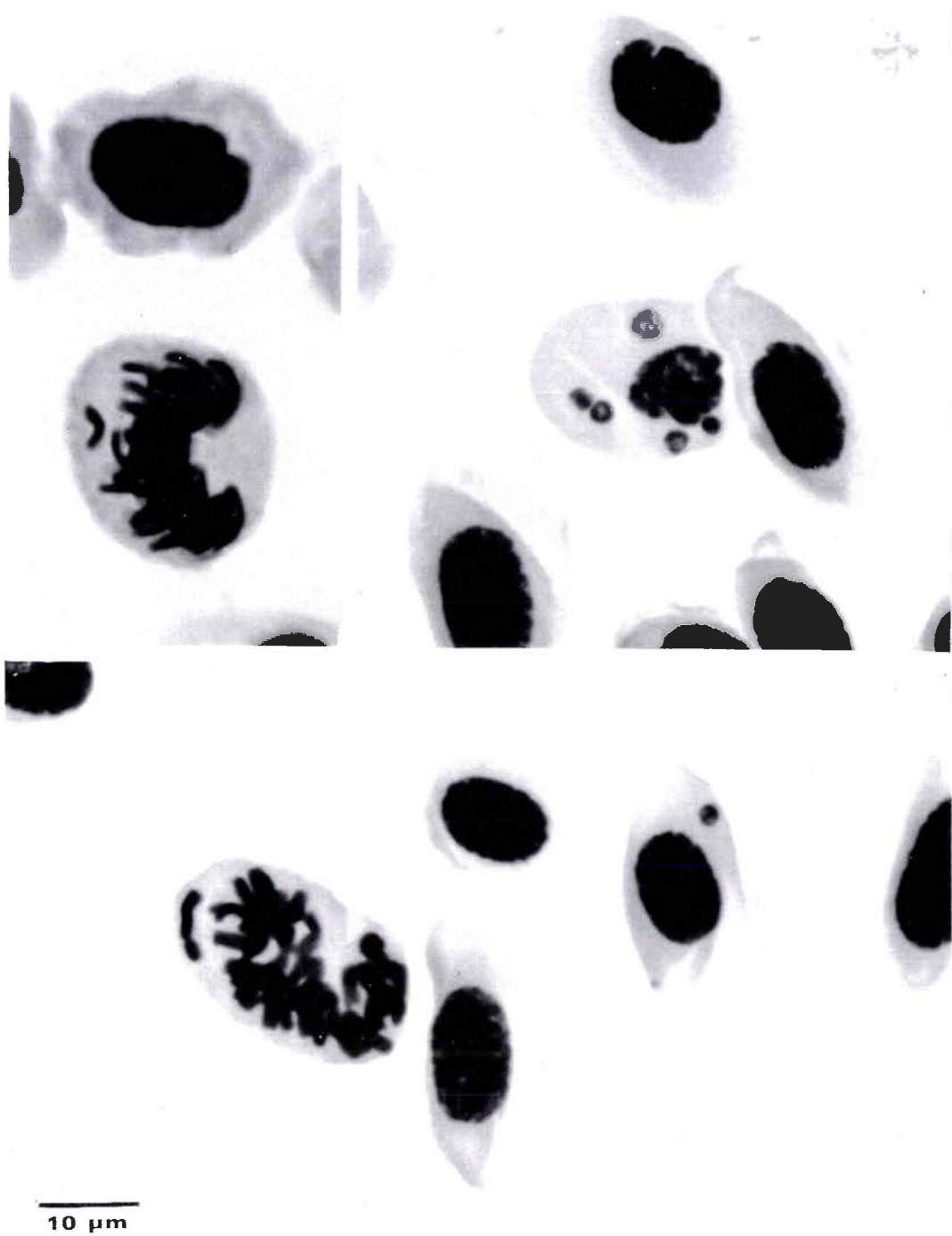


Figure B : Effet clastogène induit chez les larves de pleurodèle exposées pendant 12 jours à l'effluent EII à 25% (x1000, microscopie optique).

II-3.2 RESULTATS DES TESTS TRITON

II-3.2.1 Essais réalisés avec le protocole standard.

Les résultats des essais réalisés sur les huit effluents testés "purs" (95%) ou dilués sont résumés dans le tableau 13 ; les données numériques sont fournies en annexe II.

Le résultat négatif obtenu pour l'effluent A, prélevé à l'entrée d'une station d'épuration urbaine confirme les résultats du test d'Ames et l'absence de propriétés génotoxiques de cet échantillon (figure 10).

Un résultat négatif a également été noté pour l'effluent de papeterie D (figure 11), lequel avait pourtant répondu positivement avec le test d'Ames après concentration des micropolluants organiques. Il nous faut cependant remarquer la forte toxicité de cet effluent vis-à-vis des larves de pleurodèle. En effet, la concentration la plus élevée que nous avons pu tester est 10 % ; ceci pourrait expliquer ce résultat négatif.

La génotoxicité des effluents BI et BIII est confirmée (figures 12 et 13).

Trois effluents non classés mutagènes avec le test d'Ames, BII en entrée de station de traitement, C et E (I et II) ont induit des taux de micronoyaux significativement plus élevés que chez les témoins (figures 14, 15 et 16). Notons que l'effluent BII, prélevés en sortie de station de traitement, est négatif montrant l'efficacité du traitement d'épuration appliqué à cet effluent.

L'effluent EI à la concentration de 50% s'est montré le plus génotoxique avec une médiane à 20 ‰ ; nous avons pu observer de nombreuses images de cellules à multiples micronoyaux (figure B). Cependant, cet effluent n'est pratiquement plus génotoxique à la concentration 25 %. L'essai réalisé sur un deuxième prélèvement, EII, a confirmé la génotoxicité importante de cet effluent ; celle-ci diminuant rapidement par dilution (voir résultats en annexe).

II-3.2.2 Essais réalisés avec le protocole simplifié.

Ce protocole consistant à ne renouveler le milieu d'essai que toutes les 48 heures à été appliqué à trois effluents, parallèlement au protocole standard (tableau 13).

Nous n'avons pas observé de différences avec les échantillons BI et BII selon que le milieu ait été renouvelé tous les jours ou tous les deux jours (figures 12 et 14). En revanche avec l'effluent EI à 95% le taux de cellules à micronoyaux induit est très supérieur à celui obtenu avec un renouvellement journalier (28‰ contre 11,5‰).

A la concentration 50% celui-ci est du même ordre de grandeur pour les deux protocoles (19°/∞ et 22°/∞) ; à 25% le taux de micronoyaux induit, bien que supérieur à celui du témoin, n'est pas significatif.

Une différence apparaît nettement avec le témoin positif : la génotoxicité du B(a)P n'est plus détectée à la concentration de 25 µg/l dans tous les cas où le protocole simplifié a été appliqué.

II-4 DISCUSSION

Les essais réalisés ont permis de détecter la génotoxicité de sept effluents sur les huit étudiés : les trois effluents de traitement de surface (BI, BII et BIII), les effluents issus de la production de styrène (C), de dérivés chlorés (EI et EII) et enfin l'effluent de papeterie (D).

Seul l'effluent A, prélevé à l'entrée d'une station d'épuration urbaine, a été classé non génotoxique avec les deux tests.

La faible sensibilité du lot de larves utilisé pour l'effluent C, se traduisant par une faible capacité d'activation du B(a)P (médiane à 5°/∞) peut expliquer le résultat faiblement positif obtenu pour cet effluent. En effet, compte tenu de l'origine de cet échantillon (plateforme de vapocraquage du naphta) il est possible qu'une activation métabolique soit nécessaire pour que le potentiel génotoxique de cet effluent s'exprime pleinement.

L'analyse des résultats met en évidence une plus faible sensibilité du test d'Ames par rapport au test micronoyau sur triton. En effet, seuls trois effluents sur huit (BI, BIII et D) dont un après concentration (D) ont pu être déclarés mutagènes à l'issue des essais réalisés sur *Salmonella typhimurium*, alors que le test triton a révélé la génotoxicité de six échantillons (BI, BIIentrée, BIII, C, EI et EII) testés "purs" ou dilués ; quatre d'entre eux n'avaient pas répondu positivement avec le test d'Ames : BIIentrée, C, EI et EII).

Quelques hypothèses peuvent être émises pour expliquer la plus faible sensibilité du test d'Ames pour ces échantillons. Il se peut que le facteur de concentration appliqué (x100) ne soit pas suffisamment élevé : ce taux de concentration résulte en fait d'un compromis entre le volume d'effluent, que l'on peut traiter par la technique d'extraction que nous avons utilisée, et le volume de concentrat nécessaire à la réalisation d'un test d'Ames.

La procédure choisie pour la réalisation des concentrats (extraction organique au DCM puis lyophilisation de la phase aqueuse résiduelle) peut aussi être discutée puisque les micropolluants, contenus dans les effluents, sont répartis entre l'extrait organique et le lyophilisat ; dans ces conditions, un effet d'interaction éventuel entre composés polaires et apolaires ou organiques et minéraux n'est plus pris en compte. En effet,

les dérivés organiques apolaires se retrouvent préférentiellement dans la phase dichlorométhane, les dérivés non volatils et minéraux dans le lyophilisat.

Les larves de pleurodèle qui se sont avérées plus sensibles que *Salmonella typhimurium* à détecter un effet mutagène, n'ont pas dépisté les potentialités génotoxiques de l'effluent de papeterie (D). Ce résultat pourrait être expliqué par la toxicité importante de cet effluent vis à vis des larves de triton ; de ce fait, la concentration maximale de l'effluent D que nous avons testée (10 %, concentration non mortelle et dépourvue d'effet toxique sur la prise de nourriture) peut ne pas être suffisante pour induire des micronoyaux.

Nous avons vu, dans le cadre du chapitre bibliographique relatif aux essais *in vitro* et *in vivo* applicables aux échantillons de l'environnement, que le taux de division cellulaire jouait un rôle primordial dans la formation des altérations génétiques. Dans le cas de l'effluent D, l'hypothèse d'un effet toxique sur la croissance des larves, aux concentrations testées de 10 %, 4 % et 2 %, semble pouvoir être écartée dans la mesure où, en fin d'essai, les larves présentaient une taille normale.

Le procédé de blanchiment de l'usine dont nous avons étudié l'effluent répond à la séquence C-E-H-D c'est-à-dire, un premier stade de chloration (C), extraction à la soude des chlorolignines formées (E), traitement à l'hypochlorite de calcium (H) puis au dioxyde de chlore (D). Des études ont montré que la source principale de mutagénicité était le stade C alors que les stades E ou D génèrent peu de composés mutagènes (Nazard et Rapson 1980, Rannug *et al.* 1981, Holmbom *et al.* 1984, Carlberg *et al.* 1986).

Il se trouve que nous avons testé un effluent global résultant de tous les stades du procédé de blanchiment ; par conséquent, une dilution des composés mutagènes néoformés lors de la chloration pourrait expliquer la faible mutagénicité de cet effluent. D'autre part, en dehors du procédé de blanchiment, des facteurs tels que la nature du bois utilisé et le procédé de cuisson (au sulfite ou au sulfate), permettant de dissoudre la lignine peut aussi influencer la composition des effluents (Carlberg *et al.* 1986, O'Connor *et al.* 1992).

Les résultats du test d'Ames obtenus à partir des effluents de traitement de surface BI, BII et BIII sont en accord avec les données bibliographiques. En effet, en regard des résultats analytiques, nous pouvions nous attendre à un résultat positif pour les échantillons BI et BIII qui contenaient du chrome hexavalent (40 à 50 mg/l) connu pour ses propriétés mutagènes et carcinogènes (Bianchi *et al.* 1983, Venier *et al.* 1982) alors que le chrome trivalent donne un résultat négatif sur Ames (Nakamuro *et al.* 1978). Ce dernier point explique donc le résultat négatif obtenu sur Ames pour l'échantillon BII entrée qui contenait essentiellement du chrome trivalent (16 mg/l). Cependant, comme nous avons pu le

constater, cet effluent induit la formation de micronoyaux dans les érythrocytes des larves de pleurodèle. Les éléments responsables de l'altération du matériel nucléaire des larves de pleurodèle restent à identifier, et le rôle de CrIII mérite d'être étudié.

Les résultats obtenus sur les effluents BI, BII et BIII ont donné lieu à une étude plus approfondie du rôle joué par les métaux Cr (III ou VI), Fe et Zn dans la mutagénicité de ces effluents. Les résultats des travaux réalisés sont exposés dans le troisième chapitre de cette étude.

Le protocole simplifié mis au point dans le but d'alléger la procédure du test triton mais aussi de réduire le volume d'effluent à stocker peut être envisagé ; le renouvellement du milieu d'essai tous les deux jours ne modifie pas le résultat final quant au caractère génotoxique des effluents testés (BI, BII et EI).

Les résultats négatifs obtenus pour le B(a)P à 25 µg/l indiquent, cependant, une perte de sensibilité du test par rapport au test standard pour ce composé. Il existe donc des situations où la réponse du test micronoyau n'est pas identique selon que le milieu ait été renouvelé tous les jours ou un jour sur deux ; des effluents ayant un faible pouvoir mutagène ou renfermant des composés génotoxiques se dégradant rapidement pourraient ne pas être détectés. Cependant, compte tenu de l'allègement appréciable du travail de l'expérimentateur, le risque de ne pas détecter un effluent génotoxique par ce protocole demande à être estimé en testant d'autres échantillons ; cela avant d'envisager un autre protocole tel qu'une réduction de la durée du test.

II-5 CONCLUSION

Si l'on intègre la réponse des deux essais de génotoxicité, il ressort de cette étude que sept effluents sur les huit étudiés peuvent être déclarés génotoxiques (BI, BII, BIII, C, D, EI et EII) et de ce fait peuvent présenter un risque pour l'environnement en l'absence de tout traitement.

Le test micronoyau a révélé le potentiel génotoxique de 6 effluents, BI, BII, BIII, C (résultat à la limite de la significativité pour cet effluent), EI et EII, mais n'a pas détecté celui de l'effluent D.

Le test d'Ames s'est avéré moins sensible que le test micronoyau sur triton puisqu'il n'a détecté que trois effluents sur huit, BI, BIII et D, dont un après concentration (D). Ce résultat souligne l'intérêt du test *in vivo* sur larves de pleurodèle, organisme supérieur intégrant à la fois les notions de métabolisation et de biodisponibilité qui interviennent dans les mécanismes de toxicité. Le test triton pouvant être réalisé directement sur effluents bruts, "purs" ou dilués, est aussi plus représentatif des conditions réelles d'exposition, que le test d'Ames, réalisé sur un échantillon brut ou concentré.

L'absence de réponse avec l'effluent D, rappelle que le spectre de sensibilité d'un essai, même performant, a toujours des limites ; ce qui milite en faveur de l'utilisation d'essais complémentaires.

Si un allègement du protocole du test triton, tel que nous l'avons expérimenté, et une automatisation fiable de la lecture des frottis sanguins, peuvent être envisagés alors le test micronoyau sur larves de pleurodèle semble voué à un avenir prometteur compte tenu de la sensibilité de ce test.

CHAPITRE III

**IMPLICATION DES METAUX CHROME, FER ET ZINC
DANS LA GENOTOXICITE DES EFFLUENTS**

BI, BII ENTREE ET BIII

ETUDE D'INTERACTION

III-1. INTRODUCTION

Ce travail a été entrepris à la suite des résultats des essais sur effluents en vue d'expliquer la génotoxicité obtenue sur larves de pleurodèle avec l'effluent BII entrée chargé en fer, chrome III et zinc . Le chrome III ne pouvant justifier à lui seul, d'un résultat positif, nous voulions savoir si un effet d'interaction entre les principaux métaux contenus dans cet effluent (CrIII, Fe et Zn) était responsable de sa génotoxicité.

Lors d'un essai préliminaire sur le chrome VI (K₂Cr₂O₇) nous n'avons pas trouvé de taux significatifs de cellules à micronoyau chez les larves de triton contrairement à ce que l'on pouvait s'attendre compte tenu de la génotoxicité du chrome hexavalent. Ce résultat nous a interpellé sur l'origine de la génotoxicité des effluents BI et BIII chargés en fer, chrome VI, zinc (et hydrocarbures aromatiques pour BIII) ; nous avons entrepris d'étudier la possibilité d'un effet d'interaction entre ces métaux.

Les essais ont été réalisés avec le test d'Ames et le test micronoyau sur pleurodèle.

III-2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LA GENOTOXICITE DES METAUX CHROME, FER ET ZINC.

III-2.1. LE CHROME

III-2.1.1. Génotoxicité du chrome

Les propriétés mutagènes et carcinogènes du chrome hexavalent, CrVI, sont à ce jour largement établies tant par les études épidémiologiques que par l'expérimentation *in vitro* et *in vivo*. En revanche, il n'existe pas de preuves expérimentales évidentes d'un pouvoir cancérigène ou mutagène des composés du chrome trivalent, CrIII.

Les composés du chrome hexavalent sont actifs dans de nombreux modèles d'essai de génotoxicité basés sur la mesure :

- des altérations de l'activation des systèmes de réparations de l'ADN (Kawanishi *et al.* 1986, De Flora *et al.* 1984)
- des mutations géniques sur bactéries et cellules eucaryotes (Bianchi *et al.* 1983, Marzin et Vo Phi 1985, Yang *et al.* 1992).
- des altérations chromosomiques sur cellules de mammifères ou sur animal entier (Shindo *et al.* 1989, Howard *et al.* 1992).

Ainsi, le chrome VI donne un résultat positif avec le test d'Ames (sans activation métabolique) dès 2 µg de CrVI/boîte (Bianchi *et al.*, 1983). En présence de S9 mix, l'activité mutagène de CrVI est fortement diminuée (Bennicelli *et al.*, 1983, Venier *et al.*, 1982).

Le chrome hexavalent induit la formation de micronoyaux (MN) chez les cellules CHO traitées par CrO₃ et K₂Cr₂O₇ à 10⁻⁶M soit respectivement 52 µg/l et 104 µg/l de CrVI (Howard *et al.*, 1992).

Une induction significative d'érythrocytes polychromatiques à MN a été obtenue chez des souris traitées par voie intrapéritonéale avec K₂CrO₄ à 40 mg/kg (injection unique, sacrifice après 24 heures). En revanche, ce même composé administré par voie orale (180 mg/kg) n'a pas induit la formation de micronoyaux (Shindo *et al.*, 1989).

Des rats exposés en continu pendant 18 mois à des aérosols de NaCr₂O₇ (100 µg/m³) ou à un mélange d'oxydes de CrVI et de CrIII (Cr₅O₁₂, 100 µg/m³) ont développé des tumeurs pulmonaires (Glaser *et al.*, 1986). De même, des rats mâles exposés pendant deux ans, par implantation intrapulmonaire de pellets contenant 2 mg de chromate de potassium, de calcium ou de zinc, ont développé des tumeurs pulmonaires (Levy et Venitt, 1986).

Au contraire, les composés du chrome trivalent sont généralement inactifs et donnent des résultats négatifs avec le test d'Ames ou d'autres essais *in vitro* (Bianchi *et al.*, 1983, Venier *et al.* 1982, Nakamuro *et al.* 1978).

Dans certains cas où les composés du chrome III donnaient un résultat positif sur le test d'Ames, il apparaissait que ceux-ci étaient contaminés par du chrome VI (Venier *et al.* 1982, Bianchi *et al.* 1983).

Cependant, des études ont montré qu'en présence d'ADN isolé CrIII pouvait, (1) provoquer des dommages du matériel génétique tels que des cassures (Bianchi *et al.* 1983), (2) se complexer avec l'ADN, (3) induire des liaisons entre acides aminés et ADN, ou entre protéines et ADN (Salnikov *et al.* 1992, Kortenkamp *et al.* 1992).

