

Projet Semtep : Note de synthèse d'Yves Marneffe concernant les méthodes d'analyses du pouvoir mutagène

<p><u>Méthodes d'analyse du pouvoir mutagène</u></p> <p><u>Faire une proposition de méthodologie au comité</u></p> <p><u>Réaliser une dizaine d'analyses en septembre / octobre</u></p>	<p><u>ISSeP ([CFR] et [YMA])</u></p>	<p><u>Mai 2017</u></p> <p><u>Septembre/octobre 2017</u></p>
--	---	---

Introduction

Les procédés de désinfection de l'eau (chloration, ozonation, chloramination) entraînent la formation de produits secondaires (DBPs pour disinfection by-products) dont un certain nombre peut s'avérer cancérigène. Le chloroforme fut le premier découvert en 1974 ce qui a dans un premier temps focalisé l'attention sur les trihalométhanes (THM).

Actuellement, plus de 500 DBPs ont été identifiés, mais seulement 20-30 parmi les plus abondants (4 THMs, 9 HAAs, 4 HAN, ...) ont fait l'objet d'une attention soutenue. Cela signifie que la plus grande partie des DBPs demeure largement indétectée (coûts trop élevés). Ainsi par exemple, le 3.4 dichloro-5 hydroxy – 2(5H)-furanone (= mutagène X) s'avère 6000 fois plus mutagène que le chloroforme et 100 fois plus que le bromodichlorométhane et représenterait jusqu'à 67 % de la mutagénicité d'une eau traitée (Smeds et al., 1997).

Si l'analyse chimique apporte des informations sur chacune des substances présentes, elle ne dit rien sur les effets synergiques ou antagonistes qui peuvent résulter de leur mélange. Les difficultés de mise en œuvre des études épidémiologiques et des tests de carcinogénicité à long terme ont encouragé l'étude de ces mélanges complexes par des tests de génotoxicité court terme, rapides, moins coûteux et qui seraient suffisamment prédictifs (Ceretti et al, 2016).

Suite aux premiers résultats de Semtep, le Professeur Bernard a rappelé qu' « il sera intéressant de vérifier la corrélation entre les concentrations retrouvées pour les HAA et les THM. Il a ajouté qu'il serait aussi intéressant de voir si on retrouve une corrélation entre la concentration en HAA et le pouvoir mutagène de l'eau. L'ISSeP a précisé qu'il sera nécessaire de concentrer fortement les échantillons et que les essais types « comet essais » ou autres indiquent l'effet global de l'ensemble des contaminants de l'échantillon. »

Génotoxicité des HAA trouvés dans les eaux potabilisées.

Giller et al (1997) ont utilisé 3 essais court terme (SOS chromotest, Ames fluctuation test et micronucleus test) pour étudier l'activité génotoxique des acides monochloro-, dichloro- et trichloroacétiques et des acides monobromo-, dibromo- et tribromoacétiques. Ces trois tests ont des endpoints génétiques différents.

Le **test d'Ames** utilise des bactéries mutées ne pouvant pas produire l'histidine nécessaire à leur croissance. Au contact d'un agent mutagène, elles subissent une mutation réverse qui conduit à l'apparition de bactéries mutées (révertants) Les souches de départ (His-) ont muté en souches (His+) sous l'effet de la substance mutagène et peuvent donc croître en milieu pauvre en histidine. Un extrait de foie de rat (S9 Mix) est ajouté afin de simuler l'effet du métabolisme. En effet, certains composés une fois métabolisés induisent la formation de produits cancérigènes. Certains toxiques ne nécessitent cependant pas d'activation métabolique avec du S9 Mix pour s'avérer mutagènes. Délai pour le test : de 4 à 5 jours. La souche TA98 qui est l'une des plus utilisées est plus sensible aux mutations qui affectent le cadre de lecture. La souche TA100 est une souche plus sensible aux mutations de substitutions.

