

**RAPPORT RELATIF AU PROJET D'ETUDE EN
GENOTOXICITE DE L'ENVIRONNEMENT MARIN**

Françoise VINCENT
DEL - Laboratoire Ecotoxicologie
IFREMER NANTES



SEPTEMBRE 1993

**RAPPORT RELATIF AU PROJET D'ETUDE EN
GENOTOXICITE DE L'ENVIRONNEMENT MARIN**

Françoise VINCENT
DEL – Laboratoire Ecotoxicologie
IFREMER NANTES

SEPTEMBRE 1993

SOMMAIRE

INTRODUCTION	4
--------------------	---

GENOTOXICITE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. ALTERATION ET REPARATION	6
II. MUTAGENESE ET CANCEROGENESE	9
1. Les cancérigènes chimiques	9
2. Activation métabolique des cancérigènes	9
3. Etapes du développement tumoral	10
4. Modifications génétiques associées à la cancérisation	12
III. MODIFICATIONS GENIQUES ASSOCIEES A LA CANCEROGENESE	12
1. Activation des proto-oncogènes	12
1.1 Identification des proto-oncogènes au cours de l'évolution	12
1.2 Fonctions des proto-oncogènes	13
1.3 Mécanismes d'activation des proto-oncogènes	16
1.4 Rôle des oncogènes dans l'initiation	19
1.5 Rôle des oncogènes dans la progression	20
2. Inactivation des anti-oncogènes	20
3. Génotoxicité et ADN mitochondrial	20

METHODOLOGIES EN TOXICOLOGIE GENETIQUE

I. MUTATIONS GENIQUES	24
1. Tests sur bactéries	24
1.1 Test d'Ames	24
2. Tests sur cellules eucaryotes : Analyse moléculaire de la mutagénèse	24

Gènes présentant un avantage sélectif	24
Gènes ne présentant pas d'avantage sélectif	26
a) <u>Analyse des foyers de transformation</u>	27
b) <u>Analyse de la séquence nucléotidique</u>	27
c) <u>Analyse de la protéine</u>	30
d) <u>Analyse des messagers</u>	30
II. MUTATIONS CHROMOSOMIQUES	31
1. Aberrations de structure	31
2. Micronoyaux	31
3. Electrophorèse en champs pulsé	33
III. ALTERATIONS PRIMAIRES DE L'ADN	33
1. Adduits à l'ADN	33
2. Echanges de chromatides soeurs	34
3. Test d'éluion alcaline	35
4. Réparation de l'ADN	35
4.1 <i>Test sur cellules procaryotes</i>	35
4.2 <i>Test sur cellules eucaryotes</i>	36

PROPOSITION DES RECHERCHES

RECHERCHES SUR LA STRUCTURE DU GENOME : DEVELOPPEMENT POUR L'ANALYSE EN TOXICOLOGIE GENETIQUE	41
ETUDES DE MUTAGENESE : ESSAIS A COURT TERME	45
CONCLUSION	46
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	47

INTRODUCTION

La toxicologie génétique a pour but d'apprécier le mode d'action d'un agent chimique ou physique sur le matériel héréditaire et d'en mesurer les conséquences en terme de mutations et de cancers (Moustacchi, 1983).

Elle est née du besoin d'évaluer et de prévenir les risques génétiques potentiels inhérents au développement et à l'emploi massif des produits chimiques.

Cette appréciation qualitative et quantitative des risques génétiques est fondée sur l'existence d'une batterie de tests et a abouti à une législation (Lohman *et al.*, 1992; Scott *et al.*, 1991 ; CEE, 1992 ; OCDE, 1987).

L'élaboration d'un projet de recherches en toxicologie génétique à l'IFREMER s'inscrit dans la suite logique des travaux réalisés au laboratoire d'écotoxicologie sur les effets biologiques (enzymes de biotransformation) (Galgani *et al.*, 1992).

Dans l'environnement marin cette approche est nouvelle. Elle peut être justifiée par la présence de molécules mutagènes et/ou cancérigènes tel que les PCB, les PAH, les pesticides et certains métaux lourds et par l'observation de cancers chez les poissons et les mollusques vivant dans cet environnement chimique altéré (Mix, 1986).

L'objectif initial de ce projet est de connaître la génotoxicité associée à l'environnement marin; il peut être atteint en effectuant des études de mutagenèse à court terme.

L'objectif final est de savoir si les organismes marins vivant dans un environnement pollué présentent des altérations génétiques. Il demande une connaissance plus approfondie de la structure du génome chez les poissons et les mollusques. Ces études plus longues sont indispensables et permettront d'acquérir les informations nécessaires pour une application en toxicologie génétique.

Pour répondre à ces questions, la mise au point de tests fiables s'impose. Dans le domaine de la mutagenèse chez les vertébrés supérieurs, il en existe plus d'une centaine à ce jour, utilisant différents matériels biologiques et différentes méthodes de mesure.

Chez les vertébrés inférieurs, la connaissance plus approfondie de la structure des génomes, de la nature des lésions, des mécanismes de réparation d'ADN et de leur contrôle est d'autant plus nécessaire pour des études de toxicologie génétique.

Certaines méthodes, comme l'étude d'un gène marqueur de cancérogenèse, constituent une approche récente qui tend à être appliquée au diagnostic génétique du cancer chez l'homme. Elle émane des travaux menés chez les mammifères et sur les modèles cellulaires, ayant démontré de manière évidente que certains gènes sont des marqueurs de cancérogenèse (proto-oncogènes, anti-oncogènes).

D'autres méthodes, comme les tests de mutagenèse (altérations primaires de l'ADN, mutations géniques, mutations chromosomiques, échanges de chromatides soeurs,...), sont déjà appliquées à l'environnement marin.

Pour plus de clarté dans la proposition de recherches en génotoxicité, les effets génotoxiques et leur association avec la cancérogenèse chimique seront tout d'abord rappelés.

Les tests d'évaluation de la génotoxicité et leur application à l'environnement marin seront ensuite présentés.

Enfin, l'application de ces tests à l'environnement marin, dans le cadre d'un programme de recherches en génotoxicité à l'IFREMER, sera proposée et discutée.

GENOTOXICITE : RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. ALTERATION ET REPARATION

L'ADN présent dans le noyau des cellules est une molécule bicaténaire, c'est une entité stable. Une altération dans cette structure peut être provoquée par :

- des phénomènes métaboliques normaux (réplication),
- des agents physiques (radiations ionisantes, ultra-violets),
- des liaisons covalentes avec des agents chimiques.

Ces modifications peuvent être réparées ou conduisent alors à des mutations géniques et chromosomiques (Schéma A).

Dans les mutations géniques, on distingue les mutations frame-shift et les mutations de substitution de une ou plusieurs paires de bases. Les mutations frame-shift décalent le cadre de lecture par insertion ou délétion d'une base, de 2 bases ou d'un nombre non-multiple de 3.

Pour les mutations chromosomiques, on distingue les aberrations de structure (aberrations chromatidiennes, chromosomiques, micronoyaux) et les aberrations du nombre de chromosomes (aneuploïdie).

Les réparations peuvent être partielles, sans empêcher pour autant la survie de la cellule. L'information génétique erronée sera alors transmise aux cellules filles. A ces mutations peuvent s'ajouter des perturbations épigénétiques. Toutes ces perturbations sont impliquées dans l'initiation du processus cancérigène (Singer, 1990).

Il existe 3 mécanismes de réparation de l'ADN :

- *l'excision-resynthèse* qui met en jeu plusieurs enzymes : des N-glycosilase qui éliminent les bases altérées en laissant des sites apuriniques, des endonucléases apuriniques qui coupent les brins d'ADN aux sites apuriniques et des endonucléases spécifiques qui excisent les bases altérées.
- *la réparation post-répllicative par recombinaison*; ce processus élimine un segment d'ADN lésé ou bien permet la tolérance d'une lésion.
- *la réversion in situ du dommage*.

Les mécanismes mis en place pour réparer ces lésions sont aussi à l'origine des mutations. Les différents types de lésions de l'ADN sont présentées sur le schéma B (Devoret, 1979); on distingue:

- *les distorsions négligeables*, tel que l'alkylation de l'une des bases.
- *les distorsions mineures* induites par l'hydratation ou l'absence d'une base.
- *les distorsions majeures* provoquées par l'insertion d'un adduit, la dimérisation de deux thymidines, le pontage entre deux brins d'ADN ou bien entre un brin d'ADN et une protéine.
- *les cassures d'un brin d'ADN* dues à la première phase de la réparation/excision par les endonucléases.
- *les cassures des 2 brins d'ADN* dont les conséquences biologiques sont l'induction de cassures létales de chromosomes.

Les molécules capables d'endommager l'ADN sont à l'origine d'événements moléculaires et cellulaires qui peuvent conduire au développement tumoral.