Actuellement, il est reconnu que la forme génotoxique du chrome est le chrome hexavalent en raison de sa capacité à traverser la membrane cytoplasmique des cellules alors que celle-ci est pratiquement imperméable au chrome III.

Au pH physiologique, le chrome VI est principalement sous forme d'ions chromate, Cr₂O₄²⁻, lequel pénétrerait dans la cellule par des canaux ioniques normalement empruntés par SO₄²⁻ et PO₄³⁻ (Standeven et Wetterhan, 1989).

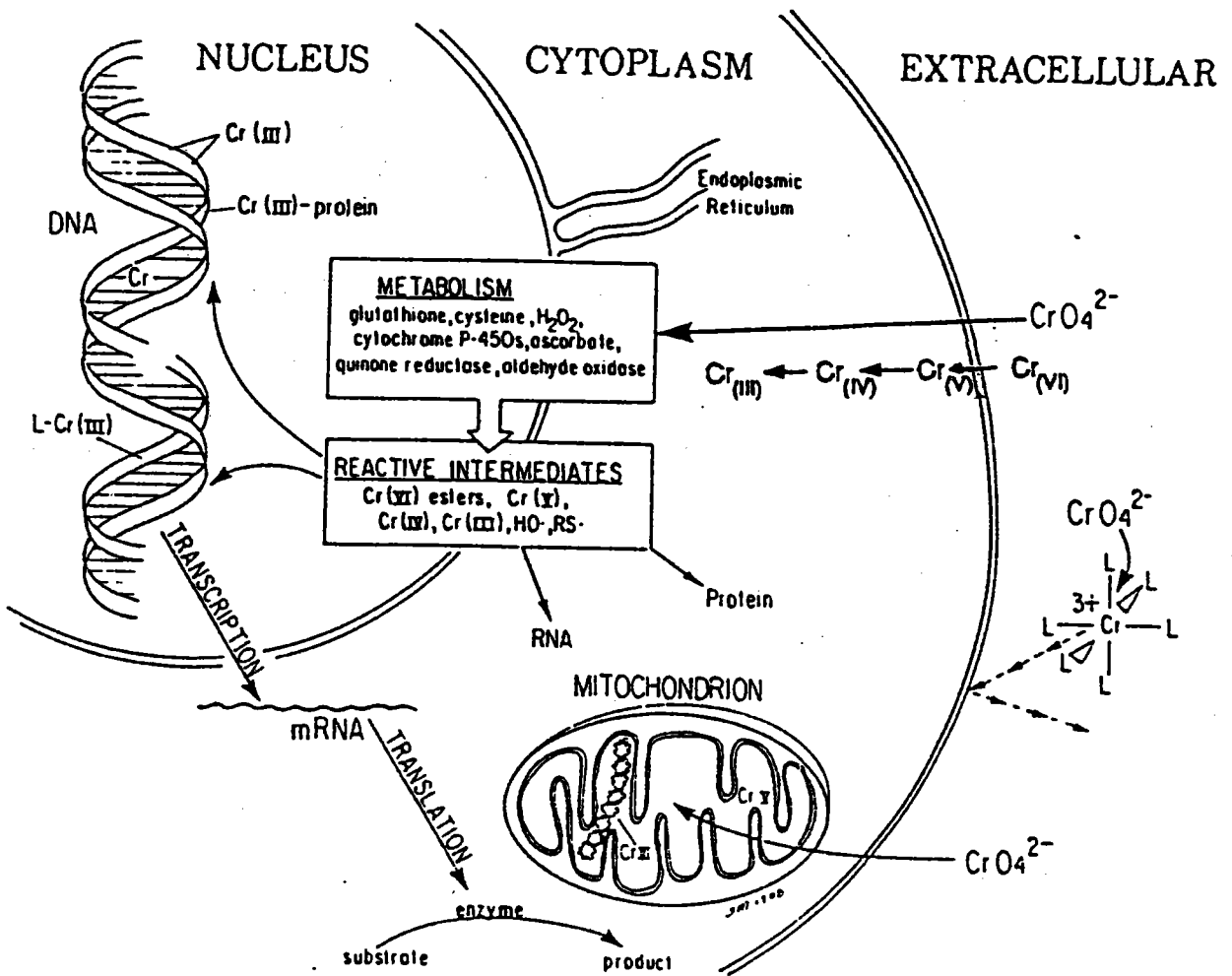
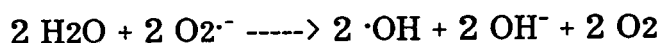
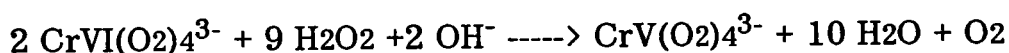


Figure 17 : Modèle de pénétration et de réduction cellulaire du chrome VI intervenant dans le métabolisme et la génotoxicité de métal (Wetterhahn et Hamilton 1989)

III-2.1.2. Processus de réduction de CrVI en CrIII

Une fois à l'intérieur de la cellule, l'ion chromate est rapidement réduit en CrIII par l'intermédiaire de réactions enzymatiques faisant intervenir : (1) le cytochrome P450 (Garcia et Jenette 1981), (2) la DT diaphorase(NAD(P)H) : quinone oxydoréductase (Aiyar *et al.* 1992, O'Brien *et al.* 1985, Goodgame et Joy 1986, Liebross et Wetterhahn 1992), (3) l'acide ascorbique (Suzuki, 1988, Standeven et Wetterhahn, 1991a, Wise *et al.* 1993) et (4) le peroxyde d'hydrogène (Aiyar *et al.* 1991).

Du fait de sa capacité de liaison à l'ADN, la forme trivalente du chrome serait l'état d'oxydation pour lequel la génotoxicité du chrome s'exprimerait dans la cellule. Cependant, la réduction de Cr(VI) en Cr(III) passe par des formes intermédiaires très réactives telles que le chrome V (Aiyar *et al.* 1991, Liebross et Wetterhahn 1992, Goodgame et Joy 1986) ou des espèces radicalaires de l'oxygène, en particulier le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ (Kawanishi *et al.* 1986, Aiyar *et al.* 1991, Coudray *et al.* 1992, Sugiyama *et al.* 1993). Ces radicaux $\cdot\text{OH}$ seraient produits par une réaction de type Fenton dans laquelle CrV jouerait le rôle de catalyseur de manière analogue au fer ou au cuivre (Kawanishi *et al.* 1986 Sutton et Winterbourn 1989, Aiyar *et al.* 1991, Klein *et al.* 1991, Standeven et Wetterhahn 1991b, Faux *et al.* 1992).



(Kawanishi *et al.* 1986)

Les différents mécanismes de réduction du chrome (VI) en chrome (III) sont résumés dans la figure 17.

Aiyar *et al.* (1991) ont démontré (*in vitro* sur ADN isolé) que les dommages subis par l'ADN étaient de natures différentes en fonction de la voie de réduction du chrome. Ainsi, lorsque Cr(VI) est réduit par H₂O₂ (réaction de type Fenton) avec génération de $\cdot\text{OH}$, des adduits de type 8-hydroxydesoxyguanosine (8-OH-dGuo) et des cassures de brins seront induits. Au contraire, si Cr(VI) est réduit par le glutathion (GSH) avec production du radical glutathion-thiyl ($\cdot\text{SG}$) et du complexe Cr(V)-GSH, ce dernier réagira avec l'ADN en formant des adduits de type ADN-Cr-SG. La formation de 8-OH-dGuo a également été mise en évidence (sur ADN isolé) par Faux *et al.* (1992) mais en plus, cet auteur a montré que le chrome trivalent n'induisait pas ce type d'adduit.

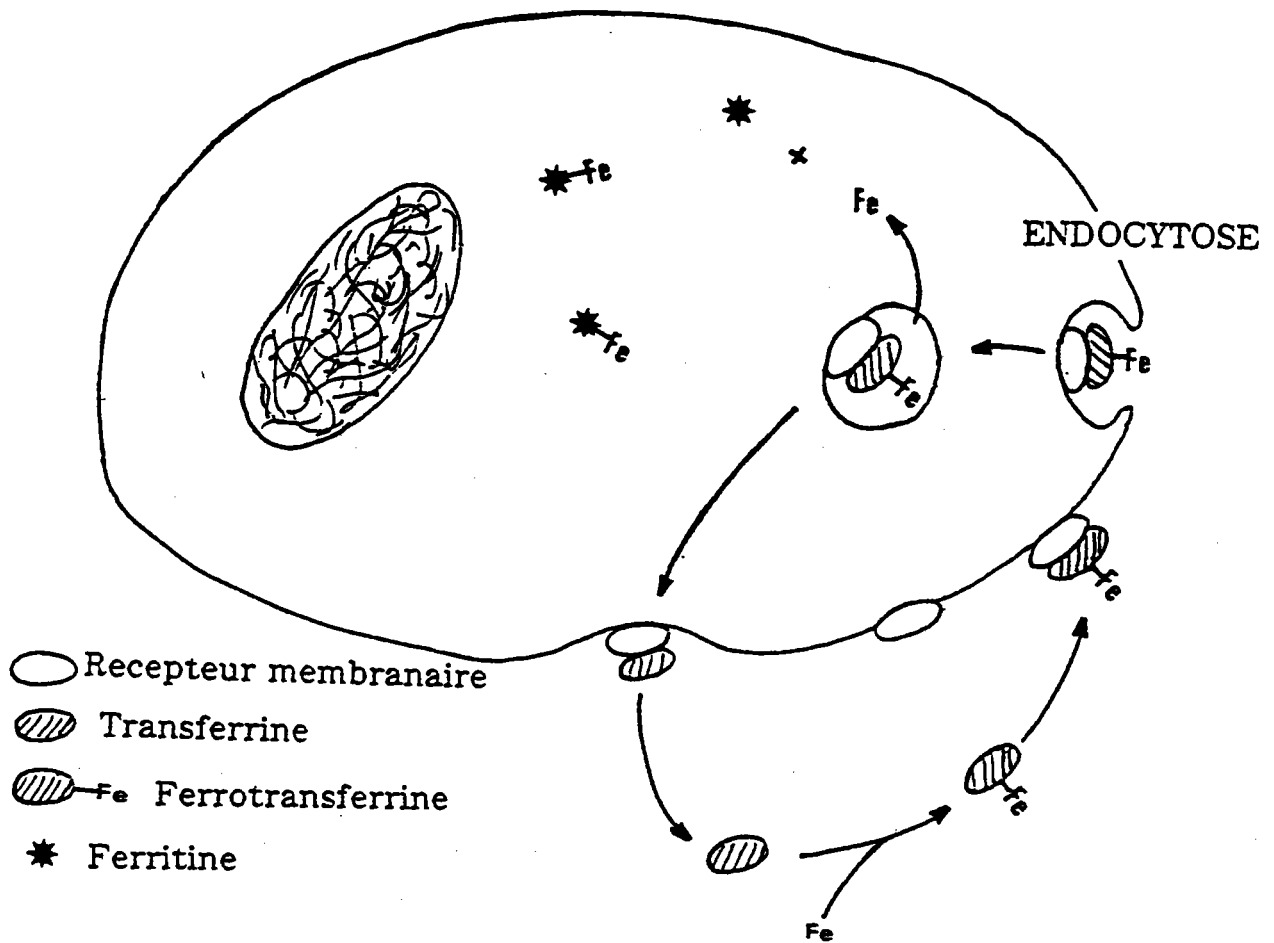


Figure 18 : Mécanisme d'incorporation du fer dans une cellule de vertébré.

La capacité d'une cellule à réduire Cr(VI) en Cr(III) apparaît donc fondamentale pour l'expression de la génotoxicité du chrome hexavalent. Les voies de réduction de ce métal apparaissent multiples et complexes. Cependant, les études les plus récentes semblent privilégier les voies impliquant l'acide ascorbique et le glutathion, voire une action des deux (Aiyar *et al.* 1991, Liebross et Wetterhahn 1992, Standeven et Wetterhahn 1992). Le rôle joué par l'acide ascorbique n'est pas toujours très clair car il peut aussi avoir un rôle protecteur contre la génotoxicité du chrome hexavalent (Wise *et al.*, 1993).

Bien que le débat soit toujours ouvert quant à la forme (intermédiaires métaboliques ou complexes métalliques) sous laquelle agit le chrome en tant que mutagène/carcinogène ultime, il ressort que Cr(V) ou le complexe Cr(V)-GSH ainsi que les espèces actives de l'oxygène seraient à l'origine des altérations causées à l'ADN lors de la réduction du chrome(VI).

III-2.2 LE FER

III-2.2.1. Fer et viabilité cellulaire

Le fer est un élément indispensable aux organismes vivants ; il est impliqué dans de nombreuses réactions nécessaires à la viabilité et à la multiplication cellulaire. C'est un métal essentiel au fonctionnement d'enzymes de la chaîne respiratoire (cytochromes) et du métabolisme oxydatif (péroxydases, mono- et di-oxygénases).

La ribonucléotide réductase contient également du fer. Sa fonction est essentielle puisqu'elle catalyse la réduction des ribonucléotides en désoxyribonucléotides, constituants de l'ADN (Thelander et Reichard, 1979).

III-2.2.2. Incorporation cellulaire du fer

Le fer sous forme oxydée Fe^{3+} est peu soluble au pH physiologique. Chez les vertébrés, il existe un système de protéines spécifiques permettant la solubilisation et le transport du fer trivalent. Le transport extracellulaire est assuré par la transferrine. Le stockage intracellulaire est réalisé sous forme de ferritine (Sussman 1992).
La membrane plasmique est pourvue de récepteurs à la transferrine qui vont capter la ferrotansferrine (fer+transferrine) puis, par un mécanisme d'endocytose, le fer est incorporé au milieu intracellulaire en fonction des besoins de la cellule. C'est le principal mécanisme d'incorporation du fer à la cellule (figure 18).

Le fer intracellulaire est réparti sous deux formes:

- associé à la ferritine pour la majeure partie
- pour une faible part, il est sous forme d'un complexe de faible poids moléculaire.

Ce complexe constituerait la fraction active du fer intracellulaire et serait régulateur du métabolisme de ce métal.

Lorsque le taux de fer intracellulaire est trop faible, la cellule répond à ce déficit en augmentant le nombre de ses récepteurs membranaires et en diminuant le nombre de molécules de ferritine ; l'inverse se produit en cas de surcharge.

III-2.2.3. Génotoxicité et carcinogénicité liées au fer

Nécessaire à la synthèse de l'ADN, le fer est un élément essentiel de la prolifération cellulaire. Plusieurs auteurs ont montré que le blocage par des anticorps spécifiques des récepteurs membranaires de la transferrine inhibait la prolifération *in vitro* de cellules tumorales humaines (Taetle *et al.* 1985, Laskey *et al.* 1988, White *et al.* 1990). L'utilisation *in vivo*, chez la souris, de ces anticorps spécifiques comme traitement antitumoral a induit une diminution sensible du développement des tumeurs, voire une régression dans certains cas (White *et al.*, 1990).

Une étude épidémiologique réalisée à Taïwan sur une population de 21153 hommes suivis pendant 10 ans a montré que les sujets dont le taux de fer intracellulaire était élevé présentaient un risque de cancer plus important (Stevens *et al.* 1986).

Par ailleurs, des cas de sarcome ont été rapportés chez des personnes ayant suivi un traitement par du fer en injection intramusculaire (Greenberg 1976, Robertson et Dick 1977).

Différents types d'oxydes de fer complexes (hématite, magnétite et goethite) et de minerais ont été étudiés par Steinhoff *et al.* (1991) en instillation intrachéale (10 mg/kg toutes les deux semaines pendant 920 jours) et injection intrapéritonéale (200 mg/kg, dans les mêmes conditions) chez le rat. Aucun effet carcinogène n'a pu être mis en évidence. En présence de deux des oxydes testés (hématite: Fe_2O_3 et goethite fibreuse: $FeOOH$), l'action cancérigène du B(a)P (7 mg/kg toutes les deux semaines pendant 780 jours) n'a pas été augmentée.

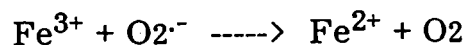
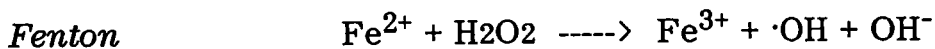
D'autres auteurs (Sieggers *et al.* 1991) ont trouvé une augmentation significative des tumeurs du côlon chez des souris traitées par la diméthylhydrazine (20 mg/kg en injection sous-cutanée une fois par

semaine pendant 10 semaines) et dont la nourriture était supplémentée en fer (fumarate de fer 0,5%-3,5%).

Sharma et Talukder (1987), dans une revue bibliographique relative aux effets des métaux sur les chromosomes des organismes supérieurs, rapportent que le traitement chronique de souris par du fer, induit une augmentation du taux de cellules présentant des anomalies chromosomiques. Cette augmentation est fonction de la dose et du temps d'exposition ; les altérations les plus fréquemment observées sont liées au dysfonctionnement du fuseau mitotique. Des cassures "simple brin" de l'ADN et des SCE ont été mises en évidence, *in vitro*, sur des cellules V79 traitées par du fer complexé à l'acide nitrilotriacétique, Fe-NTA 250 μM à 1000 μM (Hartwig *et al.* 1993). Les travaux de Toyokuni et Sagripante (1993) confirment l'action clastogène du complexe Fe-NTA (Fe 0,25 mM, NTA 1mM, *in vitro* sur ADN isolé).

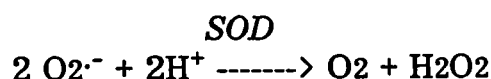
III-2.2.4. Fer, stress oxydant, et génotoxicité

Le fer est connu pour catalyser la production d'espèces hautement réactives de l'oxygène telles que le radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$ ou l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ générés lors des réactions de Fenton et Haber-Weiss.

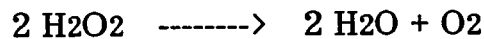


Ces espèces réactives de l'oxygène sont très toxiques pour la cellule. Celle-ci est donc pourvue de moyens de défense enzymatiques. Ces enzymes sont :

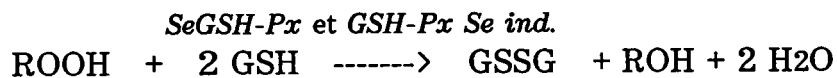
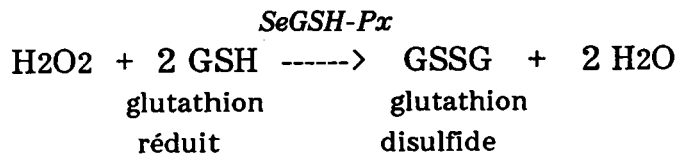
- la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la dismutation des anions $\text{O}_2^{\cdot-}$:



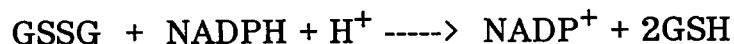
- la catalase qui assure la neutralisation du peroxyde d'hydrogène H₂O₂ :



- les glutathion peroxydases sélénium dépendante (SeGSH-Px) et sélénium indépendante (GSH-Px Se ind.). Ces enzymes catalysent la réduction des peroxydes :



- la glutathion réductase qui régénère le glutathion réduit (GSH) par réduction du glutathion disulfide (GSSG) :



Le glutathion joue un rôle important dans la détoxification des composés électrophiles.

Les espèces réactives de l'oxygène ont été étudiées pour leur implication en mutagénèse et en cancérogénèse.

Ainsi, Sakurai *et al.* (1992), ont montré que le radical ·OH ou une forme oxydante du fer étaient responsables de cassures de l'ADN (*in vitro*) induites par le système oxydo-réducteur GSH/Alloxan.