Le **SOS chromotest** utilise des bactéries génétiquement modifiées : dans le gène SOS responsable des mécanismes de réparation de l'ADN suite à une altération, on insère le gène LacZ qui code pour la synthèse de la β galactosidase. Si le gène SOS est induit, le gène LacZ est induit et il y a libération de β galactosidase dans le milieu, mise en évidence par un substrat et une coloration. Délai de 24h.

Le **test micronoyau triton** est un test *in vivo* (les deux précédents étant des tests *in vitro*) d'abération chromosomique sur amphibien exposés pendant 12 j avec renouvellement du milieu, prélèvements sanguins sur des larves, mise en lame, et dénombrement des érythrocytes micronucléés sur un échantillon de 1000 érythrocytes ; c'est donc beaucoup plus lourd.

Avec le SOS chromotest, seuls les acides dichloro-, dibromo- et tribromoacétiques ont induit des dommages à l'ADN d' E. coli. Avec le Ames test, tous les composés à l'exception de l'acide monochloroacétique ont révélé une activité mutagène. Le test micronoyau n'a révélé qu'un faible effet de l'acide trichloroacétique.

Génotoxicité générale dans les eaux potabilisées.

La même équipe (Le Curieux et al, 1996) a mené une étude au moyen des mêmes tests sur :

- Des composés organohalogénés ;
- Des acides fulviques chlorés ;
- Des échantillons d'eau non concentrés en cours de traitement.

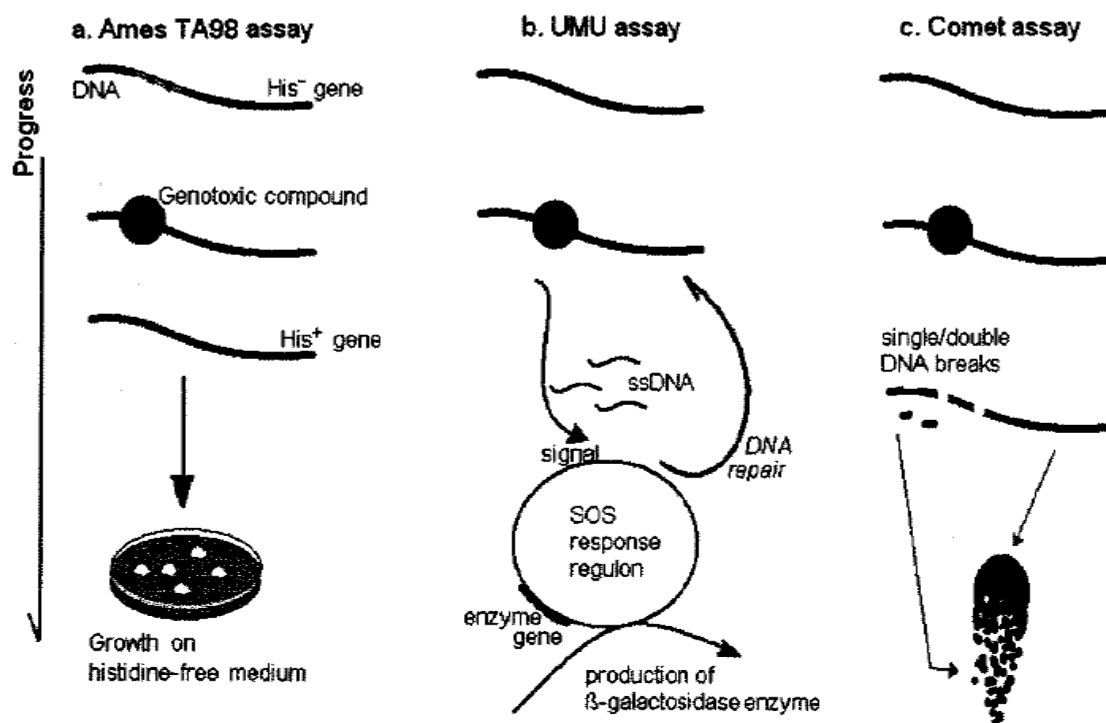
Les résultats montrent que la génotoxicité est influencée par la nature (bromé ou chloré) et la position et le nombre de Cl ou Br. Ils mettent également en évidence le fait qu'un seul test n'est pas suffisant : une batterie est nécessaire (différents types cellulaires, systèmes de métabolisation, mécanismes d'action) ; le test d'Ames fluctuation est le seul capable de détecter une activité génotox dans les échantillons d'eau. Pour ces derniers toutefois, ils ont dû concentrer l'échantillon par passage sur résines XAD2 et XAD7 et élution avec un mélange méthanol-éther (facteur de concentration de 4000 fois).