MECANISMES DE GENOTOXICITE ET DE MUTAGENICITE

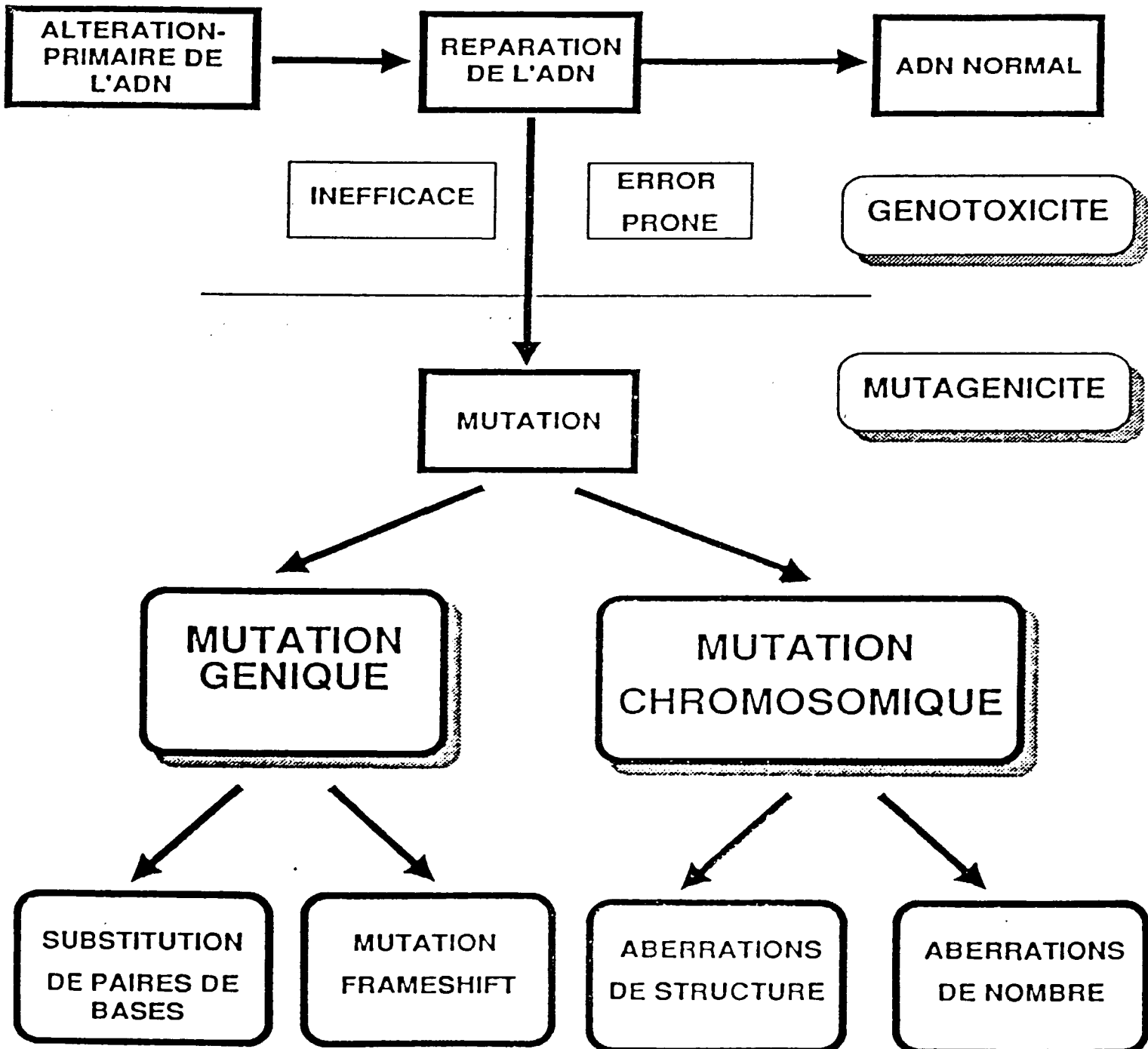


Schéma A

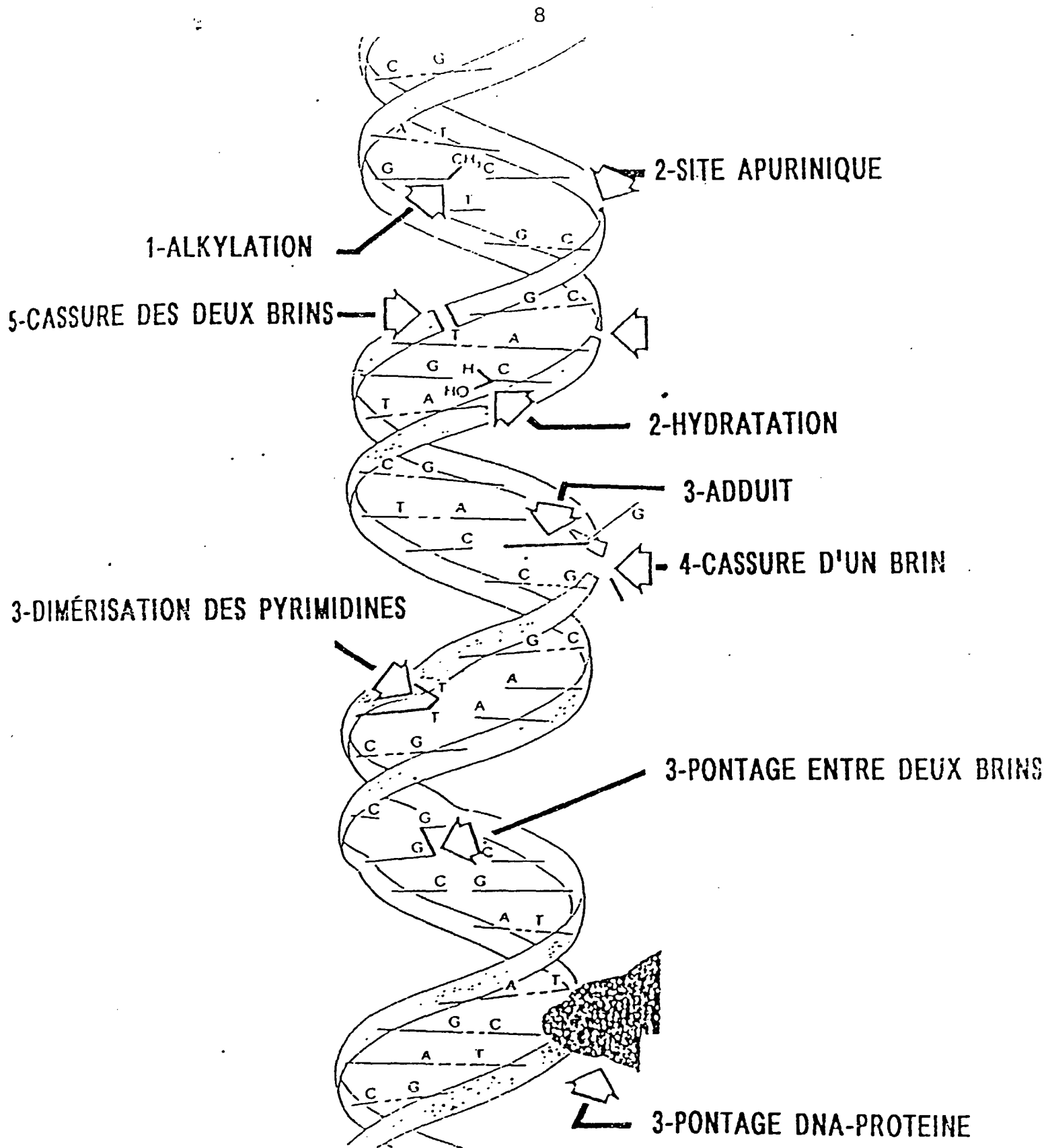


Schéma B

Différents types de lésions du DNA (d'après Devoret, 1979).

II. MUTAGENESE ET CANCEROGENESE

1. Les cancérigènes chimiques

Un des succès de la recherche sur le cancer, pendant les 50 dernières années a été la reconnaissance de molécules comme agent de la cancérogenèse (de Serres et Ashby, 1981). On les range dans deux grandes catégories : les cancérigènes directs (nitrosométhylurée, diméthylsulfate...) et les cancérigènes indirects ou procancérigènes qui nécessitent une activation métabolique (hydrocarbures aromatiques polycycliques, PCB, amines aromatiques, nitrosamines et certains produits naturels comme les aflatoxines....). On distingue également les cocancérigènes, molécules très peu cancérigènes par elles-mêmes, mais capables d'augmenter considérablement l'effet d'un procancérigène.

Les cancérigènes directs sont hautement réactifs, ils affectent les tissus à l'endroit de l'injection ou de l'application. Ils ne persistent pas dans l'environnement car ils sont détoxifiés ou neutralisés par les constituants nucléophiles lors de leur administration. Ils possèdent des propriétés alkylantes responsables de leur interaction avec l'ADN. Ce sont des mutagènes puissants mais des cancérigènes faibles.

Les procancérigènes existent dans l'environnement sous des formes stables et sont pratiquement tous métabolisés au niveau du foie. Ces réactions génèrent l' "ultimate carcinogen", ou des conjugués de transport qui libèrent le métabolite actif au niveau des cibles extrahépatiques.

Dans l'environnement marin, la plupart des polluants ont des propriétés mutagènes et/ou cancérigènes. Quelques exemples peuvent être donnés.

Les PAH sont des initiateurs de cancérogenèse chez les poissons benthiques (Stehn *et al.*, 1988). Les PCB, les pesticides organochlorés sont des promoteurs tumoraux (Ogsterle et Deml, 1983; Kobush *et al.*, 1989). Certains fongicides (benomyl...) et certains herbicides (trifluralin, atrazine) ont des propriétés mutagènes (Quest *et al.*, 1991a, 1991b; Dearfield *et al.*, 1991; Schop, 1991 ; Garriott, 1991). De même certains insecticides (fenvalérate) (Surrallès *et al.*, 1990 ; Rani et Rao, 1991) et certains organophosphorés (malathion, fenthion, diazinon, diméthoate) induisent des mutations chromosomiques dans les cellules humaines (Sobti *et al.*, 1982). Les métaux (Cu, As, Cd, Sn, Hg, Pb) ont des propriétés mutagènes chez les mollusques (Rodriguez-Ariza *et al.*, 1992) et sont des cancérigènes potentiels pour l'homme (Costa *et al.*, 1992; Waalkes *et al.*, 1989; Jongen *et al.*, 1985)...

Il est évident que les organismes vivant dans un environnement chimique altéré risquent de subir des lésions dans leur génome pouvant conduire à la mutagenèse voir même à la cancérogenèse.

On doit donc évaluer le pouvoir génotoxique d'un tel environnement et déterminer quels sont les dommages génétiques subis par les organismes marins.

On comprend bien que la **génotoxicité résulte d'événements multiples** provoqués par l'action conjuguée des polluants présents dans l'eau ou les sédiments. Pour ces raisons, on parlera de *génotoxicité associée à l'environnement marin*.

2. Activation métabolique des cancérigènes

Les produits chimiques cancérigènes sont métabolisés au niveau de l'hépatocyte par les mécanismes enzymatiques de détoxification. Au cours de ces réactions, une fraction échappe à la détoxification et génère des métabolites électrophiles et des radicaux libres. Les métabolites électrophiles vont pouvoir se lier aux macromolécules comportant des sites nucléophiles comme il en existe sur l'ADN et les protéines et sont à l'origine de la formation d'adduits.

L'activation métabolique a été démontrée chez *Mytilus edulis*, *Carcinus maenas*, *Asterias rubens* (Marsh *et al.*, 1991) et chez de nombreux poissons (Lech et Vodcnik, 1981 ; Varanasi *et al.*, 1987). L'induction de tumeurs a été obtenue chez l'huître (Gardner *et al.*, 1991). Dans les cas de néoplasies, chez les mollusques bivalves marins, des pollutions ont été fréquemment incriminées (Yevich et Barszcz, 1977 ; Moore et Lowe, 1979). Des corrélations ont été trouvées entre les concentrations en hydrocarbures polycycliques aromatiques et la fréquence des tumeurs chez les moules de la baie de Yaquina (Orégon, USA) (Mix et Shaffer, 1979). Cependant des études *in vivo* tendent à infirmer cette hypothèse, l'induction de néoplasies chez les mollusques, suite à une exposition au pétrole ou à des PAH, n'a pu être démontrée, les résultats de certains travaux soutiennent l'hypothèse d'une étiologie virale (Rasmussen, 1986 ; Oprandy et Chang, 1983).

Chez les vertébrés, les poissons présentent un intérêt dans le cadre de la recherche sur le cancer (Masahito *et al.*, 1988). Des modèles biologiques sont utilisés à la fois pour des études de cancérogenèse et pour la compréhension des effets des divers polluants dans les milieux aquatiques. La plupart des travaux sont effectués chez la truite (Bailey *et al.*, 1987 ; 1989 ; 1992). Du fait de la rapidité de formation de tumeurs à divers cancérigènes, des poissons de petites tailles (*Oryzias latipes*, *Fundulus grandis*,...) font l'objet d'études de mécanismes de cancérogenèse (Hawkins *et al.*, 1985).

Du point de vue histologique, les tumeurs ne diffèrent pas de celles rencontrées chez les vertébrés supérieurs. La terminologie employée pour ces lésions est directement inspirée de la pathologie humaine et des vertébrés supérieurs. Chez de nombreuses espèces de poissons, des néoplasmes ont été mis en évidence dans tous les types cellulaires et les organes majeurs, à l'exception du cerveau. La plupart des bases moléculaires et biochimiques du cancer (métabolisation des xénobiotiques, activation des proto-oncogènes, progression histologique) seraient similaires chez les poissons et les mammifères.

Par contre, les influences hormonales et immunologiques sont moins connues. De même, le développement de lignées cellulaires établies, nécessaires dans la recherche sur les facteurs de croissance, la cartographie génétique n'en sont qu'à leur début dans les études de transformation.

L'apparition de tumeurs chez les poissons marins ou d'eau douce est dans certains cas associée à des sites pollués. De nombreux travaux démontrent l'impact de différentes substances cancérigènes sur la formation des néoplasies (Hawkins *et al.*, 1986).

Cependant dans quelques cas de néoplasmes de poissons, une étiologie virale a été établie (Papas *et al.*, 1976 ; Mix, 1986 ; Myers *et al.*, 1991 ; Harada *et al.*, 1990 ; Murchelano *et al.*, 1991) et des tumeurs sont observées en dehors de toute pollution détectable ou sans relation statistique avec la pollution.

La situation est différente pour les nécroses, les lésions des nageoires et certains papillomes cutanés des poissons pour lesquels une pollution est tenue comme directement responsable (Sindermann, 1980). Ces observations soulignent que les facteurs responsables (viral, composition chimique) n'agissent pas isolément mais dans une étiologie multifactorielle et en association étroite avec les conditions générales du milieu (pH, salinité, oxygénation).

Des liens peuvent exister entre un état pathologique observé en milieu naturel et les contaminants spécifiques de l'environnement, mais il est difficile de les analyser avec précision.

3. Etapes du développement tumoral

Le passage d'une cellule normale à une cellule maligne suit au moins 3 étapes (Schéma C). A partir d'une cellule normale, on passe tout d'abord à une cellule initiée puis à une cellule tumorale et enfin à une cellule maligne, douée d'un pouvoir métastatique. La première étape est induite par des agents d'initiation, la seconde par des promoteurs de tumeurs et la dernière par des agents de progression.