Gee *et al.* (1992) ont montré que le fer était impliqué dans l'action mutagène (test d'Ames, TA 104) et clastogène (aberrations chromosomiques, cellules CHO) de la 6-hydroxydopamine (6-OHDA). En effet, en présence de desferrioxamine, complexant du fer, l'induction d'aberrations chromosomiques par la 6-OHDA dans les cellules CHO est inhibée à 90%. En présence de SOD, une inhibition de 60% de l'effet clastogène est également observée. Les auteurs en concluent que l'activité génotoxique de la 6-hydroxydopamine est liée à la production d'espèces réactives de l'oxygène *via* la réaction de Fenton (Gee *et al.* 1992).

Mello-Filho et Meneghini (1984) ont montré que l'induction de cassures simple brin dans des fibroblastes humains (V79) par H₂O₂ était liée à la formation de radicaux ·OH au cours de la réaction de Fenton (Fe²⁺ + H₂O₂ -----> Fe³⁺ + ·OH + OH⁻).

Cette conclusion des auteurs est appuyée par le fait que l'O-phénanthroline (chélatant du fer) inhibe totalement la formation des cassures d'ADN par H₂O₂.

Bien que le fer ne semble pas avoir de propriétés génotoxiques lorsqu'il est testé seul (Marzin et Vo Phi 1985, Hansen et Stern 1984, Toyokuni et Sagripanti 1993), il pourrait par son rôle de catalyseur dans la production d'espèce réactive de l'oxygène (réaction de Fenton) induire indirectement des altérations du matériel génétique.

III-2.3. LE ZINC

Les potentialités génotoxiques de ce métal ont été moins étudiées que celles du chrome ou du fer; les données bibliographiques à ce sujet sont beaucoup moins nombreuses. Le zinc est un métal essentiel qui intervient comme cofacteur de nombreuses enzymes, mais aussi dans la régulation de la division cellulaire et de la synthèse de l'ADN chez les mammifères.

Thompson *et al.* (1989) ont étudié la génotoxicité de l'acétate de zinc et du complexe Zn-2,4-pentanedione par 4 essais de mutagénèse : essais sur cellules L5178Y (TK+/-) de lymphome de souris, aberrations chromosomiques sur cellules CHO, test d'Ames et test UDS sur hépatocytes de rat.

L'acétate de zinc induit une réponse positive à partir de 10 µg/ml sur cellules L5178Y et 45 µg/ml sur cellules CHO avec et sans activation métabolique. Les essais avec le test d'Ames et le test UDS sont restés négatifs. Cependant, lorsque Zn est complexé à un ligand organique, le 2,4-pentanedione, une réponse positive est obtenue sur Ames avec les souches TA 98 et TA 1538 avec et sans activation métabolique. L'absence de mutagénicité du zinc (ZnSO₄·7H₂O ; 10 à 1000 nmoles/bte soit 2,87 à 287 µg/bte) a aussi été observée par Marzin et Vo Phi (1985) sur la souche TA 102.

L'acétate de zinc a également été rapporté pour induire des aberrations chromosomiques dans les lymphocytes humains en culture, exposés à des concentrations de 7 à 21,0 µg/ml durant la phase G₀ du cycle cellulaire (Sharma et Talukder, 1987).

Le chlorure de zinc, ZnCl₂, induit *in vitro* des aberrations chromosomiques et plus particulièrement des cassures, dans les lymphocytes humains. En injection I.P. chez la souris, il n'induit pas d'aberrations chromosomiques dans les cellules de la moelle osseuse (Sharma et Talukder, 1987).

En revanche, ZnCl₂ induit un taux de micronoyaux significatif (lot témoin 2,1 ‰, lot traité 11,8 ‰) dans les cellules branchiales de *Mytilus galloprovincialis* exposée à la concentration de 0,17 mg/l de ZnCl₂ (0,11 mg/l de Zn) pendant 48 heures (Majone *et al.* 1988).

III-2.4. CONCLUSION.

Ce résumé bibliographique des propriétés génotoxiques et carcinogènes du chrome, du fer et du zinc montre que les effets observés ne sont pas simples et apparaissent liés à la forme sous laquelle le métal est étudié.

III-3. ESSAIS MIS EN OEUVRE.

III-3.1. ESSAIS REALISES AVEC LE TEST D'AMES.

Afin d'augmenter la sensibilité du test d'Ames, nous avons choisi d'utiliser la méthode faisant appel à une étape de préincubation. Ce protocole consiste à incuber la solution à tester en présence de la souche bactérienne, avec et sans activation métabolique, pendant 30 minutes à 37°C et sous agitation (80 rpm bain-marie thermostaté à agitation Bioblock Scientific 86507). La réalisation du test se fait ensuite comme pour la procédure classique du test d'Ames (figure 19).

III-3.1.1. Concentrations des métaux testés.

Les concentrations des métaux que nous avons testés (CrVI, CrIII, FeIII et ZnII) ont été choisies en fonction des résultats des tests d'Ames réalisés sur les échantillons bruts des effluents BI, BIIentrée et BIII. Les concentrations en chrome, fer et zinc retenues correspondent, en moyenne, aux teneurs en métaux de 100 µl d'effluent BI et BIII (plus faible volume testé ayant donné un résultat positif) et de 500 µl d'effluent BIIentrée (volume maximum que nous ayons testé). Ces concentrations sont résumées dans le tableau 14.

III-3.1.2. Préparation des solutions de métaux.

Les différentes solutions de métaux ont été préparées à partir des sels suivants :

K₂Cr₂O₇ (CrVI, Merck 4864) ; CrCl₃, 6H₂O (CrIII, Merck 2487) ; FeCl₃, 6H₂O (FeIII, Merck 3943) et ZnSO₄, 7H₂O (ZnII, Prolabo, 29253.236). Toutes les solutions ont été préparées avec de l'eau ultrapure (eau milli-Q, système Millipore) stérilisée par autoclavage 20 min à 121°C.

III-3.1.3. Modalités des plans d'interactions étudiés.

Les essais d'interaction ont été construits selon le modèle des plans complets. Dans le cas simple d'un plan d'expérience à 3 variables X1, X2 et X3 dont on veut tester 2 modalités, par exemple 0 et a ou b ou c mg/l, l'ensemble des combinaisons de X1, X2 et X3 à tester est défini selon le modèle décrit dans le tableau 15.

Tableau 15 : Modèle théorique d'un plan d'expérience à trois variables et deux modalités

X1	Variables		Modalités à tester
	X2	X3	
0 mg/l	0	0	Témoin
		c	X3 (c mg/l)
	b	0	X2 (b mg/l)
		c	X2/X3
a mg/l	0	0	X1 (a mg/l)
		c	X1/X3
	b	0	X1/X2
		c	X1/X2/X3

Deux études d'interaction ont été réalisées à partir de ce modèle l'une avec les métaux CrVI, FeIII et ZnII et l'autre avec CrIII, FeIII et ZnII (tableau 16) à partir des concentrations en métaux précédemment définies au paragraphe III-3.1.3.

A titre d'exemple, le plan d'expérience réalisé pour l'essai CrVI/FeIII/ZnII (essai I) est résumé dans le tableau 17.

Les essais d'interaction CrIII/FeIII/Zn (essai II) ont été construits selon le même modèle.

Tous les essais effectués avec le test d'Ames ont été réalisés en duplicat.

III-3.1.4. Réalisation des essais d'interaction I et II.

Les essais ont été réalisés selon la procédure décrite dans la figure 19 sur les souches TA97, TA98, TA 100 et TA 102.

Les solutions de l'essai II contenant du fer avaient un pH acide (3-3,5).

Nous avons donc contrôlé le pH dans les mélanges à incuber, métaux + bactéries ± S9 mix. Le pH du mélange sans S9 mix était de 5,5-6 et de 7-7,5 pour le mélange avec S9 mix (tampon phosphate à pH 7,45 présent dans le S9 mix). Ces valeurs de pH, compatibles avec la viabilité des souches bactériennes utilisées, n'ont pas été modifiées. Seul le pH des solutions témoins correspondantes a été ajusté à ces valeurs.

Le volume de mélange à incuber a été choisi pour permettre une agitation correcte du mélange lors de l'incubation soit 2,1 ml pour les mélanges avec S9 mix (q.s.p. 3 étalements sur boîte) et 2 ml pour les modalités sans activation métabolique.

Les témoins nécessaires à la validation du test d'Ames ont également été réalisés avec préincubation.

III-3.2. ESSAIS REALISES SUR LARVES DE PLEURODELE.

Sauf indication contraire tous les essais ont été réalisés selon le protocole standard. L'ensemble des essais réalisés est résumé dans le tableau 18.

Les dosages de métaux ont été réalisés par spectrométrie d'émission atomique à plasma d'argon, par le service de chimie de la faculté de médecine de NANCY.

III-3.2.1. Etude de l'effet d'un mélange d'hydrocarbures aromatiques

Les essais ont été réalisés sur un mélange de benzène (Merck 1783), de xylène (Merck 8681) et de toluène (Merck 8317) ; molécules dépistées dans l'effluent BIII. Les concentrations testées correspondent à celles trouvées dans l'effluent BIII non dilué (mélange BXT) et dilué à 5 % (mélange BXT 5%).

Les milieux à tester contenant les mélanges BXT et BXT 5% ont été réalisés par ajout respectif de 1 ml/l et 50 µl/l des solutions mères de benzène à 55 µg/ml, de xylène à 74 µg/ml et de toluène à 260 µg/ml. Les quantités requises, en benzène, xylène et toluène, pour la préparation des solutions mères, ont été préalablement dissoutes dans un tiers solvant (DMSO). La concentration en tiers solvant de chaque solution mère était de 200 µl/l. Lors de la réalisation des milieux d'essai, la quantité maximale de DMSO apportée par les solutions mères, était de 0,2 µl/l. Pour cette raison, nous n'avons pas réalisé de témoin DMSO à cette concentration.

Un premier essai a été entrepris avec BXT et BXT 5% (essai 1a) puis à la suite des résultats obtenus nous avons réalisé un deuxième essai avec BXT mais aussi avec 2BXT et 3BXT (essai 1b).

III-3.2.2. Etude de l'effet des métaux CrIII, CrVI, FeIII et ZnII.

Les sels métalliques employés pour la réalisation des solutions à tester sont les mêmes que pour le test d'Ames

Les essais réalisés avec ces métaux ainsi que les concentrations testées sont donnés dans le tableau 18.

Test effectué avec le fer III.

Au pH du milieu synthétique utilisé (7-7,5), pour la réalisation du test triton, le fer précipite instantanément aux concentrations 4,5 et 13,5 mg/l (essai 5a). Aux concentrations 0,5 et 1,5 mg/l, il n'y a pas formation d'un précipité visible.

Afin d'évaluer l'influence du précipité d'hydroxyde de fer sur la formation des cellules à micronoyau nous avons testé en supplément deux milieux, contenant 4,5 et 13,5 mg/l de fer, qui ont été filtrés sur papier filtre (Prolabo 08322.756) pour éliminer le précipité. Par la suite, nous attribuerons le signe (-) aux solutions dont le précipité aura été éliminé par filtration. Le pH des solutions 13,5 et 13,5(-) a été ajusté à 7,0 avant filtration pour qu'il soit du même ordre de grandeur que celui des autres lots testés (tableau 18).

Pour chaque concentration étudiée, nous avons réalisé un dosage du fer sur le milieu total testé ; pour les concentrations 4,5(-) et 13,5(-) mg/l de fer, les dosages ont aussi été effectués après filtration du précipité afin d'évaluer la part de métal restant en solution.

III-3.2.3. Etude de l'effet d'un mélange polymétallique Chrome/Fer/Zinc

Les essais suivants ont été mis en oeuvre afin de mettre en évidence un éventuel effet d'interaction entre ces métaux.

Deux plans d'expérience ont été appliqués : l'un avec les métaux CrVI/FeIII/ZnII (essais 6a et 6b) l'autre avec CrIII/FeIII/ZnII (essais 7a, 7b et 7c).

III-3.2.3.1. Concentrations des métaux testés dans chaque plan d'interaction

La concentration des métaux étudiés a été déterminée à partir des résultats des essais micronoyaux réalisés sur les effluents BI, BIII et BIIentrée. Les concentrations en chrome, fer et zinc retenues, correspondent en moyenne à celles des effluents BI et BIII à respectivement 5% et 2% (interaction avec CrVI) et à l'effluent BIIentrée à 40% et 20% (interaction avec CrIII), ayant donné des résultats positifs sur les larves de pleurodèle (tableau 19)

III-3.2.3.2. Modalités des plans d'interaction étudiés

Les plans d'interaction que nous avons étudiés ont été réalisés selon le modèle des plans complets décrit au paragraphe III.1.3, relatif aux essais réalisés avec le test d'Ames.

Les essais réalisés sont résumés dans le tableau 18.

A titre d'exemple, le plan d'expérience réalisé pour l'essai d'interaction CrIII/FeIII/ZnII (essai 7b) est résumé dans le tableau 20.

a) *Essais CrVI/FeIII/Zn (6a et 6b).*

Les solutions de métaux à tester ont été préparées extemporanément par dilution de solutions mères dans le milieu synthétique. Ces solutions mères sont conservées à 4°C pendant la durée de l'essai.

Le pH des solutions d'essai et du témoin était de 7,5-8. Aucun précipité visible n'est observé avec le fer à la concentration de 0,6 mg/l.

b) *Essais CrIII/FeIII/ZnII (essais 7a, 7b et 7c)*

Lors de l'essai 7a, le fer à 50 mg/l s'est révélé très toxique vis à vis des larves de triton ce qui nous a conduit à modifier le protocole d'intoxication en cours d'essai.

Après 11 jours d'intoxication, nous avons constaté un retard de croissance important des larves de *P. Waltil*, dans tous les lots contenant du fer, rendant la réalisation des prélèvements sanguins impossible. Nous avons donc décidé de prolonger le test pour les lots Fe ; FeZn ; FeCr et FeCrZn. L'intoxication a été stoppée pendant 7 jours, pour permettre la croissance des larves, puis a été reprise pendant 10 jours avec des concentrations en CrIII , FeIII et ZnII, deux fois plus faibles pour chaque métal soit 25, 2,5 et 0,75 mg/l.

Pour les lots Cr ; Zn ; CrZn et témoins, le test a été réalisé selon le protocole normal avec ponction après 12 jours de traitement. Les essais 7b et 7c ont été réalisés selon la procédure normale.

Certains flacons contenant du fer présentaient un pH trop acide (3-3,5) pour les larves de triton. Nous l'avons donc ajusté, dans tous les flacons, à une valeur de 5,5-6 compatible avec la réalisation du test, afin de travailler dans les mêmes conditions de pH pour tous les lots. A ce pH, le fer est instable en solution et précipite sous forme d'hydroxyde de fer.

Pour connaître la part de métal restant en solution après ajustement du pH, des dosages des métaux ont été réalisés sur les solutions filtrées sur papier filtre, et sur les solutions non filtrées. Ces dosages n'ont été réalisés qu'au cours de l'essai 7b.

III-4. RESULTATS.

III-4.1. TEST D'AMES.

Les résultats bruts sont donnés en annexe III.

Les résultats obtenus pour les deux plans d'interaction étudiés, CrVI/FeIII/ZnII (1,0 et 5,0 / 2,5 / 1,0 µg/bte ; essai I) et CrIII/FeIII/ZnII (5,5 et 50,0 / 50,0 / 1,5 µg/bte ; essai II), ne révèlent aucun effet d'interaction entre le chrome trivalent ou hexavalent, le fer et/ou le zinc (figures 20 à 23).

L'absence de mutagénicité du CrIII vis-à-vis de *Salmonella typhimurium* est en accord avec les données de la littérature. (Venier *et al.* 1982, Bianchi *et al.* 1983).

Les résultats positifs obtenus avec les combinaisons CrVI(5,0)/Zn(1,0), CrVI(5,0)/Fe(2,5) et CrVI(5,0)/Fe(2,5)Zn(1,0) résultent uniquement de l'effet mutagène du chrome VI vis à vis des souches bactériennes. La preuve en est que l'effet mutagène induit par ces combinaisons de métaux est identique à celui induit par la plus forte concentration de CrVI (CrVI(5,0)). En présence de la fraction microsomale S9 mix, il y a inhibition de l'activité mutagène du chrome VI.

Nous n'avons pas testé le mélange d'hydrocarbures aromatiques par le test d'Ames.

III-4.2. RESULTATS DES ESSAIS MICRONOYAUX SUR LARVES DE PLEURODELE

Tous les résultats bruts sont donnés en annexes IV.

III-4.2.1. Effets du mélange d'hydrocarbures aromatiques.

Lors de l'essai 1a, le mélange d'hydrocarbures BXT (benzène 55 µg/l, xylène 74 µg/l, toluène 260 µg/l) correspondant à l'effluent BIII s'était révélé faiblement génotoxique pour les larves de triton. En revanche, dilué 20 fois (BXT 5%) ce mélange d'hydrocarbures n'avait plus d'effet (tableau 21).

Afin de vérifier le résultat obtenu avec le mélange BXT nous avons refait un essai mais en ajoutant deux modalités corespondantes à des concentrations en hydrocarbures deux et trois fois plus fortes (2BXT et 3BXT). Lors de cet essai aucun effet clastogène significatif n'a été mis en évidence chez les larves de pleurodèle.

III-4.2.2. Effets des métaux CrIII, CrVI, FeIII et Zn testés en concentrations croissantes.

a) Le chrome III (essai 2) et le chrome VI (essais 3a et 3b).

Les figures 24 et 25 illustrent les résultats obtenus pour ces métaux.

Le chrome III n'apparaît pas génotoxique vis-à-vis des larves de triton pour la gamme de concentrations testées : 0,1 à 5,0 mg/l (figure 24). Deux essais ont été réalisés à partir du chrome hexavalent. Lors du premier essai (essai 3a), nous avons obtenu un résultat positif uniquement pour la plus faible concentration (0,1 mg/l). Ce résultat pouvait faire penser à un effet toxique des concentrations supérieures à 0,1 mg/l. Nous avons donc refait un essai (essai 3b) avec une gamme plus large pour laquelle aucune des concentrations testées (0,01 à 10,0 mg/l) n'a induit un taux significatif de micronoyaux dans les globules rouges des larves de triton (figure 25). Lors d'un essai complémentaire, portant uniquement sur la concentration 0,1 mg/l, aucun effet génotoxique n'a été mis en évidence (résultat non illustré, se reporter à l'annexe IV). Malgré le résultat ambigu de l'essai 3a, il semblerait que le chrome hexavalent soit dépourvu de propriétés clastogènes vis-à-vis des larves de triton dans la gamme de concentrations testées (0,01 à 10,0 mg/l).

b) *Le zinc.*

Pour la gamme de concentrations testée, 0,01 à 10 mg/l, le zinc n'induit pas de micronoyaux dans les érythrocytes de larves de pleurodèles (figure 26). Ce métal est cependant très toxique à la concentration de 10 mg/l pour laquelle 50 % des larves sont mortes dans les premiers jours de l'essai. Seuls les organismes les plus résistants ont survécu jusqu'au jour des ponctions, ceci explique le faible nombre de frottis observés à cette concentration (annexe IV).

Pour les autres concentrations, nous n'avons pas noté d'effet toxique.

c) *Le fer.*

Une mortalité anormale survenue, lors de l'essai 5a, à la concentration 13,5(-) mg/l nous a obligé à retester cette modalité (essai 5b).