Dans une autre étude, Penders et Hoogenboezem (2003) du RIWA ont comparé 3 tests pour trouver le test de génotoxicité le mieux adapté pour détecter la mutagénicité dans l'eau des rivières des Pays-Bas (le RIWA évalue la génotoxicité de ses eaux de surface depuis 1986). Pour ce faire ils ont comparé le test d'Ames avec la souche TA98, le test UMU et le test des comètes, appliqués sur les mêmes échantillons de la Meuse et de l'Escaut.

De grands volumes d'eau de surface (100 litres) ajustés à pH 7 ont été concentrés sur XAD-4 (colonne d'adsorbant) avec un gradient d'éthanol dans du cyclohexane comme éluant, évaporation à l'azote et reprise dans l'éthanol avec un facteur de concentration final de 25 000 fois.

Le principe du test d'Ames a déjà été expliqué plus haut ; le principe de l'UMU test est similaire à celui du SOS chromotest déjà expliqué plus haut également. L'essai *in vivo* d'électrophorèse sur gel en conditions alcalines de cellules isolées, aussi appelé test des comètes est une méthode mesurant les cassures de brins d'ADN dans les cellules eucaryotes. Des lymphocytes de sang humain sont exposés à l'échantillon pendant 2 heures, lysés sur gel sur une lame de microscope pour libérer et dénaturer l'ADN et le soumettre à une électrophorèse. L'ADN va migrer, les petits fragments résultant des cassures migrant plus tôt que les grands d'où une forme en comète qui est analysée après coloration par un fluorochrome en microscopie à fluorescence. Quand la queue de la comète contient plus de 10 % d'ADN, l'échantillon est considéré comme génotoxique.

La figure ci-dessous illustre le principe des 3 tests.



Les conclusions de l'étude sont les suivantes :

- L'utilisation d'un seul test de génotoxicité n'est pas suffisante pour le monitoring des rivières hollandaises ;
- La meilleure combinaison est le Ames ou l'Umu ET le test de comètes, le test d'Ames avec S9 et à pH 7 ayant la préférence ;
- L'utilisation de la technique XAD pour concentrer les échantillons fait que la génotoxicité peut uniquement être mise en relation avec les composés non polaires. Actuellement on concentre plutôt par SPE.

Lah et al (2005) ont également comparé 3 tests pour la détection de la génotoxicité dans les eaux potabilisables et recommandent également le test des comètes pour le biomonitoring de routine des eaux potabilisables. Ces auteurs ne détectent par contre pas de génotoxicité avec le test d'Ames.

Muellner et al (2007) ont également utilisé avec succès un test des comètes (cellules ovariennes d'hamster chinois) pour étudier la génotoxicité des HANs.

Limites des tests de génotoxicité court terme

Pour les humains, la signification toxicologique de mutagènes bactériens trouvés dans des eaux potabilisables qui sont en plus concentrées n'est pas claire. Alors qu'il y a des indices épidémiologiques d'une association entre toxicité chronique et DBPs, on ne peut pas assumer qu'un test d'Ames par exemple reflète la cause d'une augmentation du risque.