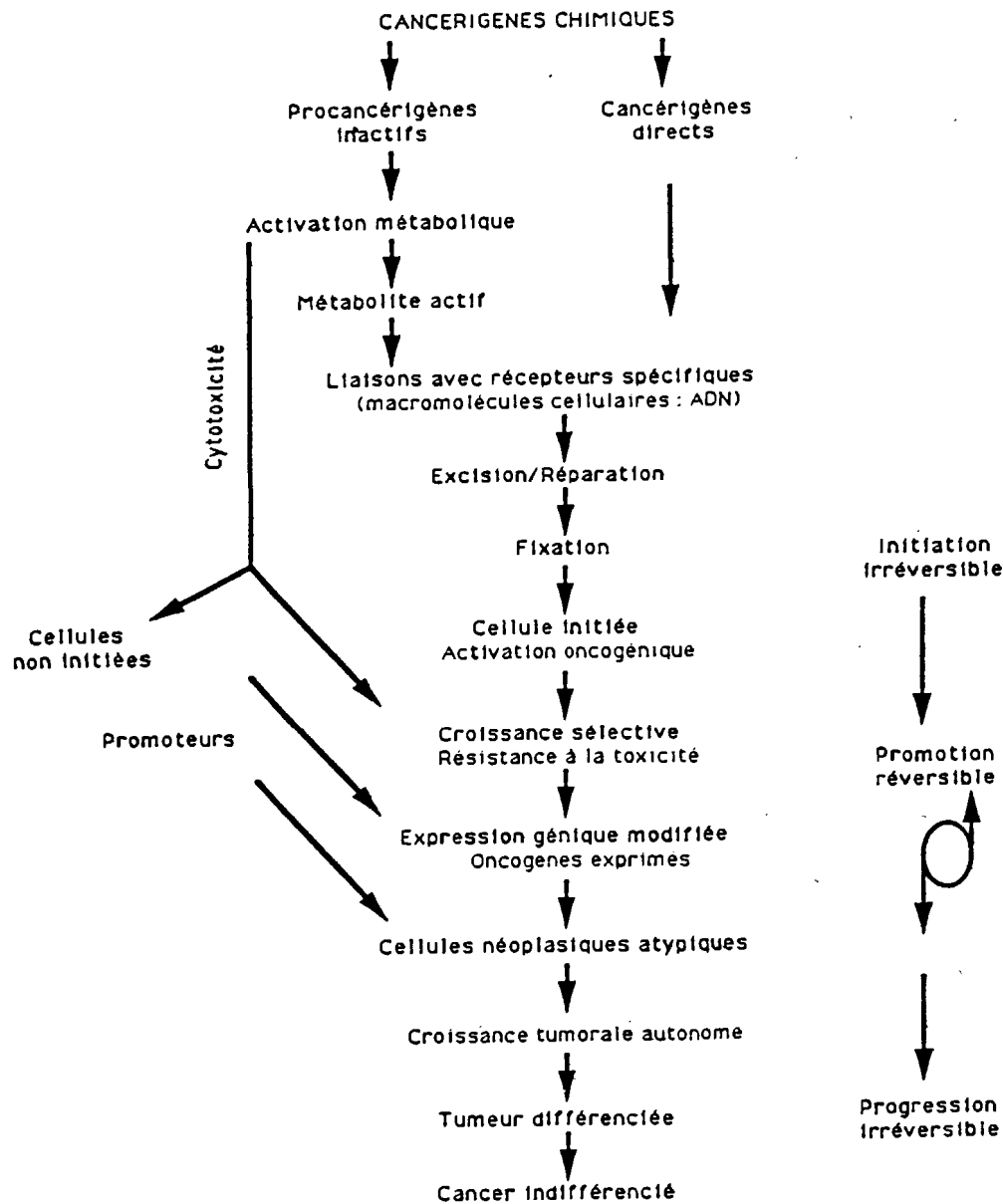


Schéma C : Etapes de la cancérogenèse chimique (d'après Lafaurie, 1991).

L'initiation est un phénomène résultant de l'effet de molécules génotoxiques qui induisent des lésions cellulaires non décelables mais persistantes et transmissibles au cours des générations. C'est un phénomène génétique correspondant à l'établissement d'une mutation, une seule dose peut suffire à établir cet état. Cette mutation se traduit par une contrainte telle que la structure en double hélice de l'ADN ne peut être maintenue. Il a été montré que la modification d'une seule base est capable de déstabiliser la double hélice sur une distance de plusieurs nucléotides. Dans ce cas la réplication est bloquée et les mécanismes mis en place pour réparer ces lésions sont à l'origine des mutations.

La promotion est une étape plus longue, elle nécessite des doses répétées de l'agent promoteur. Cet agent (les esters de phorbols, PCB, pesticides organochlorés,...) est considéré comme non cancérogène par lui-même, mais il est capable de stimuler l'expression néoplasique dans les cellules initiées. Cet effet promoteur est réversible jusqu'à un certain stade et induit des modifications phénotypiques décelables: l'agent promoteur est supposé modifier le modèle normal de l'expression génique. Lorsque les cellules atteignent le stade de cellules néoplasiques, la croissance devient autonome et conduit à l'établissement de la tumeur décelable cliniquement. Cet état est irréversible.

La progression tumorale résulte de la capacité des nodules, polypes ou papillomes à évoluer vers un phénotype franchement transformé. Ce phénotype est caractérisé par l'apparition au sein de la tumeur de populations cellulaires ayant la capacité d'invasion et de formation de métastases et possédant des modifications génétiques nouvelles.

4. Modifications génétiques associées à la cancérisation

Deux types de modifications sont fréquemment retrouvées: les translocations chromosomiques et les amplifications géniques.

Translocations chromosomiques

Ces anomalies sont bien connues dans le lymphome de Burkitt. Une partie du chromosome 8 portant l'oncogène *c-myc* fait l'objet d'un transfert sur les chromosomes 14, 2 ou 22. Quel que soit le type de lymphome étudié, son association au virus d'Epstein Barr est fréquente. Dans certains myélomes et plasmocytomes induits par voie chimique, on connaît des anomalies équivalentes portant sur le proto-oncogène *c-mos*.

Amplifications géniques

Elles peuvent être mises en évidence par coloration des chromosomes en métaphase. Ce type d'anomalie est appelée HSR (homogeneously staining regions). On trouve également des régions semblables à des corps des chromatides soeurs de petites taille, ce sont les chromosomes double minute.

III. MODIFICATIONS GENIQUES ASSOCIEES A LA CANCEROGENESE

1. Activation des proto-oncogènes

1.1. Identification des proto-oncogènes au cours de l'évolution

Une des conséquences majeures des modifications génétiques sont les modifications de la structure et de l'expression de gènes ou modifications géniques. Elles sont particulièrement grave lorsqu'il s'agit de gènes contrôlant la croissance et la différenciation tel que les proto-oncogènes et les gènes supresseurs de tumeurs.

Sous leur forme normale, les proto-oncogènes cellulaires sont des gènes fondamentaux pour la vie de la cellule. En général, ils sont fortement conservés au cours de l'évolution des espèces. Au cours de ces dernières années, un effort considérable a été entrepris pour identifier les tumeurs et néoplasmes chez les populations sauvages, et pour développer des modèles expérimentaux de cancérogenèse utilisant essentiellement les poissons et les mollusques. Cependant très peu de travaux sont entrepris pour rechercher l'expression de ces gènes au cours de la cancérogenèse.

Chez les Mollusques, la recherche de proto-oncogène a été entreprise en exploitant la conservation des séquences et en appliquant les techniques d'hybridation moléculaire. Ainsi chez la moule (*Mytilus edulis*), une partie du proto-oncogène *rho* (*ras*-homologue) a été cloné et séquencé (Noel *et al.*, 1992). Ce résultat correspond au premier proto-oncogène décrit chez un mollusque bivalve. Un gène *rho* montrant 35% d'homologie au niveau des acides aminés avec Ha-*ras* a également été identifié chez *Aplysia californica* (Madaule et Axel, 1985).

Chez les Echinodermes, le proto-oncogène *myc* a été cloné et séquencé par Walker *et al.* (1992) chez l'étoile de mer (*Asteria vulgaris*). Auparavant, ce gène avait été observé chez l'oursin (Mifflin et Robinson, 1988). **Aucun oncogène spécifiquement associé au processus de tumorigénèse n'a été identifié chez ces organismes.**

Chez les Crustacés, seul l'oncogène *ras* d'*Artemia sp.* a été identifié et séquencé (Diaz-Guerra *et al.*, 1989). La séquence présente 75–80% d'homologie avec les gènes homologues de *Drosophila melanogaster* ou de mammifères et seulement 50–60% avec ceux d'eucaryotes inférieurs (*Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum*).

Chez les Insectes, les études de biologie moléculaire du développement ont contribué à l'identification de séquences de type oncogène, notamment chez la drosophile. Les gènes *ras* et *abl* ont été séquencés (Shilo et Weinberg, 1981). Le gène *abl* a été également séquencé chez *Calliphora erythrocephala* (Durica *et al.*, 1987). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, plusieurs séquences homologues d'oncogènes ont été détectées par hybridation avec des séquences oncogènes de virus. Seul le gène *abl* a été caractérisé et séquencé (Goddard *et al.*, 1986).

Chez les vertébrés inférieurs le gène *ras* fut le premier oncogène identifié chez *Carassius auratus* (Nemoto *et al.*, 1986). De même, chez la truite arc-en-ciel, Van Beneden *et al.* (1986) ont séquencé le gène *myc*. Le gène *ras* a également été séquencé chez la truite-arc-en-ciel (Mangold *et al.*, 1991). Depuis, plusieurs oncogènes ont été séquencés, notamment chez *Xiphophorus* (Schartl *et al.*, 1990) et leur expression a été suivie dans des tissus embryonnaires, adultes et transformés (Mäueler *et al.*, 1988). Chez *Microgadus tomcod* (Wirgin *et al.*, 1989) et *Pseudopleuronectes americanus* (Mac Mahon *et al.*, 1988), l'oncogène *Ki-ras* activé par mutation ponctuelle au niveau du codon 12 a été détecté dans des tumeurs. Ce phénomène est identique à celui décrit chez les vertébrés supérieurs (Barbacid, 1990) et a été observé pour l'oncogène *N-ras* chez *Limanda limanda* vivant en présence de sédiments contaminés de la mer du Nord (Moore et Evans, 1992).

Chez les Vertébrés supérieurs, l'analyse cytogénétique et moléculaire des cancers est réalisée afin de mieux comprendre les mécanismes d'activation. Dans le cas des tumeurs malignes, des anomalies de ploïdie, incluant aneuploïdie et hyperploïdie, sont fréquentes.

L'analyse quantitative de l'ADN par la technique de cytométrie en flux permet une étude cytogénétique rapide sur de nombreuses cellules. Elle s'est généralisée au détriment de la caryologie et de l'autoradiographie. Les informations recueillies ont une valeur pronostique dans l'évaluation de la survie de patients atteints de divers types de cancers.

L'analyse moléculaire constitue une approche nouvelle qui tend à être appliquée au diagnostic génétique de certains cancers. Elle émane des études menées chez les mammifères et sur les modèles cellulaires, ayant démontré de manière évidente que certains gènes sont associées à la cancérogenèse (proto-oncogènes, gènes suppresseurs de tumeurs).

1.2. Fonctions des proto-oncogènes

Actuellement, le cancer est considéré comme une maladie des gènes (Land *et al.*, 1983; Barbacid, 1987). Cette théorie est basée sur la découverte de gènes cellulaires, les proto-oncogènes, dont le dysfonctionnement entraîne l'apparition des caractéristiques tumorales (Vasseur, 1989).

On sait que les oncogènes portés par les rétrovirus proviennent de gènes d'origine cellulaire, modifiés au cours d'événements de recombinaison et découverts en 1976 pour l'oncogène *src* (Stéhelin *et al.*, 1976).

On parle de proto-oncogène pour décrire un gène cellulaire sous son état normal et de proto-oncogène activé pour évoquer le même gène devenu transformant ou oncogène (littéralement gène du cancer). Ces gènes ne deviennent transformants que suite à des altérations qualitative et/ou quantitative de leur expression, on parle d'*activation du proto-oncogène*.