Aucune des concentrations en fer de l'essai 5a (0,5 à 13,5 mg/l et 4,5(-)) n'a induit un taux de cellules à micronoyaux significatif par rapport au témoin (figure 27). En revanche, la concentration 13,5(-) mg/l de l'essai 5b a induit une réponse positive avec, cependant, un niveau de significativité assez faible. En effet, la limite supérieure de l'intervalle de confiance à 95 % du témoin est 4,8 et la limite inférieure de cet intervalle est 5,2 pour la concentration 13,5(-) mg/l. On voit que la différence entre les deux intervalles de confiance n'est que de 0,4. D'autre part, nous avons obtenu un résultat négatif avec le B(a)P ce qui pourrait indiquer une faible sensibilité du lot de larves utilisé.

Les résultats d'analyses réalisées sur les différentes concentrations testées montrent que la part de métal restant en solution aux concentrations de 4,5 - 4,5(-) - 13,5 et 13,5(-) mg/l est très faible et que la majeure partie du fer à pH 7,0 est sous forme précipitée (Tableau 22).

Ces concentrations ne sont donc pas équivalentes selon que la solution ait été filtrée ou non ; à 4,5 et 13,5 mg/l les concentrations en fer représentent environ 75% de la concentration nominale. Ce qui est loin d'être le cas avec les solutions filtrées pour lesquelles un maximum de 5% de la concentration nominale reste en solution. Ceci montre qu'au pH 7-7,5 de réalisation de l'essai, la majeure partie du fer aux concentrations de 4,5 et 13,5 mg/l est précipitée.

III-4.2.3. Résultats des essais d'interaction.

III-4.2.3.1. Interaction CrVI/FeIII/ZnII (essais 6a et 6b)

Les résultats numériques des deux essais réalisés sont donnés dans le tableau 23 et illustrés par la figure 28.

Lors de l'essai 6a, seules les combinaisons FeIII/CrVI (0,6/1,0 mg/l) et FeIII/CrVI/ZnII (0,6/1,0/0,3 mg/l) ont induit la formation de micronoyaux chez les larves de triton, malgré la faible sensibilité du lot de larves utilisé (B(a)P à 25 µg/l est à peine positif).

L'essai 6b a confirmé l'absence de génotoxicité du fer et du zinc aux concentrations de 0,6 et 0,3 mg/l respectivement et la génotoxicité des combinaisons FeIII/CrVI (0,6/1,0 mg/l) et FeIII/CrVI/ZnII (0,6/1,0/0,3 mg/l). Les taux de cellules à micronoyaux obtenus pour ces modalités, (18,5 et 17,5‰ respectivement) sont nettement plus élevés que ceux de l'essai 6a (6 et 7‰).

De plus, l'essai 6b a révélé le pouvoir clastogène des lots FeIII/ZnII (0,6/0,3 mg/l), CrVI/ZnII (1,0/0,3 mg/l) et CrVI (1,0 mg/l). Le niveau des médianes obtenues pour ces modalités (8, 7,5 et 8‰ respectivement) est cependant plus faible que celui des lots Fe/Cr et Fe/Cr/Zn précédemment cités.

Les réponses négatives obtenues pour les combinaisons FeIII/ZnII, CrVI/ZnII et CrVI dans l'essai 6a pourraient s'expliquer par une plus faible sensibilité du lot de larves utilisé pour cet essai (médiane du B(a)P à 6,5‰ et 13‰ pour les essais 6a et 6b respectivement).

II-4.2.3.2. Interaction CrIII/FeIII/ZnII (essais 7a ,7b et 7c)

Les résultats numériques des essais réalisés sont donnés dans les tableaux 24 et 25 et illustrés par les figures 29 et 30.

Essai 7a :

Les modalités CrIII (5,0 mg/l), ZnII (1,5 mg/l) et CrIII/ZnII (5,0/1,5 mg/l) de l'essai 7a testées selon le protocole standard n'ont pas induit de micronoyaux. Dans les lots contenant du fer à 50 mg/l et intoxiqués en deux temps, seule la combinaison triple CrIII/FeIII/ZnII (5,0/50,0/1,5 mg/l) a induit une augmentation significative des érythrocytes à MN des larves.

Essais 7b et 7c :

Les essais 7b et 7c effectués en totalité selon la procédure standard confirment le potentiel génotoxique du mélange triple CrIII/FeIII/ZnII.

Cependant, d'autres milieux contenant du fer se sont révélés clastogènes.

Trois modalités peuvent être déclarées positives avec certitude FeIII (12,5 mg/l), FeIII/CrIII (12,5/2,5) et FeIII/CrIII/ZnII (12,5/2,5/0,75) puisqu'un résultat positif a été trouvé dans les deux essais 7b et 7c. D'autre part, la combinaison FeIII/ZnII apparaît également génotoxique bien que les réponses soient positives avec des concentrations en fer différentes : 25,0 mg/l dans l'essai 7b et 12,5 mg/l dans l'essai 7c.

Une ambiguïté apparaît dans le cas de la modalité CrIII puisqu'un résultat positif a été obtenu pour l'essai 7b et un résultat négatif pour les essais 7c et 7a.

Les résultats positifs obtenus pour les essais 7b et 7c peuvent vraisemblablement s'expliquer par une plus faible toxicité du fer aux concentrations testées de 12,5 et 25,0 mg/l par rapport à la concentration 50 mg/l de l'essai 7a.

Comme nous l'avions remarqué pour les essais 6a et 6b le niveau de sensibilité des larves semble influencer l'intensité de l'effet clastogène induit par les métaux étudiés. En effet, les taux de cellules à micronoyaux observés dans l'essai 7b sont supérieurs à ceux de l'essai 7c pour lequel le B(a)P était négatif.

Lors de l'essai 7b, nous avons dosé les métaux dans les solutions à tester (Tableau 26). Au pH 5,5-6 où nous avons réalisé les essais, nous voyons que la quantité de fer restant en solution est très faible par rapport à la fraction précipitée ($\leq 0,55$ mg/l) .

L'ensemble des résultats des essais d'interaction 6(a,b) et 7(a,b,c) est résumé dans le tableau 27.

III-5. DISCUSSION.

III-5.1. SOURCES DE VARIATION DES RESULTATS DES ESSAIS TRITON.

III-5.1.1. Sensibilité des larves de Pleurodèle

La sensibilité des lots de larves utilisés pour la réalisation des essais varie d'une ponte à une autre ainsi qu'en témoignent les résultats obtenus avec le du contrôle positif. La réponse des organismes utilisés à un composé génotoxique peut être fonction de leur potentiel de détoxification et d'activation enzymatique, mais aussi de l'activité des enzymes de réparation des lésions de l'ADN. Une estimation de la sensibilité des larves à détecter un composé génotoxique est donnée par

leur réponse vis-à-vis du témoin positif ; le B(a)P à 25 µg/l.

Le tableau 28 regroupe les résultats de sensibilité au B(a)P des larves de pleurodèle que nous avons utilisées dans cette étude (effluents et métaux). Nous constatons que pour la même concentration en B(a)P (25 µg/l) les résultats obtenus sont très différents. Le taux médian de micronoyaux induit chez le lot de larves le plus sensible est de 49 ‰ ; il est de l'ordre de 5 ‰ pour les lots les moins sensibles ou ceux ayant répondu négativement. Ces résultats montrent que les capacités des larves de pleurodèle à activer le B(a)P en métabolites génotoxiques, sont variables. Cependant, ces variations des capacités d'activation enzymatique d'un mutagène indirect ne préjugent en rien de leur sensibilité à des molécules mutagènes directs (ne nécessitant pas d'activation métabolique). Dans ces conditions, l'opportunité d'introduire un deuxième contrôle positif constitué par un mutagène direct (par exemple l'éthylméthanesulfonate, EMS) peut être discutée. Cette question de la représentativité des substances de référence, reste posée. Il est difficile de certifier que la sensibilité des organismes est équivalente pour des molécules appartenant à des catégories chimiques différentes.

III-5.1.2. Variabilité liée à la lecture des frottis.

Lors de la lecture au microscope, l'observation d'une cellule micronucléée se fera au hasard du balayage de la lame et du comptage des 1000 érythrocytes. Afin d'évaluer la variabilité liée au comptage des cellules à micronoyaux sur les résultats obtenus, nous avons réalisé trois numérations indépendantes et en aveugle des lames de l'essai CrIII/FeIII/ZnII ; essai 7b. Les résultats obtenus pour chaque frottis sont donnés en annexe V. A titre d'exemple le tableau 29 montre les résultats des lots témoin et Fe₂/Cr (25,0/2,5 mg/l). Pour un frottis donné, la variation par rapport à la moyenne, du nombre de cellules à micronoyau observé, est dans la majorité des cas inférieure à 50%, mais elle peut aussi atteindre la valeur de 85%. De ce fait, certains résultats à la limite de la significativité (au risque de 5%) tels ceux des lots CrIII (2,5 mg/l), Fe₂ (25,0), Fe₂/Zn (25,0/0,75) et Fe₂/Cr (25,0/2,5), conduisent à des conclusions différentes suivant que l'on considère la première ou la deuxième numération (essai 7b). Les résultats du tableau 30 montrent clairement que le facteur "numération" influe sur les résultats de l'essai 7b, en modifiant l'intervalle de confiance du témoin (IC), et la médiane des lots étudiés. La valeur de l'intervalle de confiance du témoin (IC) est déterminante car elle va décider de la significativité de l'effet observé dans le cas où l'induction de cellule à micronoyau chez

les lots traités est peu élevée. En effet si IC est faible, comme dans le cas du troisième comptage de l'essai 7b (IC = $\pm 0,9$ (6,1-7,9)), l'existence d'une différence significative entre un lot traité et le témoin est fréquente même si la médiane du lot intoxiqué est peu différente de celle du témoin ; comme le montre le lot CrIII, (médiane de 7 pour le témoin et 9,5 pour le lot CrIII).

Ce problème de variabilité résulte du fait que la répartition des cellules à micronoyau sur un frottis n'est pas homogène ; le dénombrement de mille cellules apparaît insuffisant pour approcher la valeur réelle du nombre de cellules à micronoyau induit chez les larves. Pour déterminer la valeur la plus probable de l'intervalle de confiance et des médianes des différents lots étudiés, la solution pourrait être de compter plus de 1000 cellules par frottis (il resterait à en déterminer le nombre) ; option difficilement applicable pour l'ensemble des lots à l'essai, compte-tenu du temps et du coût financier que cela représenterait.

Ces arguments plaident en faveur d'une numération des frottis par analyse d'image, laquelle permettrait d'augmenter le nombre de cellules comptées ou de multiplier les numérations. Mais encore faut-il que l'analyse d'image soit fiable ; le coût financier lié à l'achat d'un analyseur d'image étant particulièrement élevé, le logiciel mis au point devra être suffisamment performant pour que la numération des frottis puisse donner des résultats justes tout en étant automatisée. Un gros effort de recherche est encore à fournir sur les logiciels en cours de développement pour parvenir à ce résultat.

L'exploitation des frottis continuant à se faire manuellement, il est donc nécessaire de trouver une solution pour diminuer la variabilité des résultats liée à la numération. A cet égard, nous proposons de maintenir une numération sur 1000 cellules pour tous les lots traités et de compter les lames du témoin en triplicat afin de ne prendre en compte que l'intervalle de confiance le plus élevé. Nous sommes évidemment conscients de l'imperfection de cette proposition mais elle nous semble être un bon compromis dans la mesure où il est impossible d'augmenter le nombre de cellules à compter pour tous les lots d'essai.

Compte tenu des sources de variation dont nous venons de discuter, la confirmation d'un résultat par une deuxième expérience apparaît nécessaire. Devant des résultats divergeants lors d'un deuxième essai, l'expérimentateur pourra être aidé dans sa conclusion par l'examen de la distribution des fréquences des cellules à micronoyau des lots à l'essai et du témoin. En effet, s'il existe au sein de la population étudiée des individus avec des teneurs en cellules à micronoyau élevées, ceci est révélateur d'un effet génotoxique évident. Cet effet doit être enregistré même si le test statistique n'est pas significatif parce que le nombre de ces individus est faible.

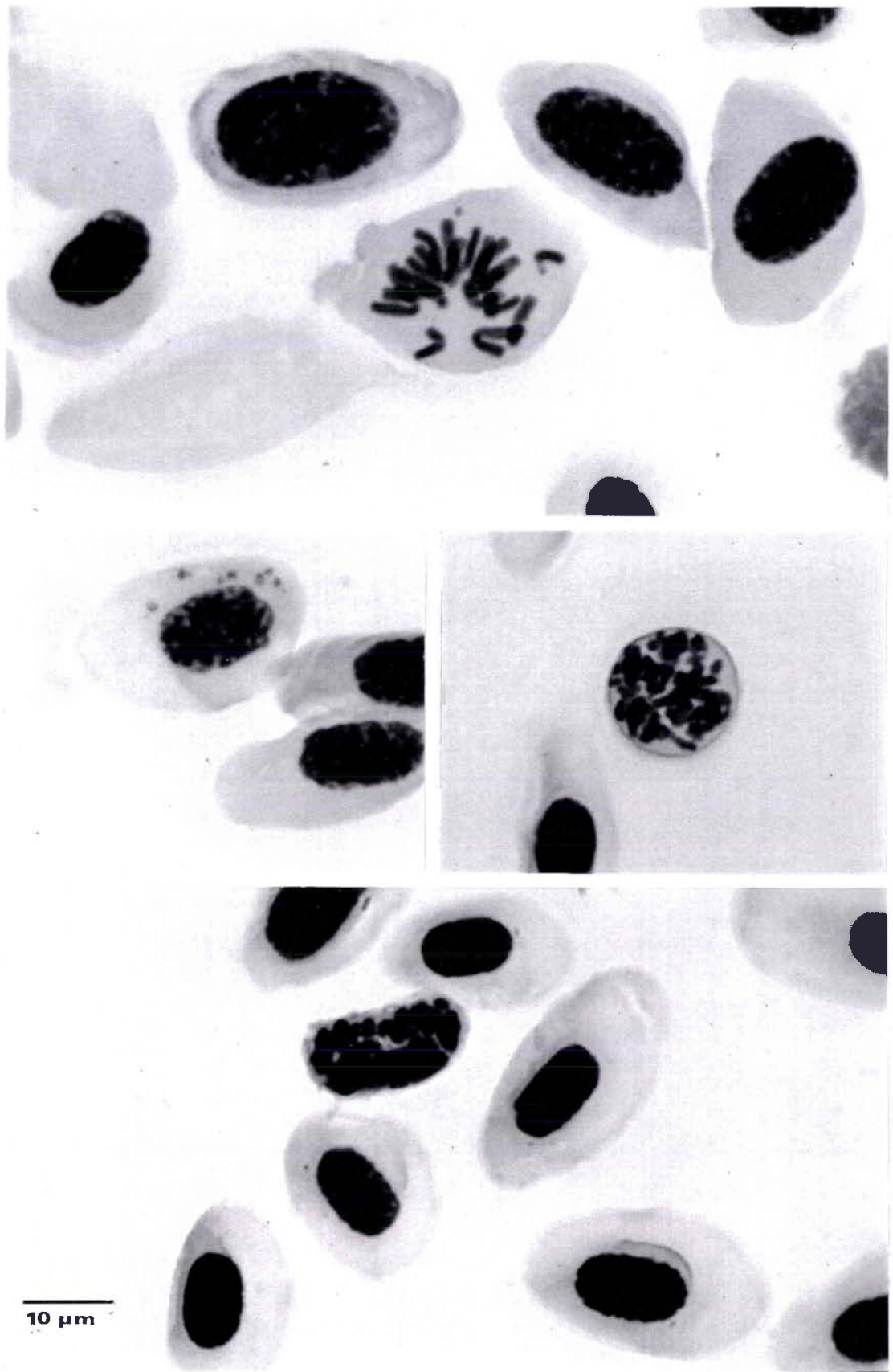


Figure C : Effet clastogène induit chez les larves de pleurodèle exposées pendant 12 jours à 12,5 ou 25 mg/l de fer trivalent (x1000, microscopie optique).

C'est le cas par exemple, avec la modalité contenant Fe à 25 mg/l (Fe²) de l'essai 7b Cr^{III}/Fe^{III}/Zn^{II} pour laquelle quelques frottis présentent des taux d'érythrocytes à micronoyau supérieurs à la valeur maximale trouvée pour le témoin (voir annexe IV).

Ces remarques sur la variabilité des résultats liée à la lecture des frottis nous obligent à considérer avec circonspection, le résultat positif mais à la limite de la significativité, obtenu pour l'effluent C. En effet, nous n'avons pas encore réalisé la triple numération du témoin qui nous permettrait de confirmer ou d'infirmer ce résultat.

III-5.2 LES ESSAIS D'INTERACTION

Les essais réalisés avec le test d'Ames, avec différentes combinaisons des métaux Cr^{III}, Cr^{VI}, Fe^{III} et Zn n'ont pas permis de mettre en évidence un éventuel effet d'interaction entre ces métaux. Les résultats obtenus apparaissent conformes aux données de la littérature : absence de mutagénicité de Fe^{III}, Cr^{III} et Zn^{II} vis-à-vis de *Salmonella typhimurium*. Les seuls résultats positifs que nous ayons enregistrés sont attribuables à la mutagénicité du chrome VI (essais Cr^{VI}/Fe^{III}/Zn^{II}), qu'il soit ou non associé au fer et/ou au zinc. Pour cette raison, nous n'avons pas réalisé d'autres essais avec le test d'Ames pour nous consacrer entièrement aux essais sur larves de pleurodèle car celles-ci se sont révélées sensibles à la génotoxicité de certaines combinaisons du chrome, du fer et du zinc.

Les résultats obtenus pour le mélange d'hydrocarbures détectés dans l'effluent BIII "pur" (benzène 55 µg/l, xylène 74 µg/l et toluène 260 µg/l) montrent que ces molécules peuvent participer à la génotoxicité de cet effluent. Cependant, aux concentrations correspondant à l'effluent BIII dilué à 5% (mélange BXT 5% : benzène 2,75 µg/l, xylène 3,7 µg/l et toluène 13 µg/l) la présence de ces hydrocarbures ne peut pas expliquer la formation de micronoyaux dans les érythrocytes des larves de triton. En revanche, nous avons montré que la génotoxicité des effluents BI, BIIentrée et BIII pouvait être attribuée aux métaux : en effet, le fer seul ajouté à forte concentration (12,5 mg/l), apparaît génotoxique dans les essais d'interactions Cr^{III}/Fe^{III}/Zn^{II} (essais 7b et 7c). Cette génotoxicité du fer peut se traduire par un effet clastogène puissant ; lors de l'essai Cr^{III}/Fe^{III}/Zn^{II} 7b nous avons observé, dans les milieux contenant du fer à 12,5 ou 25 mg/l, de nombreuses cellules à multiples micronoyaux ou, des cellules dont le matériel nucléaire était totalement pulvérisé (figure C). Le résultat négatif que nous avons obtenu lorsque nous avons réalisé l'essai sur le fer trivalent en concentration croissante (essai 5) pourrait être attribué à la faible sensibilité du lot de larve utilisé. Le B(a)P utilisé comme contrôle positif s'étant révélé négatif.

La notion de "forte concentration" est relative, puisque l'analyse a révélé que la quantité de fer réellement en solution (au pH 5,5-6,0 des essais de la série 7) était très faible ($\leq 0,55$ mg/l, voir tableau 26).

La fraction précipitée du fer semble participer à l'effet génotoxique, car nous n'avons pas trouvé de valeurs significatives de cellules à micronoyaux (MN) chez les larves intoxiquées par 0,6 mg/l de fer. A cette concentration il n'y a pas formation d'un précipité visible (essai d'interaction CrVI/FeIII/Zn ; essais 6a, 6b).