La ligne directrice OCDE 471 qui traite du test d'Ames est à cet égard très claire dans ses considérations initiales :

- *Les essais bactériens de mutation réverse utilisent des cellules procaryotes qui diffèrent des cellules de mammifères, notamment du point de vue du transport, du métabolisme, de la structure des chromosomes et des processus de réparation de l'ADN. Les essais faits in vitro nécessitent généralement une activation métabolique exogène. **Les systèmes in vitro d'activation métabolique ne peuvent pas reproduire avec précision le métabolisme des cellules de mammifère in vivo.** Pour cette raison, les essais ne fournissent pas directement des informations sur le pouvoir mutagène et carcinogène d'une substance sur des mammifères.*
- *Les essais de mutation réverse dans les bactériens sont couramment employés comme première étape dans la détection de l'activité mutagène en général et des mutations ponctuelles en particulier. De nombreuses données démontrent que beaucoup de produits chimiques ayant un effet dans ces essais présentent aussi une activité mutagène dans d'autres systèmes. **Certains agents mutagènes ne sont pas décelés par ces systèmes d'essai.** Ces défaillances peuvent tenir à la nature particulière de l'effet détecté, ou à des différences sur le plan de l'activation métabolique ou de la biodisponibilité. D'un autre côté, **les facteurs qui amplifient la sensibilité des systèmes de réversion peuvent conduire à une surestimation de l'activité mutagène.***
- ***Quoique de nombreux composés qui donnent un résultat positif dans ces essais sont cancérigènes pour les mammifères, la corrélation est loin d'être parfaite.** La corrélation dépend de la classe chimique et il existe des substances cancérigènes qui ne sont pas détectées par la mutation réverse sur bactéries parce qu'elles agissent par des mécanismes non génotoxiques ou par des mécanismes qui sont absents dans les cellules bactériennes.*

Ces tests doivent donc être bien pris comme une première étape, un screening. Les composés positifs à un test d'Ames par exemple doivent être testés dans un modèle mammifère (rats, souris) avant d'être labellés cancérigènes.

Dans leur review, Boorman et al. (1999) évoquent les plans de recherche de l'USEPA qui ont fourni des données toxicologiques considérables sur les DBPs et se sont attachés à comprendre les mécanismes de toxicité pour les DBPs les plus pertinents. Les outils proposés par l'agence allaient

des tests de génotoxicité tels qu'évoqués ci-dessus jusqu'à des études sur rongeurs et l'utilisation de souris et de poissons transgéniques.

Il convient donc d'avoir bien à l'esprit que si des tests comme le test d'Ames, le SOS chromotest ou le test des comètes sont proposés, il ne s'agit que d'une première approche, d'un screening.

Recommandations

Si l'on est conscient de ces limites, ces 3 tests peuvent être recommandés, avec une préférence pour le test d'Ames et le test des comètes en fonction des recommandations des documents consultés ci-dessus.

Les labos qui sont intervenus pour le Ames dans le cadre d'un interlabo récent sont les suivants :

BFG : Georg Reifferscheid, Steffen Wahrendorf, Sebastian Buchinger

IVM : Timo Hamers

Entox : Beate Escher & Janet Tang

Le Vito peut probablement effectuer ces tests.

Une autre alternative serait d'utiliser des tests existants dans le commerce.

- La société Xenometrix commercialise le test d'Ames avec les souches recommandée par la ligne directrice OCDE 471 : **Ames MPF 98/100 - with S9 and Positive Controls 10 Sample Kit - 480 Measuring Endpoints / Strain - positive controls and lyophilized rat liver S9, Aroclor 1254 induced. Ames MPF™ 98/100 and Ames II kits have a high sensitivity, specificity and can be used to test drinking water after sample concentration with SPE columns.**
- *L'Umu test est également commercialisé par Xénométrie (principe du SOS chromotest).*
- *La société EBPI que j'ai approchée au dernier congrès de la Setac au mois de mai commercialise également le test d'Ames sous différentes variantes :*

- le Muta-Chromo Plate assez classique

- le Ames- 384 ISO et le Ames-MOD ISO : même principe mais avec moins de réactifs

Elle commercialise aussi le Umu-Chromo Test et le SOS Chromotest.