On connaît actuellement une centaine de proto-oncogènes et les produits de ces gènes peuvent être regroupés en famille correspondant à des fonctions, à des activités et à des localisations similaires dans la cellule (tableau I).

Certains sont des facteurs de croissance, d'autres sont des récepteurs membranaires de facteurs de croissance (tyrosine kinase, "receptor-like proteins"). D'autres sont des protéines associées à la membrane plasmique ayant une activité GTPase (superfamille des gènes *ras*). D'autres sont des protéines membranaires ou cytoplasmiques (tyrosine-kinase, sérine/thréonine-kinase). Enfin certains codent pour des protéines de localisation nucléaire (tyrosine-kinase, activateur transcription, récepteur nucléaire).

On peut donc dire que ces proto-oncogènes ont un rôle dans la transduction des signaux mitotiques où sont eux même des signaux mitotiques. Il est certain que ces signaux fonctionnent au cours du développement des premières cellules embryonnaires et plus tard lors de la différenciation et de la croissance cellulaire.

On peut citer les proto-oncogènes de la famille *ras* et ceux de la famille *myc* et rappeler brièvement quelles sont leurs fonctions.

Les gènes de la famille *ras* (*Harvey-ras*, *Kirsten-ras*, *N-ras*) codent pour une protéine, p21ras, capable de fixer le GTP, le GDP et qui possède une activité GTPase (Bos, 1989). Elle est localisée à la face interne de la membrane plasmique. Les propriétés biochimiques de la p21ras sont celles des protéines G impliquées dans la transduction des signaux de division et associées au contrôle de la croissance cellulaire et de la différenciation.

Les proto-oncogènes de la famille *myc*, (*c-myc*, *N-myc* et *L-myc*), codent pour une protéine nucléaire. La dérégulation de *c-myc* a été observée dans différents types de cancer (Cole, 1986) et son expression est reconnue comme associée à la croissance (Kelly *et al.*, 1983). On pense donc que les protéines *myc* ont un rôle majeur dans le contrôle de la différenciation et de la croissance. *c-myc* est le premier gène identifié de la famille *myc*, il est l'homologue cellulaire de l'oncogène viral *v-myc*, responsable de leucémie chez le poulet (Sheiness et Bishop, 1979). Par la suite, des gènes *myc* ont été identifiés dans des tumeurs humaines. *N-myc* et *L-myc* ont été isolés respectivement à partir de neuroblastomes et de carcinomes du poumon. Ces gènes sont fortement exprimés et amplifiés, ils présentent une forte homologie avec *c-myc*.

Localisation des produits	Proto-oncogène	Caractéristiques des produits
Membrane cytoplasmique (face externe)	sis c-int2 c-hst	Homologie avec un facteur de croissance : chaîne β du PDGF
Membrane cytoplasmique (trans-membrane)	erbB-1 fms ros trk met neu/erbB-2	Homologie avec un récepteur de facteur de croissance : récepteur de l'EGF récepteur du CSF-1 Homologie avec récepteur de l'insuline
Membrane cytoplasmique (face interne)	src yes fgr lck fes/fps ras	Activité tyrosine-kinase Activité GTPase (homologie avec protéines G)
Cytoplasmique	mil/raf mos	Activité sérine/thréonine-kinase
Nucléaire	myc myb fos rel jun erbA ets rel abl	Activateurs géniques ? Activité AP1 Récepteur des hormones thyroïdiennes T3, T4 Tyrosine-Kinase

Tableau I : Localisation des produits des proto-oncogènes par rapport à la cellule (d'après D. STEHELIN, 1988).

1.3. Mécanismes d'activation des proto-oncogènes

L'activation d'un proto-oncogène dépend soit de modifications qualitatives (modifications de sa séquence), soit de modifications quantitatives (modifications de son expression), soit des deux à la fois.

Avant de parler de l'activation de proto-oncogènes par une substance chimique il est important de rappeler qu'il existe d'autres modes d'activation.

* Activation par translocation chromosomique

Les anomalies caryotypiques (translocation, inversions, délétions) des cellules tumorales sont à la base de théories sur l'origine génétique du cancer. Ces anomalies se produisent dans n'importe quelles régions du génome et affectent les oncogènes tel que *myc*, *mos*, *fms*, *ets*, *abl* et le gène de la p53 (anti-oncogène).

L'étude du gène *myc* a apporté pour la première fois la preuve qu'une translocation pouvait affecter un proto-oncogène. Elles provoquent une dérégulation de l'expression de *myc*, sans pour autant modifier le produit du gène (activation quantitative). Par contre l'activation du proto-oncogène *abl* aboutit à la modification du produit du gène (activation qualitative).

* Activation par amplification

Dans des tumeurs humaines, on observe des amplifications de régions chromosomiques portant certains oncogènes. Il est frappant de constater que les gènes de la famille *myc* sont les plus fréquemment atteints. Dans les tissus portant un proto-oncogène amplifié, l'expression de l'ARN messager correspondant est accrue.

Cette caractéristique justifie la possibilité d'utiliser l'amplification d'un proto-oncogène comme marqueur permettant un meilleur diagnostic de l'évolution des tumeurs.

* Activation par mutation ponctuelle

Des études *in vitro* ont montré que l'activation de proto-oncogènes par mutation ponctuelle peut aller jusqu'à la transformation néoplasique (Fasano *et al.*, 1984; Marshall, 1984). L'activation peut être obtenue par mutation ponctuelle portant sur une seule base. Ceci est illustrée de manière spectaculaire par les proto-oncogènes de la famille *ras*.

Les gènes *ras* sont les plus fréquemment activés dans les tumeurs (Barbacid, 1987). Différents modèles d'étude ont montré que les cancérigènes chimiques provoquaient des mutations spécifiques dans les gènes *ras* (tableau II).

Dans ces tumeurs, des mutations ponctuelles sont systématiquement retrouvées au niveau des codons 12, 13, 59 ou 61 (tableau III). Ces mutations provoquent un changement d'acide aminé dans la protéine et sont responsables du pouvoir oncogène des gènes *ras*. On sait par exemple que pour le gène Ha-*ras*, l'acide aminé en position 12 sur la protéine (Glycine) est indispensable au fonctionnement de la protéine p21*ras*. La substitution de Gly par n'importe quel autre acide aminé (excepté la Proline) provoque l'activation du proto-oncogène *ras*. Les autres cas de mutations ponctuelles des gènes de la famille *ras* sont répertoriées dans le tableau III.

Gènes	Animal	Carcinogène	Tumeur
H-ras-1	rat	NMU	carcinome mammaire
		DMBA	
	souris	DMBA	carcinome peau
			carcinome mammaire
		DB(c, h) ACR	carcinome peau
	N-OH-2AAF VC	cancer du foie	
cochon d'inde	3MNCA B(a)P MNNG DEN	transformation de cellules foetales	
K-ras-2	rat	1,8-DNP2	fibrosarcome
		MMN	T. du mésenchyme rénal
	souris	3MCA	fibrosarcome lymphome T fibroblastes transformés
		B(a)P	fibrosarcome FS6M1
N-ras	souris	NMU	lymphome thymique
	rat	MMN	T. du mésenchyme rénal

Tableau II : Activation des proto-oncogènes c-ras dans des tumeurs expérimentales (d'après M. VASSEUR, 1989). DMBA : diméthylbenzathracène ; NMU : N-nitroso-N-méthylurée ; DB(c, h)ACR : dibenz(c, h)acridine ; N-OH-2AAF : N-hydroxy-2 acetyl aminofluorène ; VC : vinyl carbamate ; 14-OH-2', 3'DHE : 1'-hydroxy-2', 3'-dehydroestragole ; 3MCA : 3-méthylcholanthène ; B(a)P : benzo(a)pyrène ; MNNG : N-méthyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine ; DEN : diethylnitrosamine ; 1,8-DNP2 : 1,8-dinitropyrene ; MMN : méthyl(méthoxyméthyl)nitrosamine.

Gène	Position du codon	Acide aminé normal	Acide aminé substitué	Cancérogène	Animal
H-ras	12	Gly GGA	Glu GAA	NMU	rat
	12	Gly GGC	Ala GCA	DMBA	lapin
			Cys TGC	DMBA	lapin
	61	Gln CAA	Leu CTA	DMBA Uréthane 1'-OH-2' DHE	souris
			Arg CGA Lys AAA	1'-OH-2'DHE N-OH-2 AAF DEN	
K-ras	12	Gln CAG	Leu CTG	DMBA	lapin
			Gly GGT	Cys TGT	1,8 - DNP2
	13	Gly GGC	Arg CGC	DMBA	souris
	12	Gly GGT	Val GTT	N-OH-2 AAF DEN	souris
N-ras	13	Gly GGT	Cys TGT	N-OH-2 AAF DEN	souris
	61	Gln CAA	Lys AAA	4-AAB* NMU	souris

* 4-Aminoazobenzene

Tableau III : Mutations ponctuelles de *c-ras* dans des tumeurs provoquées par de cancérigènes chimiques.

** Effets des cancérigènes chimiques sur les proto-oncogènes de la famille ras*

Pour certains cancérigènes, le mécanisme à l'origine de l'activation est connu (tableau III).

On sait par exemple que le pouvoir cancérogène du benzo(a)pyrène réside en sa fixation au niveau des résidus Guanine de l'ADN.

La N-nitroso-N-méthylurée (NMU) agit par méthylation de l'ADN. Elle produit des O6-méthyl guanine que les ADN polymérases interprètent comme des résidus Adénine. La NMU provoque des mutations ponctuelles spécifiques G→A. L'activation du gène Ha-ras dans les tumeurs induites par le NMU passe toujours par une mutation du codon 12, c'est à dire la transformation GGA en GAA.

L'éthylnitrosourée (ENU) provoque la mutation du codon 12 du gène Ha-ras par alkylation. Cette mutation est capable de transformer les cellules NIH3T3, le pouvoir transformant n'est atteint que pour un taux relativement élevé d'alkylation (Yamasaki *et al.*, 1992).

Le diméthylbenzanthracène (DMBA) agit au niveau des bases Adénine et Guanine et provoque des mutations du codon 61 du gène Ha-ras, et du codon 12 du gène Ki-ras (Brown *et al.*, 1990). Il provoque majoritairement une conversion A→T et G→C. D'autres hydrocarbures sont connus pour interagir avec les résidus Guanine (Brown *et al.*, 1990).

Pour le 2-Acétylaminofluorène (2-AAF), son métabolite le 2-acétoxy-N-2-acétyl aminofluorène (2-AAAF) forme des adduits à l'ADN au niveau des résidus Guanine.

L'activation des proto-oncogènes survient dans les différentes étapes du développement tumoral. Ces caractéristiques sont particulièrement intéressantes puisqu'elles font des oncogènes des "marqueurs potentiels" de mutagenèse ou de cancérogenèse (Schéma C).

1.4. Rôle des oncogènes dans l'initiation

Les mutations ponctuelles dans les gènes *ras* sont impliqués dans les stades précoces du développement tumoral (Barbacid, 1987). La première preuve a été apportée tout d'abord par l'étude de tumeurs précancéreuses de la peau chez la souris, initiée par le DMBA et traitée ensuite par un promoteur, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) (Balmain et Pragnel, 1983).

De ces études il est apparu que les mutations dans le gène *ras* sont dormantes, c'est à dire que d'autres événements sont nécessaires à la progression vers un état néoplasique.

Ce mécanisme a été proposé par Kumar (1990) pour les gènes Ki-ras et Ha-ras, et montré de manière évidente par Nelson *et al.* (1992) pour le gène Ha-ras dans l'épiderme de souris traitées par le DMBA ou l'uréthane. La mutation est stabilisée et détectable après 2 cycles de réplication de l'ADN (7 jours après le traitement par l'agent mutagène).

D'autres informations ont été apportées par les études de transfection. La transfection par l'oncogène *ras* ne permet pas d'obtenir un phénotype de cellule transformée. L'intervention d'un deuxième oncogène (*myc*, *myb* ou *fos*) ou d'un promoteur de tumeur (TPA) est nécessaire.