Les résultats positifs obtenus pour les modalités FeIII/CrIII (12,5/2,5 mg/l) et FeIII/CrIII/ZnII (12,5/2,5/0,75 mg/l), des essais d'interaction 7b et 7c, sont à attribuer à la génotoxicité du fer et/ou du chrome et non à un effet d'interaction entre ces métaux. En revanche, pour les essais d'interaction FeIII/CrVI/ZnII, (0,6/1,0/0,3 mg/l, essais 6a et 6b) le fer à lui seul ne peut expliquer le résultat positif obtenu avec les solutions mixtes FeIII/CrVI (0,6/1,0 mg/l) et FeIII/CrVI/ZnII (0,6/1,0/0,3 mg/l). Dans ce cas de figure, une additivité des effets de FeIII et de CrVI pourrait être responsable des MN observés dans les érythrocytes des tritons.

Le zinc ne semble pas participer à cet effet génotoxique car le taux de cellules à MN induit par la modalité triple CrVI/FeIII/ZnII (7 et 14 ‰, essais 6a et 6b) n'est pas significativement différent de celui induit par le couple FeIII/CrVI (6 et 16 ‰).

La sensibilité des larves de triton vis-à-vis du chrome VI apparaît variable puisque des résultats soit négatifs (essais 3b et 6a), soit légèrement positifs (essais 3a et 6b) ont été obtenus. Il est donc difficile, à ce stade de notre étude de conclure sur la génotoxicité du chrome hexavalent chez le triton.

Actuellement, la législation sur les rejets industriels régit le niveau de concentration d'un certain nombre de métaux, dont le chrome et le fer. Les normes de rejet de ces métaux, dans les effluents industriels épurés sont de 3,0 mg/l pour CrIII, 0,1 mg/l pour CrVI et 5,0 mg/l pour Fe. Cependant, ces normes se limitent à définir des niveaux de concentrations acceptables pour l'environnement, mais ne tiennent absolument pas compte des associations de métaux.

Or, nos résultats montrent qu'un métal tel que le fer, dont on considère qu'il ne présente pas de risques majeurs pour l'environnement, peut devenir problématique lorsqu'il se trouve associé à du chrome hexavalent. Il serait donc souhaitable que les normes de rejet prennent en compte cet aspect qualitatif en précisant quelles associations de métaux présentent un risque pour les milieux aquatiques.

III-6. CONCLUSION.

Les travaux que nous avons réalisés soulignent l'intérêt du test micronoyau triton par rapport au test d'Ames. En effet, seul le test triton nous a permis de mettre en évidence la génotoxicité du fer et l'additivité des effets du fer et du chrome.

Ces essais sur les métaux chrome, fer et zinc avaient pour but d'expliquer les résultats de génotoxicité positifs sur triton que nous avons obtenus avec les effluents BI, BIIentrée et BIII, contenant un mélange polymétallique de chrome VI, fer et zinc ou chrome III, fer et zinc. Au terme de cette étude, nous sommes à même de répondre à la question posée. En effet, la génotoxicité de l'effluent BIIentrée peut s'expliquer par la forte teneur en fer (105 mg/l) qu'il contenait, alors que l'induction d'un taux significatif de cellules sanguines à MN par les effluents BI et BIII peut être attribuée à une action conjointe du fer et du chrome VI.

Par ailleurs ces travaux montrent que l'établissement des normes de rejet, des métaux contenus dans les effluents industriels, ne peut plus être uniquement basé sur le seul critère analytique mais devrait prendre en compte les effets d'interaction qui peuvent être révélés par des essais biologiques. Il est certain qu'un réel effort de recherche devra être fait dans ce sens dans les années à venir pour définir quelles associations métalliques sont à éviter.

CHAPITRE IV

**ETUDE PRELIMINAIRE DU MECANISME D'ACTION
GENOTOXIQUE DU *FER III* ET DU *CHROME VI* CHEZ
LES LARVES DE TRITON**

IV-1 INTRODUCTION

Dans cette dernière partie de notre travail nous avons poussé plus loin nos investigations pour tenter d'expliquer les facteurs intervenant dans la génotoxicité du fer. Notre hypothèse de départ était la suivante:

"L'action génotoxique du fer seul et du couple FeCr chez le triton peut-elle s'expliquer par l'induction d'un stress oxydant ?"

La SOD, les glutathions peroxydase et réductase interviennent dans la défense cellulaire contre le stress oxydant.

Nous avons donc réalisé des essais avec des larves dont les défenses antioxydantes pouvaient être diminuées suite à l'exposition à des inhibiteurs de ces enzymes.

L'acide ascorbique intervient également en tant qu'anti-oxydant. Le rôle qui lui est attribué est cependant variable suivant les auteurs et les études réalisées.

Ainsi il apparaît qu'il peut soit favoriser l'induction de dommages à l'ADN (Shneider *et al.* 1988), soit jouer un rôle protecteur (Wise *et al.* 1993). Nous avons donc voulu savoir quel pouvait être l'effet d'un traitement des larves par la vitamine C vis-à-vis de la génotoxicité du fer et du chrome.

IV-2 ESSAIS MIS EN OEUVRE

Les essais mis en oeuvre sont résumés dans le tableau 31.

Le N-éthymaléimide (NEM, Sigma E 3876) a été choisie pour sa capacité à inhiber la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (Paglia et Valentine 1967, Hugues *et al.* 1990). Elle agit en formant un complexe avec le glutathion réduit inutilisable par la glutathion peroxidase sélénium dépendante.

Nous avons utilisé le cyanure (CN^-) pour l'inhibition de la SOD cytoplasmique (la SOD mitochondriale est insensible au cyanure). Le cyanure agit en se complexant avec le cuivre de l'enzyme ; il inhibe également la catalase en se complexant avec le fer qu'elle contient.

Enfin nous avons réalisé une série d'expériences en présence de vitamine C susceptible de favoriser la réduction du fer et du chrome, selon Suzuki (1988), Standeven et Wetterhahn (1991) et Wise *et al.* (1993).

IV-2.1. ESSAIS AVEC LA NEM ET Fe III (ESSAI 8)

Les modalités testées lors de cet essai sont les suivantes:

Témoin - Fe (12,5 mg/l) - NEM (62,6 g/l) - EDTA (81,9 mg/l) - NEM/EDTA
- Fe/NEM - Fe/EDTA - Fe/NEM/EDTA - B(a)P

L'acide éthylène diamine tétraacétique sel dissodique (EDTA-Na₂, Merck 8418) a été utilisé pour solubiliser le fer et en augmenter la biodisponibilité ; EDTA et fer sont en concentrations équimolaires (0,22mM).

Les solutions de fer et d'EDTA sont mélangées avant d'être ajoutées au milieu pour favoriser la complexation du fer.

Le nombre insuffisant de larves ne nous a pas permis de réaliser le témoin DMSO.

IV-2. 2. ESSAIS AVEC LE FER, L'EDTA ET LE CYANURE (ESSAI 9)

La concentration en cyanure sans effet toxique aigu pour les larves de triton a été évaluée à 100 µg/l. Par sécurité nous avons choisi de travailler avec une concentration de 50 µg/l.

La solution mère de cyanure (6,26 mg KCN/100 ml soit 2 ml/l de milieu) a été préparée extemporanément en raison de l'instabilité de ce composé.

Lorsque le cyanure était associé au fer et/ou à l'EDTA, les larves ont d'abord été exposées au cyanure pendant deux heures afin que celui-ci puisse agir et se fixer au niveau des cibles cellulaires. Les autres composés ont ensuite été ajoutés au milieu. Ce protocole était susceptible de favoriser l'action du fer.

Pour les autres modalités (Fe, Fe/EDTA, EDTA), les xénobiotiques ont aussi été ajoutés à t₀ + 2 heures puis les larves ont été nourries.

Nous n'avons pas réalisé de témoin B(a)P pour cet essai.

IV-2.3. ESSAI AVEC FeIII, CrVI ET VITAMINE C (ESSAI 10)

Cet essai a été réalisé selon un plan d'expérience complet.

Une semaine avant la réalisation de l'essai, nous avons séparé les larves en deux lots dont l'un a été élevé en présence de vitamine C (1g/l, Merck 500074). L'élevage a été réalisé en aquarium avec le milieu synthétique. Celui-ci a été renouvelé tous les jours. Le pH du milieu avec vitamine C (2,5-3) a été ajusté à 7-7,5 avec un solution de NaOH 5N.

Les modalités testées lors de l'essai définitif sont les suivantes:

Témoin - Fe (0,6 mg/l) - Cr (1 mg/l) - FeCr - B(a)P : avec et sans vitamine C (1 g/l).

L'essai a été réalisé en exposant les larves pendant une heure à la vitamine C, afin qu'elles puissent l'assimiler avant l'ajout des métaux ou du B(a)P au milieu d'essai. Les larves ont été nourries à partir de $t_0 + 1$ heure.

Le pH et la concentration en oxygène ont été mesurés dans le milieu fraîchement renouvelé et après 24 heures pour tous les lots.

IV-2.4. ESSAI AVEC FeIII, CrVI ET CYANURE (ESSAIS 11a,b et c)

Ces essais ont été réalisés selon un plan d'expérience complet. La procédure d'intoxication suivie est la même que celle de l'essai 9. Les concentrations testées sont de 0,6 mg/l pour le fer, de 1 mg/l pour le chrome et de 5 et 25 $\mu\text{g/l}$ pour le cyanure (CN5 et CN25).

Les modalités suivantes ont été testées:

Témoin - Fe - Cr - FeCr - BaP
 FeCN5 - CrCN5 - FeCrCN5
 FeCN25 - CrCN25 - FeCrCN25

Remarque relative à l'essai 11b :

Suite à une erreur de préparation de la solution mère de cyanure au dixième jour, toutes les larves des lots avec cyanure sont mortes. Nous ne disposons pas d'un nombre suffisant de larves au stade requis pour recommencer l'essai complet. Afin de conserver un nombre minimum de larves par erlenmeyer (11) permettant une exploitation satisfaisante des résultats, seuls le témoin et les modalités avec cyanure ont été refaits, mais les larves utilisées (provenant de la même ponte que celles de l'essai initial) présentaient un stade 53 dépassé (le 5^{ème} doigt des pattes antérieures était totalement formé).

Les lots survivants ; Témoin - Fe - Cr - FeCr et B(a)P (sans cyanure) ont été normalement ponctionnés à J12.

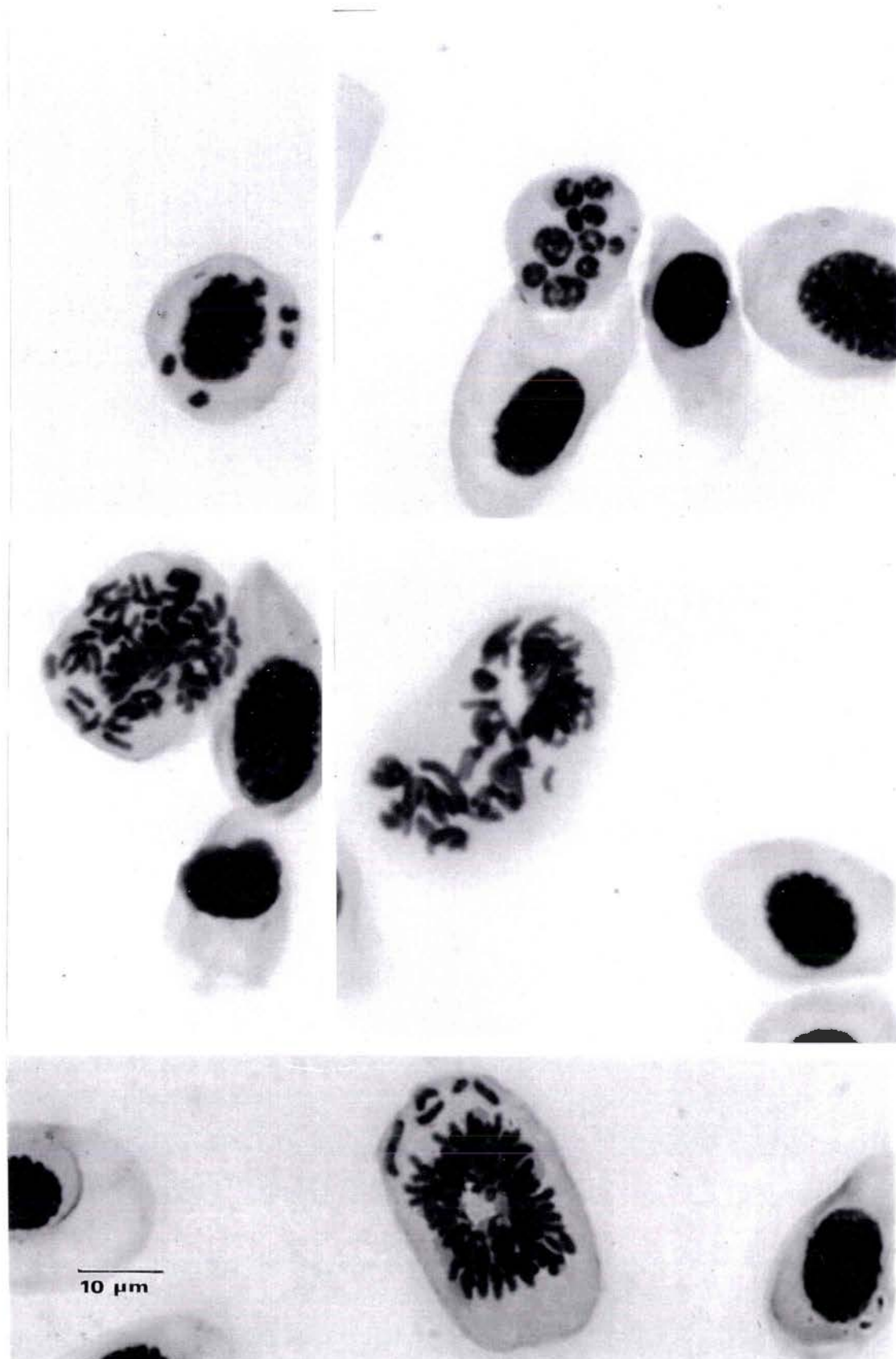


Figure D : Effet clastogène induit chez les larves de pleurodèle exposées pendant 12 jours à 50 $\mu\text{g/l}$ de cyanure (x1000, microscopie optique).

IV-3 RESULTATS

Les résultats bruts sont donnés en annexe VI

IV-3.1. EFFET D'UN TRAITEMENT PAR LA NEM SUR LA GENOTOXICITE DU FER III (ESSAI 8)

Les résultats de cet essai sont donnés dans le tableau 32. Ni l'EDTA (81,9 mg/l soit 0,22 mM), ni le N-éthylmaléimide (62,6 µg/l soit 5.10^{-4} mM) n'ont d'effet sur l'apparition de micronoyaux dans les globules rouges des larves de triton. Le fer à 12,5 mg/l (0,22mM) s'est également révélé négatif.

Lorsque le fer est associé à l'EDTA et/ou au NEM, les taux de cellules à micronoyaux sont du même ordre de grandeur que ceux du témoin.

Le témoin BaP (25 µg/l) dont la médiane est à 10,5°/∞ (témoin 3,5°/∞) permet de valider notre essai.

IV-3.2. EFFET D'UN TRAITEMENT PAR LE CYANURE SUR LA GENOTOXICITE DU FER III (ESSAI 9).

Les résultats de cet essai sont donnés dans le tableau 33.

Il apparaît que l'effet du fer à 12,5 mg/l, bien que positif, est à la limite de la significativité statistique en raison de la faible valeur de la médiane (3°/∞) et d'une distribution des cellules à micronoyaux comparable à celle du témoin.

Cet essai confirme le résultat négatif obtenu avec l'EDTA (81,9 mg/l) lors de l'essai 8.

Avec le fer complexé par l'EDTA, un taux significatif d'érythrocytes à MN (5°/∞) a été obtenu. Cependant, cette valeur reste faible. De plus, la similitude entre les distributions du nombre de globules rouges à MN induits par Fe(III) d'une part et par Fe(III)/EDTA d'autre part nous empêche de conclure à un effet potentialisateur de l'EDTA. Ce résultat semble confirmer celui obtenu pour l'essai 8.

Nous pouvons constater que le cyanure, à la concentration de 50 µg/l est fortement clastogène vis-à-vis des érythrocytes des larves de tritons. Des images spectaculaires de chromosomes et de cellules à noyau fragmenté ont été couramment observées à cette dose (figure D).

IV-3.3. EFFET D'UN TRAITEMENT DES LARVES A LA VITAMINE C SUR LA GENOTOXICITE DU FER III ET/OU DU CHROME VI (ESSAI 10)

Les résultats de génotoxicité obtenus pour cet essai sont présentés dans le tableau 34.

Le pH initial a été ajustés à 7-7,5 dans tous les lots avec la vitamine C car celle-ci acidifie fortement le milieu. Après 24 heures d'exposition des larves, nous n'avons pas noté de différence entre le pH des lots traités avec et sans vitamine C ; celui-ci était de 6,5-7

En revanche, la concentration en oxygène, mesurée après 24 heures, était fortement diminuée chez tous les lots avec acide ascorbique : la concentration moyenne initiale en oxygène était de 6,0-6,5 mg/l avec vitamine C et de 6,5-7,0 mg/l dans les lots sans vitamine C. Après 24 heures elle était de 2,5-3,0 et 5,5-6,0 mg/l pour les lots avec et sans vitamine C.

En l'absence de traitement par l'acide ascorbique, le fer (0,6 mg/l) s'est révélé légèrement génotoxique ; aucun effet significatif n'a été obtenu avec le chrome (1,0 mg/l). L'effet génotoxique induit par le milieu FeCr (0,6/1,0 mg/l) ne peut pas résulter d'un effet d'interaction en raison de la positivité du fer et de la distribution du nombre de cellules à MN quasiment superposable à celle obtenue avec le fer seul.

Les lots traités par le fer et/ou le chrome en présence d'acide ascorbique (1 g/l) n'ont induit aucun effet clastogène chez les larves de pleurodèle.

La comparaison deux à deux entre les lots traités avec et sans vitamine C révèle un effet protecteur significatif de l'acide ascorbique (Tableau 35) ; cet effet peut sembler faible du fait que les taux de cellules à MN enregistrés pour les lots Fe et FeCr sont eux même peu élevés.

Cette comparaison statistique a été réalisée en prenant les lots avec vitamine C comme référence et en testant l'hypothèse d'un effet clastogène chez les lots non traités par l'acide ascorbique car le test statistique utilisé ne s'applique que pour mettre en évidence une augmentation d'effet par rapport à un lot de référence.

Nous pouvons donc conclure, dans les conditions de l'essai, que l'acide ascorbique a un rôle protecteur.