Par ailleurs, la société a développé pour ces 3 tests des versions pour lesquelles l'ajout de S9 Mix qui simule la métabolisation n'est plus nécessaire : le Ames Express, le SOS Express et le Umu Express dans lesquels les bactéries ont été modifiées génétiquement pour exprimer soit le cytochrome P450 humain soit l'enzyme du foie GST-theta de manière interne, ce qui promeut la bioactivation des molécules xénobiotiques en substances « ADN réactives » en l'absence du mix S9.

D'après la discussion que j'ai eue avec le représentant de la firme, ces tests sont couramment utilisés pour répondre aux préoccupations des producteurs d'eau au Canada, préoccupations qui sont similaires aux vôtres. Leur SOS Chromotest contient une souche bactérienne particulièrement sensible aux dommages oxydatifs et c'est pourquoi ils l'ont utilisé souvent dans les applications « eaux potabilisables/potables ».

Une réflexion intéressante à avoir suite à ma discussion avec lui est la suivante : voulons-nous choisir un bioessai qui corresponde à une famille particulière de composés (un peu la

réflexion de SEMTEP pour les HAAs) ou bien choisir le meilleur essai pour détecter tous les composés (même les nouveaux et inconnus) qui causent l'effet dans le mélange. Lui pense que c'est dans la seconde optique que l'apport des bioessais a le plus de valeur (c'est aussi mon opinion).

Il va de soi que le choix du comité de SEMTEP peut logiquement se porter sur des laboratoires qui ont déjà l'expérience de ce type de test et où ils sont validés. La CEX-ISSeP peut aussi examiner la faisabilité d'appliquer l'un ou l'autre de ces kits.

Références

Boorman,GA Vicki Dellarco, June K. Dunnick, Robert E. Chapin, Sid Hunter, Fred Hauchman, Hank Gardner, Mike Cox, and Robert C. Sills Drinking Water Disinfection Byproducts: Review and Approach to Toxicity Evaluation. Environmental Health Perspectives Vol 107, Supplement February 1999

Ceretti E.,¹ Massimo Moretti,² Ilaria Zerbini,¹ Milena Villarini,² Claudia Zani,¹ Silvano Monarca,² and Donatella Feretti Occurrence and Control of Genotoxins in Drinking Water: A Monitoring Proposal J Public Health Res. 2016 Dec 9; 5(3): 769.

Giller S, Le Curieux F, Erb F, Marzin D. Comparative genotoxicity of halogenated acetic acids found in drinking water. Mutagenesis. 1997 Sep;12(5):321-8.

Lah,B Brigita Žinko,^a Tatjana Tišler,^b and Romana Marinšek-Logara Genotoxicity Detection in Drinking Water by Ames Test, Zimmermann Test and Comet Assay *Acta Chim. Slov.* 2005, 52, 341–348

Le Curieux F., S. Giller, D. Marzini, A. Brice et F. Erb "Utilisation de trois tests de génotoxicité pour l'étude de l'activité génotoxique de composés organohalogénés, d'acides fulviques chlorés et d'échantillons d'eau (non concentrés) en cours de traitement de potabilisation." *Revue des sciences de l'eau* 91 (1996): 75–95.

Muellner MG,[†] Elizabeth D. Wagner ,[†] Kristin McCalla ,[†] Susan D. Richardson ,[‡] Yin-Tak Woo ,[§] and Michael J. Plewa *[†] Haloacetonitriles vs. Regulated Haloacetic Acids: Are Nitrogen-Containing DBPs More Toxic? *Environ. Sci. Technol.*, 2007, 41 (2), pp 645–651

OCDE ligne directrice 471 http://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-471-essai-de-mutation-reverse-sur-des-bacteries_9789264071254-fr

Penders EJM, Hoogenboezem W. Evaluation of the Ames TA98, Umu and comet assay for quality monitoring surface water. Association of River Waterworks-RIWA; 2003.

Smeds A, Vartiainen T, Maki-Paakkanen J, Kronberg L. *Sci Technol.* 1997;31(4):1033–1039