Ces expériences miment la séquence des événements intervenant pendant l'initiation et la promotion tumorale *in vivo*: il semblerait qu'un agent promoteur agisse en activant spécifiquement les oncogènes nucléaires comme *myc*, *myb* et *fos*.

D'après ces observations, on pourrait dire que puisque l'activation des gènes *ras* n'est pas suffisante au développement de la tumeur, elle peut être considérée comme un **marqueur précoce du développement tumoral** (Sukuman, 1990).

1.5. Rôle des oncogènes dans la progression

L'amplification des oncogènes *myc* est observée au cours de la progression tumorale; il en est de même pour les gènes *ras*. En plus des mutations, certains gènes peuvent perdre un allèle, c'est le cas des gènes *ras* et des gènes suppresseurs de tumeurs dont nous reparlerons plus loin.

Une surexpression des oncogènes (*c-Ha-ras*, *c-raf*, *c-yes*, *c-erbA*, *c-erbB*) est observée dans le foie de rats traités par différents PCB (Jenke *et al.*, 1991). Dans des hépatocarcinomes induits par la diéthylnotrosamine (DENA) chez le rat, une surexpression de l'oncogène *c-fos* est observée (Corral *et al.*, 1985).

Dans le diagnostic de certains cancers, le taux des messagers ou des protéines des gènes situés est déterminé. Ces gènes sont considérés comme des **marqueurs de cancérogenèse**.

2. Inactivation des anti-oncogènes

Les anti-oncogènes sont aussi appelés *oncogènes récessifs* ou *gènes suppresseurs de tumeurs*. On a formulé l'hypothèse de gènes régulant de façon négative la prolifération cellulaire et dont l'inactivation des deux allèles conduirait à la transformation (d'où l'appellation d'oncogènes récessifs). Un certain nombre de gènes régulant négativement la prolifération ont alors été identifiés. Pour deux d'entre eux, Rb et p53, leur produit a été particulièrement étudié. Lorsque ces gènes sont inactivés, ils ont une fonction d'oncogène (Sager, 1989).

La protéine 105Rb codée par le gène Rb est une protéine nucléaire. C'est une protéine phosphorylée et son degré de phosphorylation varie au cours du cycle cellulaire, elle n'a pas été identifiée chez les invertébrés.

La version normale de la protéine p53 présente des propriétés d'inhibition de la croissance. Dernièrement, Farmer *et al.* (1992) ont montré qu'elle possédait *in vitro* des propriétés d'activateur de transcription. Il semblerait qu'il y ait au moins deux classes de mutations: des mutations non sens et des mutations affectant l'un des cinq domaines conservés au cours de l'évolution et activant le pouvoir oncogène. Ces mutations sont comprises entre les acides aminés 120 à 280; les mutations 175, 248 et 273 sont les plus fréquemment rencontrées dans les tumeurs (Levine *et al.*, 1991). Elles sont associées à une surexpression de la protéine dans des cellules transformées par les UV, le méthylcholanthrène et dans les tumeurs (Davidoff *et al.*, 1991 ; Shea *et al.*, 1992; Metcalf *et al.*, 1992).

L'inactivation de la p53 est un des nombreux événements génétiques du développement tumoral. Il commence à être utilisé comme marqueur pour le diagnostic génétique des cancers (D'Amico *et al.*, 1992). Néanmoins cette étude est moins avancée que pour les gènes de la famille *ras* et le mécanisme d'action des cancérogènes chimiques est moins connu. Toutefois, la présence de la p53 mutée (codon 238) a été observée dans des cellules épithéliales rénales immortalisées par le nickel (Maehle *et al.*, 1992).

3. Génotoxicité et ADN mitochondrial

L'ADN nucléaire n'est pas la seule cible des cancérogènes, l'ADN présent dans les mitochondries est une cible préférentielle de ces molécules (revue: Corral *et al.*, 1990).

Dans le règne animal, l'ADN mitochondrial (ADNmt) se présente sous la forme d'une molécule bicaténaire circulaire et surenroulée de 16 à 20 kb. La séquence nucléotidique complète a été déterminée chez l'homme, la souris, le boeuf, le xénope et la drosophile (Attardi et Schatz, 1988)

A la différence de l'ADN nucléaire, ce qui le rend particulièrement sensible à l'action d'un génotoxique, l'ADNmt est codant sur toute sa longueur (excepté l'origine de réplication). Il code pour des protéines de la chaîne respiratoire, des ARN ribosomiaux et des ARN de transfert. Il se distingue par son mode d'expression, aboutissant à un premier ARN polycistronique, et par sa réplication très active. Les mécanismes régulant l'expression des gènes sont encore mal connus.

Il n'est pas surprenant que l'ADNmt soit la cible privilégiée des cancérigènes chimiques et que les lésions provoquées soient persistantes :

- l'ADNmt est peu complexé aux protéines histones, alors que l'ADN nucléaire est protégé d'une certaine manière par ces protéines
- l'ADNmt ne possède pas de systèmes de réparation très efficaces et les lésions provoquées par les agents chimiques peuvent persister au cours des réplifications successives si les molécules lésées ont conservé leur capacité de réplication
- les cancérigènes chimiques se fixent préférentiellement à l'ADNmt

Ceci a été montré en utilisant des composés marqués. Ainsi **les hydrocarbures aromatiques polycycliques** ajoutés à des cellules embryonnaires de souris se fixe **50 à 500 fois plus à l'ADNmt qu'à l'ADN nucléaire**. L'effet mutagène des cancérigènes sur l'ADNmt a été étudié sur la levure *S. cerevisiae*. Wilkie *et al.* (1983) ont montré que sur 18 agents cancérigènes étudiés, 15 augmentaient significativement la fréquence des mutations "petites". Les mutations "petites colonies" correspondent à une délétion totale ou partielle de l'ADNmt, elles ont été isolées par Ephrussi (1953).

Ces lésions de l'ADNmt peuvent entraîner des altérations ou la perte de la fonction mitochondriale (respiration, métabolisme). De plus en plus, il apparaît que les cancérigènes chimiques, qui sont à l'origine d'un grand nombre de tumeurs, peuvent se lier à l'ADNmt et provoquer des mutations (Corral *et al.*, 1990). On ne peut cependant affirmer que l'ADNmt est modifié dans toutes les cellules cancéreuses.

L'étude de l'intégrité de l'ADNmt d'organismes marins vivant dans un environnement chimique altéré devrait être envisagée compte tenu du degré élevé de fixation des PAH sur cette molécule. Jusqu'à maintenant, aucune étude de mutagenèse sur l'ADNmt n'a été effectuée chez les organismes marins. L'ADNmt est seulement analysé dans les études de polymorphisme chez les organismes marins.

METHODOLOGIES EN TOXICOLOGIE GENETIQUE

Il existe un grand nombre de méthodes d'évaluation de la génotoxicité. Les lignes directrices de l'OCDE proposent environ quinze essais différents (OCDE, 1987). Les essais présentent des critères d'acceptabilité bien établis. Ils peuvent nous indiquer :

- la nature du changement génétique
- la capacité métabolique du système d'essai
- l'ampleur de l'exposition et de la réparation
- la valeur prédictive de l'essai en terme de pouvoir mutagène et cancérigène

La classification générale des essais est présentée dans le tableau IV. Ces essais constituent des tests à court terme destinés à détecter la génotoxicité. Il faut noter qu'il existe d'autres essais sur le pouvoir mutagène en utilisation ou en cours de mise au point, qui, en l'absence d'une ligne directrice de l'OCDE, peuvent également être utiles. Les essais transférés dans l'environnement marin sont présentés dans la partie droite du tableau.

Essais reconnus dans les lignes directrices de l'OCDE

Essais relatifs aux mutations géniques

- Essai de mutation réverse sur *Salmonella typhimurium*.
- Essai de mutation réverse sur *Escherichia coli*.
- Essai de mutation génique sur des cellules de mammifères en culture.
- Essai de mutation létale récessive liée au sexe chez *Drosophila melanogaster*.
- Essai de mutation génique sur *Saccharomyces cerevisiae*.
- "Spot test" chez la souris.

Essais relatifs aux aberrations chromosomiques

- Essai cytogénétique *in vitro*.
- Essai cytogénétique *in vivo*.
- Essai du micronucléus.
- Essai de mutation létale dominante.
- Essai de translocation héréditaire chez la souris.
- Essai cytogénétique de cellules germinales de mammifère.

Essais relatifs aux effets sur l'ADN

- Lésion et réparation d'ADN – Synthèse non programmée de l'ADN *in vitro*.
- Essai de recombinaison mitotique sur *Saccharomyces cerevisiae*.
- Essai *in vitro* d'échange de chromatides-soeurs.

Essais non reconnus dans les lignes directrices de l'OCDE

- Adduits à l'ADN
- Cassures simple brin

Essais appliqués à l'environnement marin

Méthode de fluctuation appliquée au test d'Ames (Hubbard, 1984)

Embryons de poissons (Daniels *et al.*, 1989)
Huîtres, moules (Wrisberg, 1990)

Poissons (Moore & Stegman, 1991)

Poissons, amphibiens
(Van der Gaag *et al.*, 1990)

Poissons, moules (Dunn *et al.*, 1987, Kurelec)
Poissons, mollusques exposés aux BaP
(sédiments, eaux)
(Shugart 1988 ; Nacci, 1992)

Tableau IV : Classification générale des essais

I. MUTATIONS GENIQUES

1. Tests sur bactéries

1.1. test d'Ames

Les méthodes de détection des cancérigènes chimiques ont pris un essor considérable quand en 1975, Ames et ses collaborateurs ont mis au point un test de mutagenèse. Ce test a permis d'établir les relations entre mutagenèse et cancérogenèse (Ames *et al.*, 1975).

Ce test permet d'évaluer le pouvoir mutagène d'un xénobiotique. La corrélation est bien établie avec le pouvoir cancérigène de certaines classes chimiques et la base de données est importante. Ce test, limité au système procaryote, nécessite un système exogène d'activation métabolique. L'extrapolation à l'animal est donc difficile.

Ce test utilise plusieurs souches mutantes de bactéries *Salmonella typhimurium* porteuses d'une mutation dans l'un des gènes responsable de la synthèse de l'acide aminé Histidine. La croissance de ces bactéries mutantes nécessite donc la présence d'Histidine. En présence d'un agent mutagène, on évalue le taux de bactéries révertant sur milieu non permissif. Seules les bactéries ayant subi une mutation qualifiée de réverse pourront proliférer. Certaines souches ont des mutations frameshift et le phénotype mutant peut être retrouvé par des agents toxiques induisant des mutations frameshift et d'autres types de souches ont des bases substituées (nucléotides altérés) et le phénotype sauvage est réverté par des agents induisant des substitutions de bases (DeMarini, 1991).

Le test d'Ames sur *Salmonella typhimurium* est utilisé pour évaluer la mutagénicité des polluants dans l'eau et les sédiments. Associé à des techniques performantes de concentration et d'extraction des molécules présentes dans les sédiments ou dans l'eau, cette technique est encore appliquée aujourd'hui (Hashizune *et al.*, 1992). Toutefois, la limite essentielle de ce test vient du fait que la plupart des contaminants chimiques sont mutagènes après avoir subi une activation métabolique (Maccubin *et al.*, 1991). Cependant, récemment des travaux réalisés par Narbonne *et al.* (1993) ont clairement démontré que la fraction postmitochondriale S9 extraite de la glande digestive de moule (*Mytilus galloprovincialis*) pouvait activer le benzo(a)pyrène et le 2-aminoanthracène. Les métabolites se sont avérés mutagènes sur bactéries (test d'Ames). Ces travaux montrent que, dans certaines conditions, le test d'Ames est applicable à l'environnement marin.

Ce test, réalisé à l'origine sur en milieu solide, a été adapté en milieu liquide (Hubard, 1984). Il est réalisable directement sur les eaux douces sans préparation des échantillons. Une étude comparative (micronoyaux, SOS chromotest, Ames) réalisée par Le Curieux *et al.* (1993) révèle que ce test est très sensible.