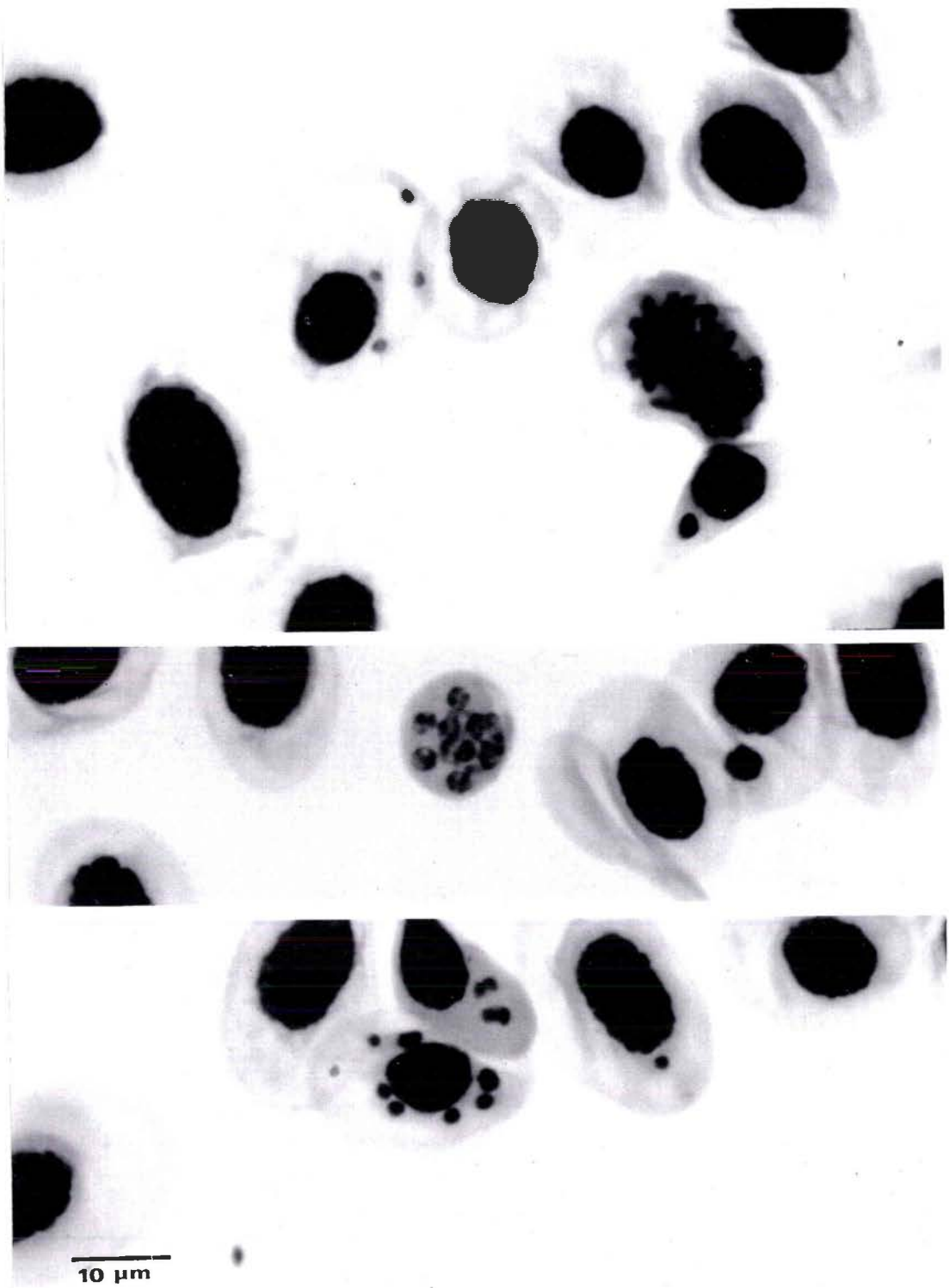


Figure E : Effet clastogène induit chez les larves de pleurodèle exposées pendant 12 jours à un mélange de cyanure ($25 \mu\text{g/l}$) et de fer trivalent ($0,6 \text{ mg/l}$). Le cyanure à $25 \mu\text{g/l}$ n'est pas génotoxique ($\times 1000$, microscopie optique).

IV-3.4. EFFET D'UN TRAITEMENT DES LARVES PAR LE CYANURE SUR L'INDUCTION DE CELLULES A MICRONOYAUX PAR LE FER III ET/OU LE CHROME VI (ESSAIS 11a, b et c)

L'important effet clastogène du cyanure (50 µg/l) que nous avons observé lors de l'essai 9, nous a amené à rechercher une dose sans effet clastogène afin de mieux apprécier d'éventuels effets d'interaction avec le fer et/ou le chrome. Les concentrations de 5 et 25 µg/l en CN⁻ ne se sont pas révélées clastogènes et ont été retenues pour la suite de nos essais.

IV-3.4.1. Essais 11a et 11b

Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableaux 36. Les concentrations en fer(III) et chrome (VI) sont respectivement de 0,6 mg/l et 1 mg/l .

L'additivité des effets de Fe(III) à 0,6 mg/l et Cr(VI) à 1,0 mg/l dans le couple Fe/Cr rapportée au chapitre III semble confirmée par les essais 11a et 11b, en raison d'un effet clastogène significatif du fer (médiane à 7°/∞, essai 11a, et 6°/∞, essai 11b) et/ou du chrome (médiane 8°/∞, essai 11b). Avec le mélange FeIII/CrVI le taux médian d'érythrocytes à MN est de 9°/∞ et de 6°/∞, pour les essais 11a et 11b respectivement. De plus, il apparaît clairement que le taux de cellules à MN induit par le fer et le chrome est significativement plus important chez les larves traitées simultanément par le cyanure ; il est de 10°/∞ pour FeCN25 et de 18°/∞ pour CrCN25 (essai 11a). Dans le cas de l'essai 11b, pour lequel nous avons dû retester les modalités avec cyanure, les résultats obtenus sont indicatifs mais semblent confirmer ceux de l'essai 11a. La figure E illustre l'effet clastogène du fer chez les larves sensibilisées par le cyanure.

Ainsi que nous l'avons précédemment noté, aucun effet clastogène n'est enregistré avec le cyanure aux concentrations de 5 et 25 µg/l.

IV-4 DISCUSSION

Les essais mis en oeuvre dans cette dernière partie de notre travail avaient pour but de nous éclairer sur le mécanisme d'action génotoxique du fer trivalent seul ou associé au chrome hexavalent.

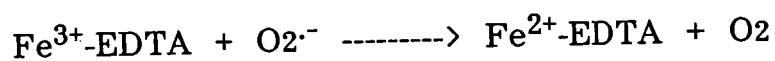
Dans un premier temps nous avons étudié l'effet du fer à la concentration de 12,5 mg/l sur des larves de triton traitées par le NEM (62,6 mg/l soit $5 \cdot 10^{-7}$ M)(essai 8) ou par le cyanure (50 µg/l soit

2.10^{-6} M)(essai 9). Rappelons que le NEM a une forte affinité pour les groupements thiols et qu'il est couramment utilisé pour inhiber l'action des glutathions peroxydase et réductase (Paglia et Valentine 1967, Burk *et al.* 1982) ; ce composé inhibe l'action de ces enzymes en se complexant avec le glutathion réduit.

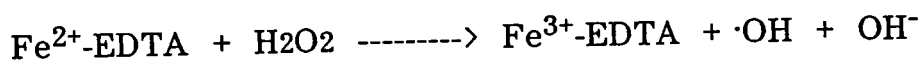
Le cyanure a été utilisé pour inhiber la SOD (Yim *et al.* 1990); il agit en se couplant au cuivre du site actif.

Dans un deuxième temps nous avons étudié l'effet de l'acide ascorbique (1 g/l) et du cyanure (5 et 25 μ g/l) sur la génotoxicité du fer III (0,6 mg/l) et du chrome VI (1 mg/l) associés ou non (essais 10 et 11).

Les essais 8 et 9 n'ont pas permis de confirmer la génotoxicité du fer seul à la concentration de 12,5 mg/l telle que nous l'avions précédemment rapporté (essais 7b et 7c). Pour augmenter la solubilité et la biodisponibilité du fer (le fer à 12,5 mg/l précipite au pH 5,5-6 auquel nous avons réalisé l'essai) nous l'avons complexé par de l'EDTA (en concentration équimolaire). Nous avons choisi ce complexant car Graf *et al.* (1984) ainsi que Gutteridge *et al.* (1990) ont montré que le complexe Fe^{3+} -EDTA en présence de radicaux superoxydes $O_2^{\cdot-}$ (générés *in vitro* par le système hypoxanthine/xanthine oxidase) pouvait conduire à une réaction de Fenton et générer des formes radicalaires capables d'altérer l'ADN. Ce type de réaction est donc susceptible d'augmenter le taux d'érythrocytes à MN des tritons exposés au fer.



réaction de Fenton



Sous certaines conditions le fer ferrique peut donc être amené à l'état de fer ferreux et entrer dans la réaction de Fenton.

Les résultats négatifs obtenus avec les essais 8 et 9 montrent que l'EDTA ne favorise pas la formation d'érythrocytes à MN par le fer, chez les larves de triton. Cependant, nous ne pouvons pas exclure un mécanisme radicalaire du fer sur la base de cet unique résultat. Des essais complémentaires s'avèrent donc nécessaires. Il serait utile de vérifier que l'EDTA augmente réellement la biodisponibilité de ce métal chez le triton.

Lorsque les larves sont traitées par le NEM, celles-ci ne sont pas plus sensible à Fe^{III} ou au complexe Fe -EDTA. Cependant, nous ne savons pas si, à la concentration de 5.10^{-7} M employée dans notre essai, l'activité des glutathions peroxydase et

réductases est suffisamment inhibée pour favoriser l'action génotoxique de peroxyde néoformés. Il serait donc nécessaire de réaliser un dosage de ces enzymes dans les globules rouges des larves de pleurodèle traitées par le NEM pour en connaître le niveau d'activité.

De plus, ce composé serait un antimétabolite (Index MERCK, 1983). Il pourrait donc limiter la croissance des larves de pleurodèle et de ce fait induire un résultat faussement négatif. Cette hypothèse semble pouvoir être écartée dans le cas présent car, nous n'avons pas noté de retard de croissance chez les larves traitées par le NEM, ni de réduction du nombre de mitoses sur les frottis correspondants.

La concentration en cyanure de 50 µg/l, dépourvue de toxicité aiguë, que nous avons initialement choisie pour inhiber l'activité SOD, s'est révélée trop clastogène (médiane à 27°/∞) pour qu'un effet éventuel du fer ou du complexe Fe-EDTA puisse être détecté.

Lors des essais suivants (11a et 11b), entrepris avec des concentrations non clastogènes en cyanure de 5 et 25 µg/l, nous avons pu constater que la clastogénicité du fer et du chrome était potentialisée et que cet effet de synergie augmentait avec la concentration en cyanure.

Dans les érythrocytes de triton, le cyanure n'agit pas uniquement sur la SOD. En effet, de par son affinité pour le fer et le cuivre il peut perturber les réactions d'oxydo-réduction cellulaires :

- au niveau de la chaîne respiratoire en bloquant la réduction de l'oxygène en H₂O par la cytochrome oxydase,

- au niveau du transport de l'oxygène en se fixant à l'hémoglobine de manière irréversible,

- au niveau de la catalase et de la SOD, en se fixant à leur site actif, inhibant ainsi leur rôle protecteur vis-à-vis des espèces actives de l'oxygène.

Il nous est donc difficile de tirer des conclusions quant au mécanisme mis en jeu pour l'expression de la génotoxicité du fer et du chrome chez les larves de pleurodèle traitées par le cyanure. Seule une étude biochimique fine, par dosage de la SOD, de la catalase, de la cytochrome oxydase en particulier pourrait nous renseigner sur l'origine des perturbations engendrées qui favorisent l'action clastogène de ces métaux.

L'acide ascorbique est connu pour ses propriétés antioxydantes et pour participer à la réduction du chrome hexavalent en chrome trivalent (Hamilton et Wetterhahn 1986, Suzuki 1988, Standeven et Wetterhahn 1991a), étape nécessaire à l'expression de la génotoxicité de ce métal (Garcia et Jenette 1981, Standeven et Wetterhahn 1989, Aiyar *et al.*

1991, Aiyar *et al.* 1992). Ces dernières années, des études ont démontré l'implication de l'ascorbate dans la réduction du chrome VI par certains systèmes biologiques.

Suzuki (1988) a identifié l'ascorbate comme le réducteur principal du chrome hexavalent dans le liquide de lavage pulmonaire de rat. Cet auteur suggère que la réduction du chrome VI en chrome III par l'ascorbate au niveau de la cavité pulmonaire pourrait protéger les cellules contre la pénétration de l'ion chromate.

Plus récemment Standeven et Wetterhahn (1991) ont montré que la vitamine C était le réducteur principal de CrVI dans des ultrafiltrats de foie et de rein de rat.

L'essai réalisé avec des larves traitées par l'acide ascorbique (1 g/l) a montré un effet protecteur significatif de la vitamine C contre l'action clastogène du fer et du couple fer-chrome, bien que le taux de cellules à MN enregistré pour ces derniers en l'absence de vitamine C soit faible.

Wise *et al.* (1993) ont montré que la clastogénicité du chromate de plomb, $PbCrO_4$, chez les cellules CHO était inhibée lorsque celui-ci était ajouté au milieu en présence de vitamine C ; l'acide ascorbique provoque la réduction de CrVI en CrIII, incapable de franchir la membrane cellulaire.

Il est donc possible que le fer et le chrome aient été réduits par l'acide ascorbique, dans le milieu d'élevage, empêchant ainsi leur pénétration dans les érythrocytes. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par le dosage du fer III et du chrome VI dans le milieu d'élevage avec et sans vitamine C.

Cet effet protecteur de l'acide ascorbique apparaît opposé aux résultats de Shneider *et al.* (1988). En effet, ces auteurs ont montré que le couple ascorbate/fer produisait, *in vitro*, des radicaux $\cdot OH$ responsables de cassures sur ADN isolé. L'induction des cassures est inhibée à la fois par le manitol (capteur de $\cdot OH$) et par l'acide diéthylènetriamine pentaacétique (complexant du fer). De plus, l'induction des cassures de l'ADN par le système ascorbate/fer est strictement oxygène dépendant. En effet, aucune cassure n'a été mise en évidence par Shneider *et al.* (1988) lorsque le milieu réactionnel était dépourvu d'oxygène.

Nous avons rapporté que la concentration en oxygène des flacons avec vitamine C était très faible (2,5 mg/l environ). Ce facteur pourrait donc avoir eu un effet limitant dans l'essai que nous avons réalisé.

Cette dernière partie de notre travail vient ajouter à la connaissance de la génotoxicité du fer III et du chrome VI vis-à-vis des larves de triton.

Il apparaît que la réponse de ces organismes mis en contact avec ces métaux est inconstante et vraisemblablement liée à la variabilité des capacités métaboliques ou des conditions physiologiques des lots de larves. Les résultats des essais supplémentaires effectués en présence de

fer ou de chrome montrent que FeIII et CrVI peuvent à eux seuls induire la formation de micronoyaux (essais 10, 11a et 11b). De ce fait, la génotoxicité du couple FeIII/CrVI (0,6/1mg/l), observée dans les essais 6a et 6b, ne peut être attribuée à un effet d'interaction entre ces métaux mais plutôt à une additivité de leurs effets.

Par ailleurs, il est intéressant de souligner que les concentrations en cyanure (5 et 25 µg/l) et en fer (0,6 mg/l) utilisées dans les essais 11a et 11b sont inférieures aux limites acceptables pour les rejets industriels, soit 100 µg/l et 5 mg/l pour le cyanure et le fer respectivement ; cela pose à nouveau le problème des effets d'interaction non pris en compte par les normes de rejet établies à partir d'essais effectués sur des composés isolés.

IV-5 CONCLUSION

Les essais que nous avons entrepris pour vérifier si l'action génotoxique du fer et du chrome pouvaient s'expliquer par l'induction d'un stress oxydant ont apporté des éléments nouveaux à la connaissance du comportement des larves de pleurodèle face à ces métaux. En effet, l'augmentation du taux d'érythrocytes à MN induit par le fer ou le chrome en présence de cyanure (lequel bloque les réactions d'oxydo-réduction cellulaires), ou l'effet protecteur de l'acide ascorbique (qui est un réducteur) nous confortent dans notre hypothèse de l'induction d'un stress oxydant par le fer et/ou le chrome.

De plus, les essais réalisés soulignent la difficulté de transposer des techniques appliquées *in vitro* (telle que l'inhibition de la SOD ou des glutathion peroxidases et réductase), où il est possible de contrôler les paramètres étudiés, à des organismes vivants pour lesquels il nous sera beaucoup plus difficile de maîtriser l'effet recherché.

CONCLUSION GENERALE et PERSPECTIVES

Le rejet de molécules à caractère mutagène et cancérigène dans notre environnement et ses conséquences à long terme pour la stabilité des écosystèmes et la santé humaine a conduit à une prise de conscience de la communauté scientifique et des autorités compétentes.

Depuis une vingtaine d'années, les travaux pour tenter d'évaluer ou de prévoir l'impact de tels rejets sur notre environnement se sont multipliés. Les méthodes d'essais mises en oeuvre pour l'étude de la génotoxicité des milieux environnementaux hydriques complexes sont nombreuses et souvent calquées sur les essais utilisés pour l'étude de la génotoxicité sur mammifères. Peu de tests *in vivo* ont été développés sur des modèles relevant des systèmes hydriques.

Les essais recensés sont le plus souvent des essais *in vitro* sur bactéries (test d'Ames) ou cellules eucaryotes (cellules CHO). Cependant, un souci croissant d'évaluer au mieux l'impact des rejets complexes et, de se rapprocher des conditions de l'environnement a conduit au développement d'essais *in vivo* sur organisme entier.

Il nous est donc apparu nécessaire de dresser un bilan des avantages et des inconvénients des nombreuses méthodes d'essai disponibles et, de sélectionner les mieux appropriées à l'environnement hydrique.

L'analyse bibliographique réalisée au début de ce travail souligne l'intérêt d'utiliser en parallèle, un test *in vitro* tel que le test d'Ames ou un essai sur cellules eucaryotes (mammifères, poissons) et un test *in vivo* sur triton ou sur la moule marine. Les essais *in vitro* sont intéressants pour le dépistage en série, et les tests *in vivo* pour leur plus grande représentativité. Cette stratégie, nous l'avons appliquée à l'étude de la génotoxicité d'effluents complexes.

Nous avons retenu d'une part le test d'Ames car il est classiquement utilisé en "screening" et qu'il a déjà prouvé son intérêt pour des études environnementales et d'autre part le test triton pour sa pertinence liée (1) au modèle biologique utilisé (2) aux conditions d'exposition se rapprochant des conditions environnementales.

Les travaux de Jaylet *et al.* (1986 et 1987) ont mis en évidence la bonne sensibilité des larves de pleurodèle à détecter des composés génotoxiques cependant ce test est encore peu employé pour l'étude de la génotoxicité des effluents complexes.

Notre objectif était donc d'étudier les performances de ce test par rapport à celles du test d'Ames, dans le cadre du contrôle ou du suivi de la génotoxicité d'effluents complexes.

Cette évaluation a été réalisée à partir d'effluents issus de l'industrie chimique (échantillons C, EI et EII), de l'industrie du papier (échantillon D) et de la métallurgie (échantillons BI, BII, BIII). L'échantillon A a été prélevé à l'entrée d'une station d'épuration urbaine.

Les échantillons étudiés ont été testés bruts ou dilués (test d'Ames et test triton) et après extraction et concentration des polluants (test d'Ames).

Le test micronoyau sur larves de pleurodèle s'est révélé un outil de choix pour l'étude de la génotoxicité des effluents complexes.

Il a permis de mettre en évidence la génotoxicité de six effluents, testés bruts ou dilués, sur les huit étudiés : BI, BIIentrée, BIII (traitement de surface), C, EI et EII (chimie). Le test d'Ames a permis lui aussi de détecter la présence de micropolluants mutagènes dans les effluents BI et BIII (bruts) ; il s'est révélé spécifiquement sensible à l'effluent de papeterie (D) après extraction organique et concentration des polluants.

Ces résultats soulignent l'intérêt du test micronoyau sur pleurodèle. Il est applicable à des échantillons bruts ou dilués dans des conditions d'exposition proches de celles de l'environnement. Au contraire, le test d'Ames demande le plus souvent une préconcentration des micropolluants pour détecter leur potentiel génotoxique. Nos résultats montrent également que le spectre de sensibilité d'un essai n'est jamais suffisamment large pour faire face à toutes les situations ; ceci vient étayer une recommandation classique en toxicologie d'utiliser des essais complémentaires plutôt qu'un seul essai.