2. Tests sur cellules eucaryotes : analyse moléculaire de la mutagenèse

Gènes présentant un avantage sélectif

Les mutations géniques peuvent être mise en évidence sur des cellules eucaryotes en culture au locus de gènes présentant un avantage sélectif. C'est le cas des locus Hypoxanthine-guanine Phosphorybosyl Transférèse (HPRT), Thymidine Kinase (TK), APRT (Adénine Phosphorybosyl Transférèse), Na⁺/K⁺ ATPase (tableau V).

Pour déterminer le pouvoir mutagène d'agents génotoxiques au locus de ces gènes, il faut déterminer l'effet cytotoxique et la fréquence des mutations. Par la suite une étude qualitative permettra de déterminer le type de mutations au niveau moléculaire. On peut citer le cas du gène HPRT (Jones *et al.*, 1985) qui est sans doute le mieux caractérisé (schéma D).

Génotype	Fonction du gène	Type de mutations	Agent sélectif
HPRT			6-Thio-guanine
APRT +/-	Enzymes non essentielles	Large spectre de mutations	Dia Amino Purine
TK +/- Na+/K+ ATPase EF ₂ (Facteur d'élongation n° 2)	Enzymes essentielles	Substitution de bases	Bromodeoxyuridine Ouabaïne Toxine diphtérique

Tableau V : Gènes présentant un avantage sélectif.

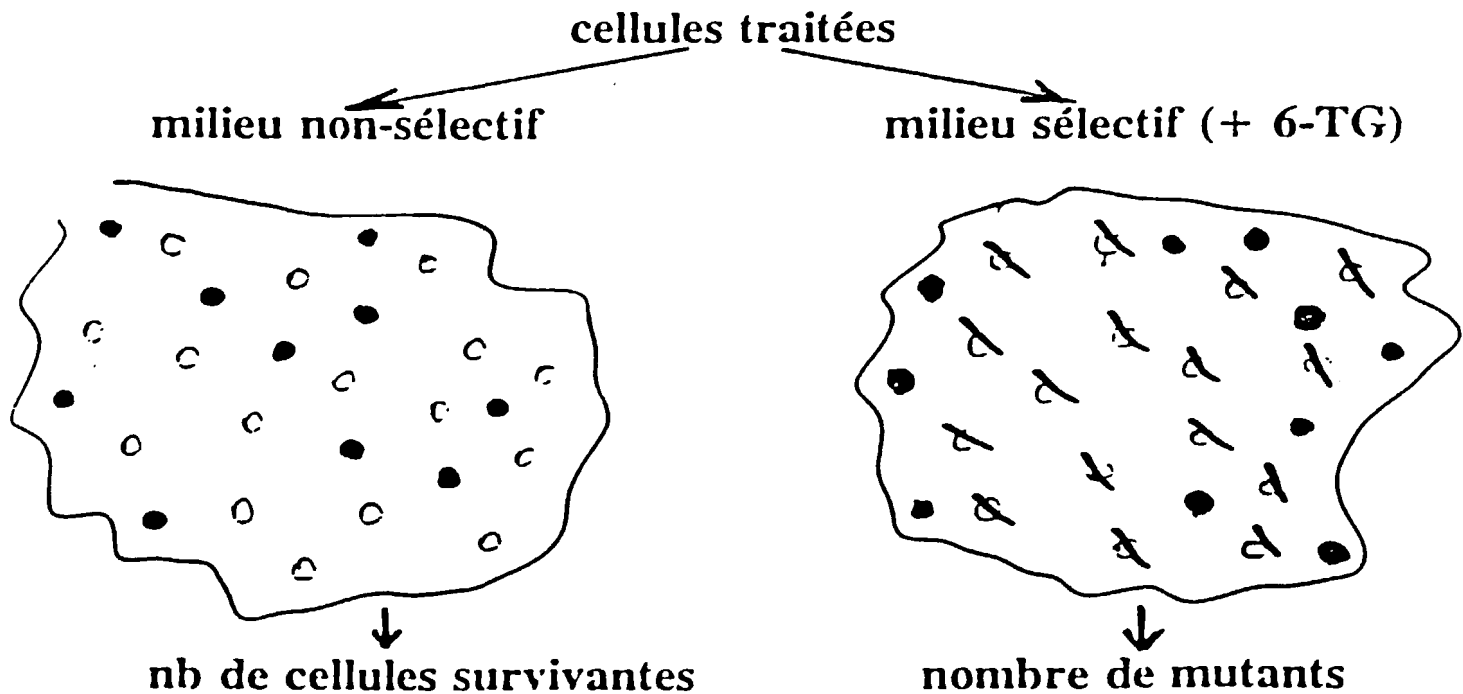
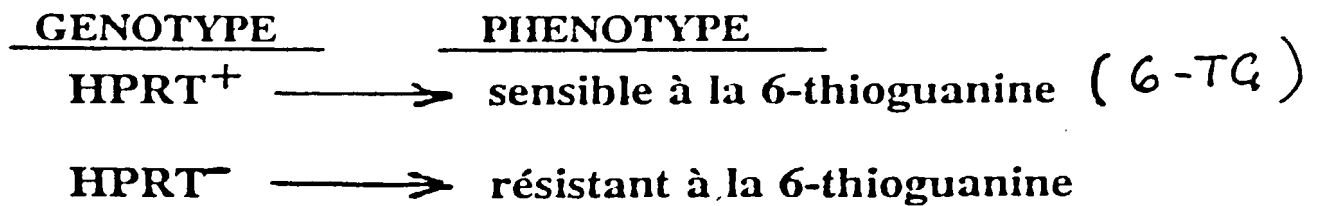


Schéma D

Différents facteurs ont contribué au développement du gène HPRT comme gène marqueur dans les études de mutagenèse :

- comme gène lié au chromosome X, HPRT est hémizygoté dans les cellules mâles et fonctionnellement hémizygoté dans les cellules femelles, ce qui rend ce locus particulièrement utile à l'étude des mutations récessives
- HPRT est une enzyme non essentielle à la croissance de cellules en culture puisque les purines peuvent être fournies par une synthèse *de novo*. La résistance aux analogues toxiques des purines (6-thio-guanine, 8 aza-guanine) vient de la perte de fonction du gène HPRT (Stout et Caskey, 1985)

Les délétions, insertions, mutations ponctuelles produites dans le gène sont responsables de la perte de fonction de l'enzyme. L'analyse moléculaire par les techniques de PCR (Köberle *et al.*, 1993), Southern blot, Northern blot, permet à la fois l'identification des mutants et l'analyse des mécanismes moléculaires à l'origine des mutations. Pour les délétions, des translocations chromosomiques sont impliquées. Les mutations ponctuelles seraient responsables des mutations spontanées ou provoquées par les UV.

Ces systèmes tests *in vitro* ont été utilisés pour étudier la génotoxicité des rejets et effluents industriels (revue Houk, 1992).

Plusieurs raisons peuvent encourager le développement de ces études *in vivo* chez le poisson :

- de nombreux agents mutagènes et/ou cancérigènes induisent des mutations au locus HPRT *in vivo* ;
- de part sa taille (41,5 Kb chez l'homme), ce gène est particulièrement sensible aux agents génotoxiques.

La séquence du gène HPRT est connue chez l'homme, le hamster et la souris (Melton *et al.*, 1984; Konecki *et al.*, 1982; Jolly *et al.*, 1983). La séquence du cDNA est maintenant connue chez le rat (Jansen *et al.*, 1992). Elle n'est pas connue chez les poissons.

Gènes ne présentant pas un avantage sélectif

L'analyse moléculaire de la mutagenèse est parfois effectuée dans le diagnostic des cancers chez l'homme. Les gènes étudiés (proto-oncogènes, anti-oncogènes) sont des marqueurs de mutagenèse et des marqueurs potentiels de cancérogenèse.

Chez les poissons marins, il apparaîtrait que l'expression d'oncogènes est associée à la cancérogenèse comme chez les mammifères (Mc Mahon *et al.* 1988, 1990). La présence du proto-oncogène Ki-*ras* activé a été décelée dans des lésions hépatiques cancéreuses chez *Pleuronectes americanus* vivant dans un milieu pollué par des PAH.

Des résultats plus récents de Moore et Evans (1992) viennent renforcer cette hypothèse : l'expression de l'oncogène N-*ras* est observée chez *Limanda limanda* vivant en présence de sédiments contaminés de la mer du Nord.

L'analyse moléculaire de la mutagenèse constituerait une approche nouvelle chez les poissons. Jusqu'à présent elle a été abordée par l'analyse moléculaire de la protéine mutée en ce basant sur la conservation des séquences au cours de l'évolution (Mc Mahon, 1990; Moore et Evans, 1992).

On comprend bien que l'analyse moléculaire du gène chez ces espèces nécessite tout d'abord de connaître la séquence exacte du gène. Par la suite on cherchera à mettre en évidence des modifications qualitatives (mutations ponctuelles, délétions, insertion) ou quantitatives (surexpression). Différentes méthodes permettent l'analyse moléculaire des gènes mutés.

Ces méthodes ont été largement utilisées pour les oncogènes de la famille *ras* mais sont applicables à n'importe quel autre oncogène (tableau VI). A l'origine, la technique utilisée pour la détection de mutations ponctuelles était basée sur l'analyse des foyers de transformation.

a) Analyse des foyers de transformation

En recherchant le pouvoir transformant d'un gène, on suppose que le gène a subi une mutation ponctuelle.

L'ADN de cellules tumorales est extrait et transfecté dans des cellules fibroblastiques en culture (lignée NIH3T3). Environ 2 semaines après, des foyers de transformation peuvent être observés et l'ADN de ces cellules est ensuite analysé.

Si cette technique était initialement utilisée, on s'est rendu compte que certaines mutations ponctuelles de *ras* ne sont pas efficaces pour transformer les cellules NIH3T3 et ne donnent des foyers qu'après un temps de latence assez long.

L'efficacité de détection a été améliorée en utilisant le système de formation de tumeurs *in vivo* chez la souris athymique (souris nude). Cette approche reste encore trop lourde et trop longue pour permettre des études systématiques.

b) Analyse de la séquence

Sans se substituer aux techniques précédentes, l'approche actuelle consiste à comparer les différences de séquences entre le gène normal et le gène activé.

b.1 Analyse du polymorphisme de restriction de l'ADN (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP)

On appelle polymorphisme de restriction des variations individuelles de la séquence de l'ADN. Elles sont mises en évidence par la méthode de Southern qui montre des différences individuelles dans la taille des fragments de restriction obtenus avec une enzyme donnée et une sonde spécifique.

Un RFLP est défini par un couple sonde/enzyme de restriction et correspond à un emplacement strictement défini sur le génome, c'est à dire un locus génétique. Il se caractérise par sa variation d'un individu à l'autre et sa transmission mendélienne: c'est un marqueur génétique. Les différentes versions correspondant à un même emplacement sur le génome (locus) sont exclusives les unes des autres sur un même chromosome : ce sont des allèles (Kaplan et Delpech, 1990). On parlera d'allèles sauvages (ou normal) et d'allèles mutés.

L'analyse des RFLP permet de mettre en évidence des modifications qualitatives (mutations ponctuelles, délétions ou insertion).

Un fragment de l'ADN est amplifié par la réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction:PCR) entre deux amorces encadrant la région contenant le codon à analyser. La détection de la mutation consiste à utiliser une enzyme de restriction qui reconnaît et clive spécifiquement une séquence comportant le codon non muté. Un exemple peut être donné avec le codon 12 du gène *ras* (Yamasaki *et al.*, 1992) :

	Analyse des Foyers de transformation	Analyse de la séquence				Analyse de la protéine
		RFLP	Hybridation ADN/ADN	Différentielle ADN/ARN	MSPA	
protocole d'analyse	Extraction-purification	Extraction-purification	Extraction-purification	Extraction-purification	Extraction-purification	Extraction-purification
	Injection souris	PCR	PCR	Hybridation	PCR (avec primers mutés)	Hybridation/AC spécifique de la mutation (ELISA)
	Analyse histopathologique	Digestion-enzymatique	Hybridation/sonde mutée	Digestion RNase A	Electrophorèse	
		Southern	Dot blot ou Electrophorèse gel dénaturant ou Modification chimique ou Electrophorèse	Electrophorèse	Transfert hybridation	
Réponses attendues	Gène muté sans identification de la mutation ni localisation	Localisation et identification de la mutation	Localisation et identification de la mutation	Identification de la mutation	Identification et localisation de mutation en proportion minoritaire	Identification et localisation de la mutation
Temps pour environ 8 analyses	2 à 3 semaines	10 jours	10 jours	10 jours	10 jours	10 jours

Tableau VI : Méthodes d'analyse des mutations ponctuelles

codon 12 normal

site MspI

----- CCGG -----
----- GGCC -----

codon 12 muté

absence de site MspI

----- CAGG -----
----- GTCC -----

Lorsque le fragment amplifié est digéré par l'enzyme MspI, pour la séquence normale, un fragment de 355 pb est obtenu. La mutation abolit ce site et la taille du fragment de restriction sera différente (411 pb).