Dans le cadre d'une stratégie d'étude de la génotoxicité des effluents complexes, nous proposerions la démarche suivante consistant à :

1°) dans une première étape tester par le test d'Ames l'extrait organique et le lyophilisat des échantillons. Il n'est pas nécessaire de tester l'échantillon brut car celui-ci répond généralement négativement sur Ames.

2°) dans une deuxième étape, tester sur triton les échantillons non mutagènes sur Ames.

Cette démarche présente l'avantage d'être performante tout en satisfaisant aux contraintes économiques de limiter le coût des essais.

Tableau 37 : Bilan des résultats de génotoxicité obtenus avec le test d'Ames et du test triton pour les métaux fer, chrome et zinc.

Essais	AMES		TRITON										
	I	II	2	3		4	5		6		7		
				a	b		a	b	a	b	c		
Eléments et concentrations étudiés	Fe 2.5 CrVI 1-5 Zn 1	Fe 50 CrIII 5.5-50 Zn 1	CrIII 0.1 à 5	CrVI 0.1 à 5	0.01 à 10	Zn 0.01 à 10	Fe 0.5 à 13.5	13.5*	Fe 0.6 CrVI 1 Zn 0.75	Fe 50 puis 25 CrIII 5 puis 2.5 Zn 1.5 puis 0.75	12.5 2.5 0.75	25 2.5 0.75	12.5 2.5 0.75
Fe	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
CrIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
CrVI	+	(5)	-	+	-	(0.1)	-	-	+	+	-	-	-
Zn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe Zn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Fe CrIII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Fe CrVI	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
CrIII Zn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CrVI Zn	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fe CrIII Zn	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
Fe CrVI Zn	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Notes : Les concentrations sont exprimées en µg/boîte pour le test d'Ames et en mg/l pour le test triton. * concentration dont le précipité a été filtré.
() concentration positive.

Par ailleurs les qualités du test micronoyau triton peuvent encore être améliorées sur le plan technique par :

1°) le renouvellement un jour sur deux du milieu d'essai, au prix cependant d'une légère perte de sensibilité

2°) l'automatisation de la lecture des frottis.

Il est apparu que la réponse des lots de larves au B(a)P était variable, celle-ci traduisant une différence de capacités métaboliques des organismes. Dans ces conditions, il semblerait judicieux d'introduire, dans la réalisation du test, un deuxième contrôle positif constitué par un composé mutagène direct.

Un autre point, indépendant de la sensibilité des organismes, est la variabilité des résultats liée à la lecture des frottis. Cette variabilité étant due à la répartition non homogène des cellules à micronoyau sur le frottis.

Dès lors, l'amélioration qui nous semble prioritaire, est la mise au point de la lecture automatisée des frottis. Cette solution permettrait non seulement d'améliorer la précision des résultats en augmentant le nombre de cellules comptées, mais aussi de réduire le coût de réalisation du test. En attendant, le compromis que nous proposons est de compter les frottis témoins en triplicat pour cerner au mieux l'intervalle de confiance et de se reporter à l'examen des données brutes lorsque les conclusions sont ambiguës.

Connaître les potentialités génotoxiques d'un effluent est une information importante mais elle est encore plus intéressante si l'on peut en établir les causes. L'identification du ou des composés responsables de l'effet observé permettrait d'assurer une meilleure prévention et de mettre en oeuvre les traitements d'épuration adéquats. Seule l'association entre analyse toxicologique et physico-chimique peut aboutir à ce résultat.

C'est ce que nous avons réalisé pour tenter d'expliquer la génotoxicité des effluents BIIentrée, BI et BIII qui contenaient des métaux tels que le fer, le chrome III et VI et le zinc. Les hydrocarbures aromatiques (benzène, xylène et toluène) identifiés dans l'effluent BIII ont été mis hors de cause aux dilutions testées.

Nous avons résumé l'ensemble des résultats des essais de génotoxicité sur métaux dans les tableaux 37 et 38. Il apparaît que le fer est clastogène chez le triton aux concentrations testées de 0,6 et 12,5 mg/l ; les effets du chrome III et du chrome VI sont moins évidents.

Tableau 38: Bilan des résultats des essais sur triton réalisés dans le cadre de l'étude préliminaire du mécanisme d'action génotoxique du fer et du chrome chez le triton.

Essai	TRITON							
	8		9		10		11	
							a	b
Eléments et concentrations étudiés	Fe 12.5 EDTA 81.9 NEM 0.062	Fe 12.5 EDTA 81.9 CN 0.05	Fe 0.6 CrVI 1 VitC 1000	Fe 0.6 CrVI 1 CN 0.005	0.6 1 0.025	0.6 1 0.025	0.6 1 0.005	0.6 1 0.025
Fe	-	±	+	+				+
CrVI			-	-				+
NEM	-							
EDTA	-	-						
CN		+++			-	-	-	-
VitC			-					
EDTA NEM	-							
Fe EDTA	-	+						
Fe NEM	-							
Fe CN		+++			+	++	+	++
Cr CN					+	++	+	+
Fe VitC			-					
CrVit C			-					
Fe Cr			+			+		+
Fe EDTA NEM	-							
Fe EDTA CN								
Fe Cr CN					+	+	++	++
Fe Cr VitC			-					

Notes : Les concentrations sont exprimées en mg/l. ± résultat à la limite de la positivité

Des résultats positifs n'ont été trouvés qu'une fois sur trois environ aux concentrations de 2,5 mg/l pour CrIII et de 1 mg/l pour CrVI.

Sur la base des résultats du test triton, il semble que la génotoxicité de l'effluent BIIentrée (positif sur triton et négatif avec Ames) contenant du chrome III (10 mg/l) et du fer en forte concentration (105 mg/l) puisse être attribuée en majeure partie au fer III. En revanche, les propriétés clastogènes des effluents BI et BIII (positif sur Ames et triton), contenant principalement du fer (10 à 20 mg/l) et du chrome VI (20 à 40 mg/l), nous semblent s'expliquer par l'additivité des effets de ces métaux.

Une certaine variabilité apparaît dans la réponse des larves à la génotoxicité du fer et du chrome. Ainsi, lorsqu'une réponse est obtenue pour Fe III et Cr VI un effet d'interaction entre ces métaux peut être observé. C'est ce que nous avons obtenu pour la modalité FeCr de l'essai 6a.

Cette variabilité de réponse des larves peut vraisemblablement être imputée à l'état physiologique et à des conditions métaboliques qui peuvent différer selon les lots d'organismes.

Dès lors, lorsqu'un effet d'interaction est mis en évidence entre FeIII (0,6 mg/l) et CrVI (1 mg/l) celui-ci n'est peut-être que le reflet de la génotoxicité du fer qui s'exprimerait d'autant plus facilement que les organismes sont sensibilisés par l'action conjointe d'une autre substance toxique.

Cette hypothèse est fortement appuyée par le fait que la génotoxicité du fer s'exprime pleinement lorsque les larves sont sensibilisées par l'action du cyanure à des concentrations non clastogènes (5 et 25 µg/l).

Actuellement, la législation sur les rejets industriels réglemente les niveaux de concentration du fer et du chrome. Les normes de rejet de ces métaux dans les effluents épurés sont de 5 mg/l pour Fe et 0,1 mg/l pour CrVI. Les niveaux de cyanure sont également réglementés et limités à 100 µg/l. Il est intéressant de souligner que les concentrations en cyanure (5 et 25 g/l) et en fer (0,6 mg/l) que nous avons utilisées dans nos essais sont très inférieures aux limites réglementaires.

Ces normes, établies à partir de données analytiques, se limitent à fixer des niveaux de concentrations acceptables pour l'environnement, mais ne tiennent pas compte des associations de polluants.

Or, nos résultats montrent qu'un métal tel que le fer, dont on considère qu'il ne présente pas de risques majeurs pour l'environnement, peut devenir problématique lorsqu'il se trouve associé à du chrome hexavalent ou du cyanure, et plus généralement à des composés

susceptibles de modifier les systèmes redox et le métabolisme cellulaire de l'oxygène.

La mise en évidence de propriétés génotoxiques propres au fer vient s'ajouter aux questions actuelles des hygiénistes et toxicologistes sur la réelle innocuité de ce métal.

Il est évident que les effets d'interaction qui peuvent être révélés par les essais biologiques devront être pris en compte, au cours des décennies à venir, pour l'établissement des normes de rejet. Un réel effort de recherche devra être fait dans ce sens pour définir quelles associations de polluants sont à éviter.

Nous pensons que la clastogénicité du fer et du couple fer/chrome peut être liée à l'induction d'un stress cellulaire oxydant. Les résultats des essais mis en oeuvre avec ces métaux en présence de cyanure, inhibiteur de la SOD et d'autres enzymes intervenants dans des réactions d'oxydo-réduction, nous ont conforté dans notre hypothèse. Cependant les mécanismes réellement impliqués dans la génotoxicité du fer sont vraisemblablement multiples et de toute évidence difficiles à identifier.

En effet, nous nous attachons, actuellement, à mesurer l'activité SOD des érythrocytes des larves de triton exposées au couple fer/chrome et/ou au cyanure. Cependant, la mise au point de la technique de dosage de la SOD se heurte au problème du très faible volume de sang (10 à 20 μ l) qui peut être prélevé sur chaque larve.

Les résultats que nous avons obtenus tout au long de notre travail nous ouvrent des perspectives de recherche intéressantes qui se situent à deux niveaux, fondamentale et appliqué :

◆ Afin de mieux comprendre les mécanismes de génotoxicité mis en jeu par ces métaux et par le fer en particulier, deux voies de recherche peuvent être développées :

- l'utilisation de fer et de chrome radioactif pour évaluer la pénétration de ces métaux dans les érythrocytes des larves et leur pénétration au niveau nucléaire.

- le dosage des activités SOD, glutathions peroxydase et réductase ainsi que l'activité de la catalase dans les érythrocytes des larves exposées au fer et au chrome avec ou sans inhibiteurs enzymatiques.

◆ En vue d'améliorer les performances du test triton, il serait utile de poursuivre l'élaboration du logiciel de numération des frottis par analyse d'image.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR, NF T 90305, 1985. Essais des eaux : détermination de la toxicité aiguë d'une substance vis-à-vis de *Salmo gairdneri*. Association Française de Normalisation (AFNOR).

AFNOR, NF T 90112, 1986. Essais des eaux : dosage de dix éléments métalliques (Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ag, Cd, Pb) par spectrométrie d'absorption atomique dans la flamme. Méthode de dosage directe et après complexation et extraction. Association Française de Normalisation (AFNOR)

AFNOR, NF T 90325, 1987. Essais des eaux : détection en milieu aquatique de la génotoxicité d'une substance vis-à-vis de batraciens, *pleurodeles waltl* et *Ambystoma mexicanum* : Essai des micronoyaux. Association Française de Normalisation (AFNOR).

AIYAR J., De FLORA S., WETTERHAHN E., 1992. Reduction of chromium (VI) to chromium (V) by rat liver cytosolic and microsomal fractions : is DT-diaphorase involved ? *Carcinogenesis*, 13(7), 1159-1166.

AIYAR J., BERKOVITZ H.J., FLOYD R.A., WETTERHAHN K.E., 1991. Reaction of chromium (VI) with glutathion or with hydrogen peroxide : identification of reactive intermediates and their role in chromium(VI)-induced DNA damage. *Environ. Health Perspect.*, 92, 53-62.

ALINK J.M., FREDERIX-WOLTERS E.M.H., VAN der GAAG M.A., VAN de KERKHOFF, POELS C.L.M., 1980. Induction of sister-chromatid exchanges in fish exposed to Rhine water. *Mutation Res.*, 78, 369-374.

Al SABTI K., KURELEC B., 1985. Induction of chromosomal aberrations in the mussel *Mytilus galloprovincialis* Watch. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35, 660-665.

ATHANASIOU K., KYRTOPOULOS S.A., 1983. Mutagenic and clastogenic effects of organic extracts from the Athenian drinking water. *Sci. Total Environ.*, 27, 113-120.

BABICH H., BORENFREUND E., 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells : a review. *Toxic. in vitro*, 5(1), 91-100.

BABISH J.G., JOHNSON B.E., LISK D.J., 1983. Mutagenicity of municipal sewage sludges of american cities. *Environ. Sci. Technol.*, 17, 272-277.

BELLAR T.A., LICHTENBERG J.J., KRONER R.C., 1974. The occurrence of organohalides in chlorinated drinking water. *J. Amer. Water Works Assn.*, 66, 703-706.

- BENNICELLI C., CAMOIRANO A., PETRUZZELLI S., ZANACCHI P., De FLORA S., 1983. High sensitivity of Salmonella TA 102 in detecting hexavalent chromium mutagenicity and its reversal by liver and lung preparation. *Mutation Res*, 122, 1-5.
- BIANCHI V., CELOTTI G., LANFRANCHI F., MAJONE F., MARIN G., MONTALDI A., SPONZA G., TAMINO G., VENIER P., ZANTEDESCHI A., LEVIE A., 1983. Genetic effects of chromium compounds. *Mutation Res*, 117, 279-300
- BRUNETTI R., MAJONE F., GOLA I. BELTRAME C., 1988. The micronucleus test : examples of application to marine ecology. *Mar. Ecol.*, 44, 65-68.
- BURK R.F., PATEL K., LANE J., 1982. Comparison of the direct and the coupled assay methods for glutathione peroxidase activity of rat liver. *Nutri. Rep. Int.*, 26, 98-104.
- CARLBERG G., DRANGSHOLT H., GJOS N., 1986. Identification of chlorinated compounds in spent chlorination liquor from differently treated sulphite pulps with special emphasis on mutagenic compounds. *Sci. Total Environ.*, 48, 157-167.
- COUDRAY C., FAURE P., RACHIDI S., JEUNET A., RICHARD M.J., ROUSSELA.M., FAVIER A., 1992. Hydroxyl radical formation and lipid peroxidation enhancement by chromium : *in vitro* study. *Biol. Tr. Element Res.*, 32, 161-170.
- COURTOIS Y., SDIKA A., MAUNOURY M., LOWY R., FESTY B., CABRIDENC R., CHOUROULINKOV I., 1986. Evaluation biologique de la micropollution organique d'eaux destinées à la consommation humaine. *J. Fr. Hydrol.*, 17(2), 101-110.
- DAS R.K., NANDA N.K., 1986. Induction of micronuclei in peripheral erythrocytes of fish *Heteropneustes fossilis* by mitomycin C and paper mill effluent. *Mutation Res.*, 175, 67-71.
- De FLORA S., BIANCHI V., LEVIS A., 1984. Distinctive mechanisms for interaction of hexavalent and trivalent chromium with DNA. *Toxicol. and Environ. Chem.*, 8, 287-294.
- DE KRUIJF H.A.M., KOOL H.J., 1985. Organic micropollutants in drinking water and health. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp 507.
- DE MARINI D.M., PLEWA M.J., BROCKMAN H.E., 1982. Use of four short-term tests to evaluate the mutagenicity of municipal water. *J. Toxicol. Environ. Health*, 9, 127-140.
- DIXON D.R. and CLARKE K.R., 1982. Sister chromatid exchange : a sensitive method for detecting damage caused by exposure to environmental mutagen in the chromosomes of adult *Mytilus edulis*. *Mar. Biol. Let.*, 3, 163-172.
- DONNELLY K.C., BROWN K.W., KAMPBELL D., 1987. Chemical and biological characterization of hazardous industrial waste. I - Prokaryotic bioassays and chemical analysis of a wood-preserving bottom-sediment waste. *Mutation Res.*, 180, 31-42.

- DOUGLAS G.R., NESTMANN E.R., LEBEL G., 1986. Contribution of chlorination to the mutagenic activity of drinking water extracts in Salmonella and Chinese Hamster ovary cells. *Environ. Health Perspect.*, 69 , 81-87.
- ENGL S., PLEWA M.J., HOPKE P.K., 1988. Analysis of the genotoxicity of municipal sewage sludge extracts with sister chromatid exchange in cultured human lymphocytes. *Water, Air and Soil Pollution*, 42 , 117-128.
- FABACHER, D.L., SCHMITT, C.J., BESSER, J.M., MAC, M.J. ,1988. Chemical characterization and mutagenic properties of polycyclic aromatic compounds in sediment from tributaries of the great lakes. *Environ. Toxicol. Chem.*, 7 , 529-543.
- FAUX S.P., GAO M., CHIPMAN J.K., LEVY L.S., 1992. Production of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA by chromium (VI) and chromium (V). *Carcinogenesis*, 13(9), 1167-1169.
- FIESSINGER F., CABRIDENC R., CHOUROULINKOV I, FESTY B., LAZAR P., RICHARD Y., 1981. Influence of prechlorination on the amount and toxicity of micropollutants extracted from water at the Morsang plant, in : *Water chlorination : Environmental impact and health effects*. JOLLEY *et al.* (eds), Ann Arbor Science, p 467-481.
- GALLIEN L., DUROCHER M., 1957. Table chronologique du développement chez *Pleurodeles waltl* MICHAH. *Bull. Biol. Fr. Belg.*, 91, 97-114.
- GARCIA J., JENNETTE K., 1981. Electron-transport cytochrome P-450 system is involved in the microsomal metabolism of the carcinogen chromate. *J. Inorganic Biochem.*, 14, 281-295.
- GEE P., SAN R., DAVISON A., STICH H.F., 1992. Clastogenic and mutagenic actions of active species generated in the 6-hydroxydopamine/oxygen reaction : effects of scavengers of active oxygen, iron, and metal chelating agents. *Free Rad. Res. Comms.*, 16(1), 1-10.
- GLASER U., HOCHRAINER D., KLÖPPEL H., OLDIGES H., 1986. Carcinogenicity of chromium dichromate and chromium (VI/III) oxide aerosols inhaled by male Wistar rats. *Toxicology*, 42, 219-232.
- GOODGAME D., JOY A., 1986. Relative long lived-chromium (V) species are produced by the action of glutathione on carcinogenic chromium (VI). *J. Inorg. Biochem.* 26, 219-224.
- GRAF E., MAHONEY J.R., BRYANT R., EATON J., 1984. Iron-catalysed hydroxyl radical formation : stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.*, 259(6), 3620-3624.