Les fragments sont séparés par électrophorèse en gel d'agarose et visualisés par fluorescence en présence de bromure d'éthidium.

Ce procédé comporte toutefois un risque d'ambiguïté si l'amplification n'est pas parfaitement spécifique et si la digestion enzymatique est incomplète. Il est donc conseillé de recourir à une hybridation finale avec une sonde spécifique du gène *ras* (Yamasaki *et al.* 1992). Ces analyses restent longues à mettre en oeuvre.

b.2 Hybridation différentielle

** Hybridation différentielle ADN/ADN*

On peut mettre en évidence une mutation par hybridation différentielle de l'ADN à analyser et d'une sonde nucléotidique dont on utilise les 2 versions, normale et mutée (méthode du mismatch) (Verlaan de Vrie *et al.*, 1986).

La séquence contenant le codon à analyser est amplifiée par PCR. Chaque échantillon est ensuite hybridé par des oligonucléotides spécifiques des différents allèles (Sugio *et al.*, 1992). Dans des conditions stringentes d'hybridation, la sonde pour la version normale ne s'hybride qu'avec la séquence normale et la sonde pour la version mutée qu'avec la séquence mutée.

La détection des hybrides peut être réalisée de différentes manières (tableau VI) :

- par la technique de dot blot utilisant une sonde oligonucléotidique marquée
- par électrophorèse en gel dénaturant
- par modification chimique des hétéroduplex instables

Ces techniques restent délicates (conditions d'hybridation) et longues car il est nécessaire de multiplier l'utilisation des sondes oligonucléotidiques pour détecter les différentes mutations (Diamond *et al.*, 1988; Sloan *et al.*, 1990).

** Hybridation différentielle ADN/ARN*

Une hybridation différentielle ADN/ARN est parfois utilisée pour détecter les mutations ponctuelles. Un oligonucléotide à ARN marqué portant la séquence du gène normal est hybridé avec l'ADN extrait de l'échantillon. L'hétéroduplex est ensuite digéré par la RNase A, enzyme qui dégrade l'ARN non hybridé (tableau VI).

b.3 Séquençage et amplification élective

** Séquençage*

Auparavant, en raison de sa lourdeur, le séquençage ne pourrait être considéré comme une méthode de détection des mutations car il nécessiterait un clonage préalable de l'ADN à analyser. Cependant une simplification méthodologique de première importance a été apportée par le procédé d'amplification par PCR directement couplé au séquençage. Plusieurs variantes de cette technique existe actuellement.

** Amplification élective de la mutation (DNA amplification by Mutation Specific PCR Assay : MSPA)*

Cette méthode est basée sur l'amplification élective de la région mutée par la technique de PCR (Ehlen et Dubeau, 1989). Les primers utilisés pour la PCR contiennent en 3' la séquence du codon muté. Seule la séquence mutée s'hybride avec le primer et permettra ainsi l'amplification.

Cette méthode présente l'avantage considérable de pouvoir mettre en évidence des fragments mutés même si ceux-ci sont présents en proportion minoritaire au sein d'une population d'allèles sauvages (tableau VI).

De toute évidence cette méthode doit pouvoir s'appliquer à la recherche systématique de mutations ponctuelles. Cependant il est nécessaire de confirmer l'existence de la mutation par séquençage ou RFLP (Nelson *et al.*, 1992).

Cette technique peut être modifiée pour permettre l'analyse simultanée de plusieurs codons (multiplex allele specific PCR) (Wu *et al.*, 1989).

c) Analyse de la protéine

Dans de nombreux cas de tumeurs, des mutations géniques conduisent à une surexpression de la protéine mutée et à l'augmentation de sa stabilité. Une méthode immunohistochimique utilisant un anticorps dirigé contre la protéine mutée permet de détecter et parfois de quantifier la protéine.

Cette méthode est très souvent utilisée dans le diagnostic, elle offre l'avantage d'être facilement réalisable et donc applicable dans une recherche systématique (Brandt-Rauf, 1991). Cependant elle reste essentiellement qualitative. Cette méthode est utilisée pour détecter les protéines p21^{ras}, *erb-B*, *myc*, p53.

La plupart de ces techniques sont complémentaires, elles permettent d'obtenir des renseignements sur le(s) mécanisme(s) à l'origine de l'activation des gènes (tableau VI).

Deux méthodes restent particulièrement intéressantes et applicables à la recherche systématique de mutations ponctuelles : l'amplification élective (MSPA) offre l'avantage de mettre en évidence une mutation présente en proportion minoritaire et l'analyse des RFLP est intéressante à condition qu'elle soit réalisée dans des conditions optimales (amplification spécifique et digestion complète). Aucune de ces techniques n'a été appliquée chez les poissons et les mollusques.

d) Analyse des messagers

Nous avons vu que le traitement par des agents chimiques provoquaient une modification de l'expression des gènes. Ces modifications peuvent être quantifiées par l'analyse du taux des messagers par les techniques de dot blot et de Northern blot.

II. MUTATIONS CHROMOSOMIQUES

1. Aberrations de structure

Les aberrations de structure (chromatidiennes et chromosomiques) sont dues à l'action d'un agent clastogène sur l'ADN. A partir de tissus (analyse *in vivo*) ou de cellules en culture, ces aberrations pourront être détectées par l'analyse des chromosomes des cellules en métaphase.

Quelques exemples d'application à l'environnement peuvent être cités. Means *et al.* (1988) ont mis en évidence des aberrations chromosomiques chez les embryons et les adultes de *Cyprinodon variegatus* et *Morone saxatilis*.

Appliqué à la détection de la génotoxicité dans des zones d'effluents de décharges, ce test s'est révélé positif sur des embryons de *Cyprinodon variegatus* vivant dans ces sites (Daniels *et al.*, 1989).

Ce test a été appliqué chez l'embryon d'oursin violet, *Strongylcentrotus purpuratus* (Hose, 1987). Une augmentation dose-dépendante a été observée après exposition au benzo(a)pyrène.

Des aberrations chromosomiques provoquées par des effluents industriels ont été mise en évidence sur des systèmes tests *in vitro* utilisant *Aspergillus nidulans* (Kafer *et al.*, 1982) ou sur cellules en culture (CHO et lymphocytes) (Latt *et al.*, 1977; Clive 1977).

Cette méthode est réalisable *in vitro* à condition d'utiliser un système exogène d'activation métabolique. Les essais *in vivo* tirent parti du métabolisme de l'animal et une corrélation est établie chez l'homme et chez certains rongeurs entre le taux d'aberrations chromosomiques et le pouvoir cancérogène de certaines classes chimiques. Cette méthode est plus informative sur la nature des lésions que le test du micronoyaux. Cependant elle reste difficilement applicable à une étude systématique (main d'oeuvre expérimentée, examens longs à réaliser, clastogènes tissus-spécifiques).

2. Micronoyaux

La formation de micronoyaux résulte de fragments de chromosomes qui ne sont pas incorporés dans le noyau fille au moment de la mitose (Schmid, 1975). L'absence de centromère due à des cassures (agent clastogène) ou à une désorganisation du noyau (agent aneuploïdogène) entraîne la formation de ces fragments de chromosomes (Schéma E). La formation de micronoyaux a aussi une origine virale. A l'origine, ce test était réalisé sur érythrocytes de la moelle osseuse, il est effectué également sur érythrocytes circulants (Mc Gregor *et al.*, 1980).

Cette technique a été améliorée pour tenter de faire la différence entre les micronoyaux induits par un agent clastogène ou par un agent aneuploïdogène (Uig et Swearngin, 1986; Yamamoto et Kikuchi, 1980).

Actuellement, 3 critères sont à considérer : la taille du micronoyau, le contenu en DNA, et le pourcentage de micronoyau ayant des bandes C positives (Vanparys *et al.*, 1990). Les bandes C correspondent à de l'ADN péricentromérique et leur fréquence est augmentée en présence d'agents aneuploïdogènes (Van Hummelen, 1992).

Le test micronoyaux a été mis au point sur érythrocytes circulant de poissons d'eau douce, *Oreochromis mossambica* (Hanna *et al.*, 1985) et sur hépatocytes de truite-arc-en-ciel (Williams et Metcalfe, 1992). Effectué couramment chez les amphibiens *Pleurodeles waltii* (Jaylet *et al.*, 1987), il a permis la constitution d'une base de données. Son protocole a été standardisé par une norme AFNOR (AFNOR, 1987).

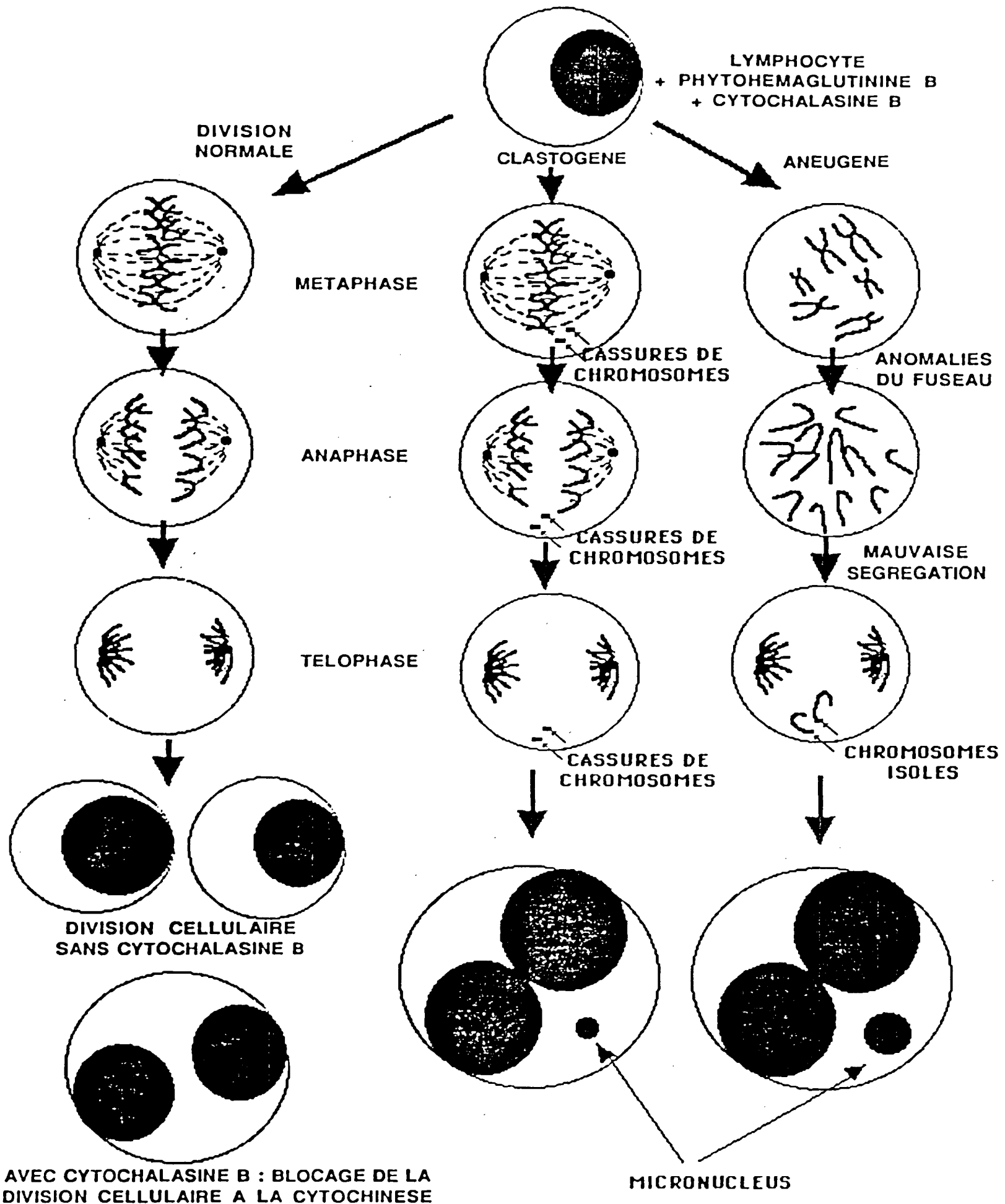


Schéma E : Formation des micronoyaux.