- GRABOW W.O.K., BURGER J.S., HILNER C.A., 1981. Comparison of liquid-liquid extraction and resin adsorption for concentrating mutagens in Ames Salmonella/microsome assays on water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 27, 442-449.
- GREENBERG G., 1976. Sarcoma after intramuscular iron injection. *Br. Med. J.*, 1,1508-1509.
- GUTTERIDGE M., MAIDT L., POYER L., 1990. Superoxide dismutase and Fenton chemistry : reaction of ferric-EDTA and ferric-bipyridil complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II). *Biochem. J.*, 269, 169-174.
- GRUENER N., LOCKWOOD M.P., 1979. Mutagenicity and transformation by recycled water. *J. Toxicol. Environ. Health*, 5 , 663-670.
- HAMILTON J., WETTERHAHN K., 1986. Chromium(VI)-induced DNA damage in chick embryo liver and blood cells *in vivo*. *Carcinogenesis*, 7(12), 2085-2088.
- HANSEN K., STERN R., 1984. A survey of metal-induced mutagenicity *in vitro* and *in vivo*. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 3(6), 381-430.
- HARTWIG A., KLYSZCZ-NASKO H., SCHLEPEGRELL R., BEYERSMANN D., 1993. Cellular damage by ferric nitrilotriacetate and citrate in V79 cells : interrelationship between lipid peroxidation, DNA strand breaks and sister chromatid exchanges. *Carcinogenesis*, 14(1), 107-112.
- HARWOOD M., BLAISE C., COUTURE P., 1989. Algal interactions with the genotoxic activity of selected chemicals and complex liquid samples. *Aquat. Toxicol.*, 14, 263-276.
- HEARTLEIN M.W., DeMARINI D.M., KATZ A.J., MEANS J.C., PLEWA M.J., BROCKMAN H.E., 1981. Mutagenicity of municipal water obtained from an agricultural area. *Environ. Mutagenesis*, 3, 519-530.
- HOLMBOM B., VOSS R.H., MORTIMER R.D., WONG A., 1984. Fractionation, isolation, and characterization of Ames mutagenic compounds in kraft chlorination effluents. *Environ. Sci. Technol.*, 18 (5) , 333-337.
- HOOFTMAN R.N., 1981. The induction of chromosome aberrations in *Nothobranchius rachowi*, pisces cyprinodontidae, after treatment with ethyl methanesulphonate or benzo(a)pyrene. *Mutation Res.*, 91, 347-352.
- HOOFTMAN R.N., VINK G.J., 1981. Cytogenetic effects on the eastern mudminnow, *Umbra pygmaea*, exposed to ethyl methanesulfonate, benzo(a)pyrene and river water. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 5, 261-269.
- HORTH H., 1990. Identification of mutagens in drinking water. *J. Fr. Hydrol.*, 21(1), 135-145.

- HOSE J.E., CROSS J.N., SMITH S.G., DIEHL D., 1987. Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites of southern California. *Marine Environ. Res.*, 22, 167-176.
- HOWARD W., HOFFMAN S., KOCHHAR T., 1992. Enhanced production of micronuclei by hexavalent chromium in cultered CHO cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 49, 535-540.
- INDEX MERCK : an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals, 1983. Windholtz (ed.), 10^{ème} édition.
- JAYLET A., DEPARIS P., GASCHIGNARD D., 1986. Induction of micronuclei *in vivo* after exposure to mutagenic agents. *Mutagenesis*, 1, 211-215.
- JAYLET A., GAUTIER L , FERNANDEZ M, 1987. Detection of mutagenicity in drinking water using a micronucleus test in newt larvae (*Pleurodeles waltl*). *Mutagenesis*, 2(3), 211-214.
- JAYLET A., DEPARIS P., FERRIER V., GRINFIELD S., SIBOULET R., 1986. A new micronucleus test using peripheral blood erythrocytes of the newt *Pleurodeles waltl* to detect mutagens in fresh-water pollution. *Mutation Res.*, 164, 245-257.
- KAWANISHI S., INOUE S.,SANO S., 1986. Mechanism of DNA cleavage induced by sodium chromate(VI) in the presence of hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 261(13), 5952-5958.
- KENSLER T., TRUSH M., 1985. Oxygen free radicals in chemical carcinogenesis, in : *Superoxide dismutase* - Volume III, L. OBERLEY (ed), CRC press, 191-236.
- KLEIN C., FRENKEL K., COSTA M., 1991. The role of oxidative processes in metal carcinogenesis. *Chem. Res. Toxicol.*, 4, 592-604.
- KOCAN R.M., POWELL D.B., 1985. Anaphase aberration : an *in vitro* test for assessing the genotoxicity of individual chemicals and complex mixtures, in : *Short-term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV*, M.D. WALLEN, S. SANDHU (eds.), 75-86.
- KORTENKAMP A., CURRAN B., O'BRIEN P., 1992. Defining conditions for the efficient *in vitro* cross-linking of proteins to DNA by chromium(III) compounds. *Carcinogenesis*, 13(2), 307-308.
- KURELEC B, CHACKO M , GUPTA R, 1988. Postlabeling analysis of carcinogen-DNA adducts in mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.*, 24, 317-320.

- KURELEC B, GARG A, KRCA S , GUPTA R, 1990. DNA adducts in marine mussel, *Mytilus galloprovincialis* living in polluted and unpolluted environments, in : *Biomarkers of Environmental Contamination*, Mc CARTHY J and SHUGART L, Eds (Lewis Publishers), 217-227.
- LASKEY J., WEBB I., SCHULMAN H., PONKA P., 1988. Evidence that transferrin supports cell proliferation by supplying iron for DNA synthesis. *Exp. Cell Res.*, 176, 87-95.
- LECOINTE P., 1984. Induction of the SFIA SOS repair function by psoralens in the dark. *Mutation Res.*, 131, 111-113.
- LEVY S., VENITT S., 1986. Carcinogenicity and mutagenicity of chromium compounds : the association between bronchial metaplasia and neoplasia. *Carcinogenesis*, 7(5), 831-835.
- LIEBROSS R.H., WETTERHAHN K.E., 1992. *In vivo* formation of chromium(V) in chick embryo liver and red blood cells. *Carcinogenesis*, 13(11), 2113-2120.
- MAJONE F., BELTRAME C., BRUNETTI R., 1988. Frequencies of micronuclei detected on *Mytilus galloprovincialis* by different staining techniques after treatment with zinc chloride. *Mutation Res.*, 209, 131-134.
- MAJONE F., BRUNETTI R., GOLA I., LEVIS A.G., 1987. Persistence of micronuclei in the marine mussel, *Mytilus galloprovincialis* after treatment with mitomycin C. *Mutation Res.*, 191, 157-161.
- MARON D , AMES B, 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113, 173-215.
- MARUOKA S., YAMANAKA S., YAMAMOTO Y., 1985. Mutagenic activity in organic concentrate from NISHITAKASE river water in KYOTO city and its fractions separated by using liquid-liquid fractionation and thin layer chromatography. *Water Res.*, 19(2) , 249-256.
- MARZIN D., VO PHI H., 1985. Study of the mutagenicity of metal derivatives with *Salmonella typhimurium*. *Mutat. Res.*, 155, 49-51.
- MASFARAUD J.F., DEVAUX A., PFOHL-LESZKOWICZ A., MALAVEILLE C., MONOD G., 1992. DNA adduct formation and 7-ethoxyresorufine O-deethylase induction in primary culture of rainbow trout hepatocytes exposed to benzo(a)pyrene. *Toxicol. in vitro*, 6 (6), 523-531.
- Mc CARTHY J, JACOBSON D, SHUGART L and JIMENES B, 1989. Pre-exposure to 3-methylcholanthrene increases benzo(a)pyrene adducts on DNA of bluegill sunfish. *Mar. Environ. Res.*, 28, 323-328.

- Mc GILL R., TUKEY J., LARSEN W., 1978. Variation of box plot. *American Stat.* 32(1), 12-16.
- MELLO FILLO A., MENEGHINI R., 1984. *In vivo* formation of single-strand breaks in DNA by hydrogen peroxide is mediated by the Haber-Weiss reaction. *Biochem. Biophys. Acta*, 781, 56-63.
- NAKAMURO K., YOSHIKAWA K., SAYATO Y., KURATA H., 1978. Comparative studies of chromosomal aberration and mutagenicity of trivalent and hexavalent chromium. *Mutat. Res.*, 58, 175-181.
- NAZAR M.A., RAPSON W., 1980. Elimination of the mutagenicity of bleach plant effluents. *Pulp and Paper Canada*, 81(8), 191-196.
- O'BRIEN P., BARRETT J., SWANSON F., 1985. Chromium(V) can be generated by reduction of chromium(VI) by glutathione. *Inorg. Chem. Acta.*, 108, 19-20.
- O'CONNOR B., KOVACS T., VOSS R., 1992. The effect of wood species composition on the toxicity of simulated mechanical pulping effluent. *Environ. Toxicol. and Chem.*, 11, 1259-1270.
- PAGLIA D., VALENTINE W., 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 70(1), 58-169.
- PESH C.G., PESH C.E., MALCOM A.R., 1981. *Neanthes arenaceodentata*, a cytogenetic model for marine genetic toxicology. *Aquat. toxicol.*, 1, 301-311.
- PLEWA M.J., 1984. Plant genetic assays to evaluate complex environmental mixtures, in : *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures IV*. M.D. WATERS ed. Plenum Press, New York and London, pp 45-64.
- PREIN A.E., THIE G.M., ALINK G.M., KOEMAN J.H., 1978. Cytogenetic changes in fish exposed to water of the river Rhine. *Sci. Total Environ.*, 9, 287-291.
- QUILLARDET P., HUISMAN O., D'ARI R., HOFNUNG M., 1982. SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 79, 5971-5975.
- RAM N.M., CALABRESE E.J., CHRISTMAN R.F., 1986. Organic carcinogens in drinking water : Detection, treatment and risk assessment. Wiley-Interscience, New York, pp 542.
- RANDERATH K., REDDY M.V., GUPTA R.C., 1981. ³²P-labeling test for DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6126-6129.
- RANNUG U., JENSSEN D., RAMEL C., 1981. Mutagenic effects of effluents from chlorine bleaching pulp. *J. Toxicol. Envir. Health*, 7, 33-47.

- ROBERTSON A., DICK W., 1977. Intramuscular iron and local oncogenesis. *Br. Med. J.*, 1, 946.
- ROOK J.J., 1974. Formation of haloforms during chlorination of natural waters. *J. Soc. Treat. Exam.*, 23, 234-243.
- SAKURAI K., HAGA K., OGISO T., 1992. Effect of glutathione on deoxyribonucleic acid strand breaks in the reaction system of glutathione-alloxan in the presence of Fe^{3+} -ethylenediaminetetraacetic acid. *Chem. Pharm. Bull.*, 40(8), 2147-2150.
- SALNIKOV K., ZHITKOVITCH A., COSTA M., 1992. Analysis of the binding sites of chromium to DNA and protein *in vitro* and in intact cells. *Carcinogenesis*, 13(12), 2341-2346.
- SCARPATO R., MIGLIORE L., ALFINITO-COGNETI G., BARALE R., 1990. Induction of micronuclei in gill tissue of *Mytilus galloprovincialis* exposed to polluted marine waters. *Mar. Poll. Bull.*, 21(2), 74-80.
- SEHLMAYER U., HECHTENBERG S., KLYSZCZ H., BEYERSMANN D., 1990. Accumulation of chromium in chinese hamster V79-cells and nuclei. *Arch. Toxicol.*, 64, 506-508.
- SHARMA A., TALUKDER G., 1987. Effects of metal on chromosomes of higher organisms. *Environ. Muta.*, 9, 191-226.
- SHINDO Y., TOYODA Y., KAWAMURA K., KUREBE M., SHIMADA H., HATTORI C., SATAKE S., 1989. Micronucleus test with potassium chromate(VI) administered intraperitoneally and orally to mice. *Mutat. Res.*, 223, 403-406.
- SHNEIDER J., BROWNING M., FLOYD A., 1988. Ascorbate/Iron mediation of hydroxyl free radical damage to PBR322 plasmid DNA. *Free Radic. Biol. Med.*, 5, 287-295.
- SHUGART L., Mc CARTHY J., JIMENES B., DANIELS J., 1987. Analysis of adducts formation in the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, between benzo(a)pyrene and DNA of the liver and hemoglobin of the erythrocytes. *Aquatic Toxicology*, 9, 319-325.
- SIEGERS C., BUMANN D., TREPKAU H., SWADWINKEL B., BARETTON G., 1991. Role of iron in cell proliferation and tumorigenesis, in : *Chemically induced cell proliferation : implications for risk assessment*, Wiley-Liss, Inc, p 439-444.
- SLOOFF W., VAN KREIJL C.F., 1982. Monitoring the rivers Rhine and Meuse in the Netherlands for mutagenic activity using the Ames test in combination with rat or fish liver homogenates. *Aquat. Toxicol.*, 2, 89-98.
- STANDEVEN A., WETTERHAHN K.E., 1989. Chromium(VI) toxicity : uptake, reduction, and DNA damage. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8(7), 1275-1283.

- STANDEVEN A., WETTERHAHN K.E., 1991a. Ascorbate is the principal reductant of chromium(VI) in rat liver and kidney ultrafiltrates. *Carcinogenesis*, 12(9), 1733-1737.
- STANDEVEN A., WETTERHAHN K.E., 1991b. Is there a role for reactive oxygen species in the mechanism of chromium(VI) carcinogenesis? *Chem. Res. Toxicol.*, 4(6), 616-625.
- STEINHOFF D., MOHR U., HAHNEMANN S., 1991. Carcinogenesis studies with iron oxides. *Exp. Pathol.*, 43, 189-194.
- STEVENS R., BEASLEY R.P., BLUMBERG B.S., 1986. Iron-binding proteins and risk of cancer in Taiwan. *J. Natl. Cancer Inst.*, 76(4), 605-610.
- SUGIYAMA M., TSUZUKI K., HARAMAKI N., 1993. DNA single-strand breaks and cytotoxicity induced by sodium chromate(VI) in hydrogen peroxide-resistant cell lines. *Mutat. Res.*, 299, 95-102.
- SUSSMAN H., 1992. Iron in cancer. *Pathobiology*, 60, 2-9.
- SUTTON H., WINTERBOURN C., 1989. On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions. *J. Free Radicals Biol. Med.*, 6, 53-60.
- SUZUKI Y., 1988. Reduction of hexavalent chromium by ascorbic acid in rat lung lavage fluid. *Arch. Toxicol.*, 62, 116-122.
- TAETLE R., RHYNER K., CASTOGNOLA J., TO D., MENDELSON J., 1985. Role of transferrin receptors in myeloid leukemia cell growth. *J. Clin. Invest.* 75, 1061-1067.
- THELANDER L., REICHARD P., 1979. Reduction of ribonucleotides. *Ann. Rev. Biochem.*, 48, 133-158.
- THOMPSON E., Mc DERMOTT J., ZERKLE T., SHARE J., EVANS B., CODY D., 1989. Genotoxicity of zinc in 4 short-term mutagenicity assays. *Mutat. Res.*, 223, 267-272.
- TOYOKUNI S., SAGRIPANTI J.L., 1993. DNA single- and double-strand breaks produced by ferric nitrilotriacetate in relation to renal tubular carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 14(2), 223-227.
- VENIER P., MONTALDI A., MAJONE F., BIANCHI V., LEVIS A., 1982. Cytotoxic, mutagenic and clastogenic effects of industrial chromium compounds. *Carcinogenesis*, 3(11), 1331-1338.
- VAN der GAAG M.A., 1988. Rapid detection of genotoxins in waste water : new perspectives with the sister-chromatid exchange assay *in vivo* with *Nothobranchius rachowi*, in : Proceedings of the 1st Conference on Ecotoxicology, Oct. 17-19 Copenhagen, 273-276.

- VAN der GAAG M.A., GAUTHIER L., NOORDSIJ A., LEVI Y., WRISBERG M.N., 1990. Methods to measure genotoxins in wastewater : evaluation with *in vivo* and *in vitro* tests, in : *Genetic Toxicology of Complex Mixtures VI*, M.D. Waters (eds.), Plenum Press, New York, USA.
- VAN der HOEVEN J, BRUGGEMAN I, ALINK G, KOEMAN J., 1982. The killifish, *Nothobranchius rachowi*, a new animal in genetic toxicology. *Mutation Res.*, 97, 35-42.
- VAN HOOF F., VERHEYDEN J., 1981. Mutagenic activity in the river Meuse in Belgium. *Sci. Total Environ.*, 20, 15-22.
- VON DER HUDE W., BEHM C., GÜRTLER R., BASLER A., 1988. Evaluation of the SOS chromotest. *Mutation Res.*, 203, 81-94.
- WEST W.R., SMITH P.A., BOOTH G.M., LEE M.L., 1988. Isolation and detection of genotoxic components in a Black River sediment. *Environ. Sci. Technol.*, 22 (2), 224-228.
- WETTERHAHN K.E., HAMILTON J.W., 1989. Molecular basis of hexavalent chromium carcinogenicity : effect on gene expression. *Sci.Total. Environ.*, 89, 113-129
- WHITE S., TAETLE R., SELIGMAN P., RUTHERFORD M., TROWBRIDGE I., 1990. Combinations of anti-transferrin receptor monoclonal antibodies inhibit human tumor cell growth *in vitro* and *in vivo* : evidence for synergistic antiproliferative effects. *Cancer Res.*, 50, 6295-6301.
- WISE J.P., ORENSTEIN J.M. PATIERNO S.R., 1993. Inhibition of lead chromate clastogenesis by ascorbate : relationship to particle dissolution and uptake. *Carcinogenesis*, 14(3), 429-434.
- WRISBERG M.N, BILBO C, SPLIID H, 1992. Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis* and statistical analysis. *Ecotox. Envir. Safety*, 23, 191-205.
- WRISBERG M.N., Van der GAAG M.A., 1992. *In vivo* detection of genotoxicity in waste water from a wheat and rye straw paper pulp factory. *Sci. Total Envir.*, 121, 95-108.
- XU H., DUTKA B.J., KWAN K.K., 1987. Genotoxicity studies on sediments using a modified SOS chromotest. *Tox. Assessment*, 2, 79-87.
- YANG J., HSIEH Y., WU C., LEE T., 1992. Mutational specificity of chromium(VI) compounds in the HPRT locus of chinese hamster ovary-K1 cells. *Carcinogenesis*, 13(11), 2053-2057.
- YIM M.B., CHOCK P.B., STADMAN E.R., 1990. Copper, zinc superoxide dismutase catalyzes hydroxyl radical production from hydrogen peroxide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 5006-5010.

RESUME

PERFORMANCE DES TESTS D'AMES ET MICRONOYAUX TRITON APPLIQUES A L'ETUDE DE LA GENOTOXICITE D'EFFLUENTS COMPLEXES ET DES INTERACTIONS ENTRE POLLUANTS

Dans une première partie nous avons réalisé une revue bibliographique des essais de génotoxicité *in vitro* et *in vivo* applicables à l'étude de la génotoxicité d'échantillons de l'environnement hydrique.

Dans une seconde partie nous avons comparé les performances du test d'Ames et du test triton sur larves de pleurodèle, dans le cadre du contrôle de la génotoxicité d'effluents complexes.

Le test triton s'est révélé un outil de choix pour la détection du potentiel génotoxique de ces échantillons. Ce test est apparu :

- ◆ sensible sans nécessiter d'étape d'extraction et de concentration des micropolluants,
- ◆ plus représentatif des conditions d'exposition dans l'environnement,
- ◆ facile à mettre en oeuvre,

mais il gagnerait à ce que la lecture des frottis soit automatisée.

Le test d'Ames nécessite le plus souvent une concentration des échantillons testés ; il est bien adapté pour tester de faibles volumes d'échantillon. Il s'est avéré plus particulièrement sensible aux micropolluants des effluents de papeterie.

Dans une troisième partie nous avons étudié les effets combinés de FeIII, CrIII, CrVI et ZnII sur l'induction de cellules à micronoyaux chez les larves de triton. Les résultats obtenus sont les suivants :

- ◆ le fer trivalent est génotoxique
- ◆ le chrome III et le chrome VI ne sont pas systématiquement génotoxiques
- ◆ un effet d'additivité a été mis en évidence entre FeIII et CrVI
- ◆ le zinc n'est pas génotoxique

Enfin nous avons étudié le mécanisme d'action génotoxique du fer III. Celui-ci pourrait être lié à l'induction d'un stress oxydant, ainsi que le suggère l'augmentation du taux de cellules à micronoyaux induit par FeIII lorsque les larves sont simultanément exposées à du cyanure (Fe (0,6 mg/l) / CN⁻ (5 et 25 mg/l), lequel agit en perturbant le métabolisme oxydatif des cellules.

MOTS CLES : Tests d'Ames, test triton, *Pleurodeles waltl*, effluents, génotoxicité, fer, chrome.