L'induction de micronucléus est observée chez les moules *Mytilus edulis* exposées à des génotoxiques ou vivant dans des zones de rejets (Wrisberg, 1990). Ce test est effectué également chez les poissons marins (Landot et Kocan, 1983) et chez les huîtres. La fréquence de micronoyaux dans les érythrocytes circulants de poissons vivant dans des sites contaminés au sud de la Californie est augmentée (Hose *et al.*, 1987).

Ce test tire partie du métabolisme de l'animal. La corrélation avec le pouvoir cancérogène de certaines classes chimiques est établie et la base de données est importante chez les vertébrés supérieurs. Toutefois, elle présente les mêmes inconvénients que l'analyse des aberrations chromosomiques (analyses longues, spécificité tissulaire de certains clastogènes). Ce test donne moins d'informations sur la nature des aberrations que l'analyse des métaphases s'il n'est pas associé à d'autres tests. Ces deux tests ont fait partie des essais du projet européen de détection des agents aneuploïdogène (Parry et Sors, 1993). Ces deux essais peuvent permettre de rechercher les modifications du nombre de chromosomes (comme l'aneuploïdie), bien qu'il n'existe pas à l'heure actuelle de ligne directrice pour un essai spécifique de l'aneuploïdie.

3. Electrophorèse en champs pulsé

Les mutations peuvent porter sur plusieurs paires de bases et conduire à des insertions ou des délétions dans le gène. Ces modifications de structure pourront être détectées en réalisant un caryotype électrophorétique après électrophorèse en champs pulsé.

Cette méthode a été utilisée pour étudier la génotoxicité de molécules tel que le N-méthyl-N'-nitro-N-nitroso-guanidine et le cis-platine(II)diaminechloride sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Ehler *et al.*, 1991). Elle est surtout réalisée chez les procaryotes et les eucaryotes inférieures. Cette méthode pourrait être appliquée aux microorganismes marins.

III. ALTERATIONS PRIMAIRES DE L'ADN

La génotoxicité associée à un environnement pollué peut être déterminée par l'analyse des altérations primaires de l'ADN tel que :

- les adduits à l'ADN,
- les cassures simples brins,
- les échanges de chromatides soeurs,
- la réparation de l'ADN.

Un certain nombre de tests permettent de détecter les altérations primaires de l'ADN. Ces tests peuvent être réalisés à la fois pour mettre en évidence un effet génotoxique d'un xénobiotique et pour tenter de mettre en évidence les mécanismes impliqués.

1. Adduits à l'ADN

Les agents génotoxiques peuvent exercer leur action en se liant par covalence à l'ADN et forment des adduits. Certains adduits peuvent aboutir à l'établissement de mutations à l'origine de la transformation et de la formation de tumeurs. Il existe une corrélation entre la concentration en adduits et l'induction de mutations géniques et d'aberrations chromosomiques. Il existe aussi une corrélation entre l'apparition de

tumeurs et le taux d'adduits à l'ADN après exposition aux amines aromatiques, aux PAHs et aux nitrosamines chez l'homme (Beland et Poirier, 1993).

La génotoxicité des PAH s'exerce par la liaison de leurs métabolites à l'ADN. Chez l'animal, les PAH induisent des cancers de la peau, de l'estomac, du poumon et des glandes mammaires. Ils résultent d'une conversion métabolique en dihydrodiol époxydes. Le plus souvent, la guanine est la base cible de ces réactifs électrophiles.

Les agents alkylants, tel que les composés N-alkylnitroso, constituent un important groupe de cancérigènes présents dans l'environnement. Ils provoquent le transfert de groupes alkyl (méthyl, éthyl, hydroxyéthyl...) sur un site nucléophile de l'ADN, préférentiellement l'atome N7 de la guanine (Beranek, 1990).

On peut mettre en évidence des adduits à l'ADN de génotoxiques connus par des techniques d'immunologie. On peut surtout rechercher des génotoxiques par des méthodes physico-chimiques : analyse HPLC (Rahn *et al.*, 1982), spectrométrie de masse (Giam *et al.*, 1989) ou post-marquage au ^{32}P .

Les adduits des PAH et des amines aromatiques peuvent être détectés par le post-marquage au ^{32}P . Cette technique est facilement adaptable et reste la plus sensible.

Les méthodes immunochimiques, immunodosage par ELISA et immunocytochimie, utilisent des anticorps dirigés contre les différentes formes d'adduits pouvant exister (Strickland *et al.*, 1984; Den Engelse *et al.*, 1990). En ce qui concerne la sensibilité, les résultats obtenus prouvent que ces techniques sont comparables à l'analyse HPLC (Van Delft *et al.*, 1993 ; Gorelick et Reeder, 1993).

Les méthodologies évoluent et les techniques actuelles par spectrométrie de masse permettent des détections de l'ordre de la femtomole (Lay *et al.*, 1993).

Ce test a été appliqué aux poissons et aux moules (*Mytilus galloprovincialis*) vivant dans des zones polluées (Dunn *et al.*, 1987; Kurelec *et al.*, 1988). Ce test a également été réalisé pour déterminer la génotoxicité d'effluents industriels.

Avec l'étude des micronucleus, il fait partie des tests de génotoxicité du programme européen de génotoxicité de l'environnement (Marafante *et al.*, 1991). Toutefois, il n'est pas inclus dans les lignes directrices de l'OCDE.

La demi-vie des adduits est assez longue (3 à 4 semaines), cette méthode s'applique donc à des études de génotoxicité aiguës et chroniques.

Le taux d'adduits permet aussi de nous renseigner sur la capacité d'activation et sur la dose réelle absorbée. **Le taux d'adduits à l'ADN est considéré comme un marqueur d'exposition.**

2. Echanges de chromatides soeurs

Le taux d'échange de chromatides soeurs (SCE) constitue un test à cours terme destiné à déceler les échanges réciproques d'ADN entre deux chromatides-soeurs d'un chromosome se dédoublant. Le processus d'échange implique probablement une cassure et une réunion de l'ADN, bien que l'on sache peu de chose de sa base moléculaire.

Cet essai fait appel à un système qui permet de différencier les deux chromatides soeurs (incorporation de BrdU) et ainsi de visualiser les échanges.

Ce test est surtout réalisé *in vitro* et nécessite l'utilisation préalable d'un système exogène d'activation métabolique. Il a permis de mettre en évidence le potentiel clastogène des rejets urbains et des effluents industriels (Houk, 1993).

Il est applicable *in vivo*, il a été utilisé pour évaluer la génotoxicité d'un environnement pollué (rejet industriel) sur les poissons et les amphibiens (Van der Gaag *et al.*, 1990).

Une corrélation est établie avec le pouvoir cancérigène de certaines classes chimiques et la base de données est importante chez l'homme et les rongeurs. Cependant, l'analyse des métaphases est longue et les conséquences des SCE sont mal connues.

3. Test d'éluion alcaline

Ce test est basé sur le principe que les lésions simple brin de l'ADN sont alcali-sensibles. Ces sites sont des indicateurs des dommages génétiques causés par les agents alkylants, molécules interagissant avec l'ADN en des sites multiples. Après hydrolyse en milieu basique, on obtient des fragments d'ADN d'autant plus petits qu'on aura de lésions. Le taux d'ADN double brin restant est inversement proportionnel au nombre de ruptures présentes.

Les cassures simple brin de la molécule d'ADN sont augmentées chez les poissons exposés au benzo(a)pyrène (Shugart 1988a, 1988b), ou à des sédiments (Habig et Di Giulio, 1988). Dans des zones contaminées par des PAH et du Cadmium, la fréquence de cassures simple brin est augmentée dans le foie de *Lepomis auritus* et *Arius folis* (Everaats *et al.*, 1991). Dans des zones contaminées par des PAH, une augmentation significative des cassures d'ADN est également observée chez les mollusques (Nacci, 1992).

Cette méthode est assez sensible, elle permet de détecter des taux faibles de dommages de l'ADN (Freeman *et al.*, 1986). Elle permet d'établir une corrélation entre les cassures et l'activité cancérigène et mutagène.

4. Réparation de l'ADN

4.1 Test sur cellules procaryotes

Un des tests couramment utilisés est basé sur l'activité des systèmes de réparation de l'ADN appelé "Rec assay" (Kada *et al.*, 1974). Ce test, réalisé chez *Bacillus subtilis*, utilise deux souches différentes, une souche sauvage pour les enzymes de recombinaison (réparation), rec +, et une souche mutante pour ces fonctions, rec-. L'altération de l'ADN est létale pour les souches rec- et est déterminée par comparaison entre les deux souches. Lors de la réparation de l'ADN bactérien, il y a réplication du prophage qui forme des particules virales intactes.

Le test d'induction du prophage lambda chez *E. coli* (Rossman *et al.*, 1984) est complémentaire au test d'Ames. La réponse au test d'Ames était négative pour des composés chlorés (Houk et DeMarini, 1987; DeMarini et Brooks, 1991) des métaux (Rossman *et al.*, 1984) et des solvants (DeMarini *et al.*, 1991) et positive pour ce test.

Ces deux tests sont fréquemment utilisés pour étudier la génotoxicité des effluents industriels (Houk, 1992).

4.2 Test sur cellules eucaryotes

La mesure de la synthèse non programmée de l'ADN (Unscheduled DNA Synthesis : UDS) met en évidence la réparation de l'ADN après excision et élimination d'un fragment d'ADN contenant la région lésée. Les cellules qui ne synthétisent pas d'ADN (cellules en phase G0 du cycle cellulaire), n'incorporent pas de thymidine tritiée. Les cellules ayant subi des lésions de leur ADN le réparent et donc incorporent la thymidine. On peut déterminer l'incorporation de Thymidine marquée (Tritium ou fluorochrome) en examinant, par autoradiographie ou par comptage en scintillation liquide ou en fluorescence, l'ADN provenant de cellules traitées.

Réalisé *in vitro* sur fibroblastes humains pour tester la génotoxicité des effluents industriels, ce test n'a pas donné de résultats reproductibles. *In vivo*, la réparation de l'ADN a été observée chez *Pseudopleuronectes americanus* présentant par ailleurs des lésions hépatiques et vivant dans un environnement contaminé par des PAH (Moore et Stegman, 1991).

Ce test *in vitro* pourrait être appliqué aux cultures primaires d'hépatocytes de poissons.

PROPOSITION DES RECHERCHES EN GENOTOXICITE

Plusieurs phases constitueront ce projet mais il convient tout d'abord de résumer les connaissances acquises dans le domaine de la mutagenèse et de la cancérogenèse et sur la base desquelles pourrait être établi ce projet.

Les mécanismes aboutissant à la cancérogenèse, depuis l'exposition à un cancérigène chimique, peuvent être présentés de manière conceptuelle. Les différentes classes de marqueurs ont été développés sur cette base (Schéma F) :

- la mesure des adduits à l'ADN et aux protéines constituent des **marqueurs d'exposition et de dose réelle absorbée**
- selon le cancérigène, le tissu ou le type cellulaire, la répartition des adduits à l'ADN peut être encore modifiée suite à l'intervention des systèmes de réparation (efficacité, fidélité de la réparation)
- l'absence de réparation entraîne alors l'établissement d'une mutation, **effet biologique précoce**, pouvant être à l'origine des événements initiant la transformation. Ces altérations peuvent être détectées en mesurant :
 - le taux de SCE ou de micronoyaux = **marqueurs cytogénétiques**
 - les mutations sur un gène présentant un avantage sélectif, HPRT, HLA...= **marqueurs de mutagenèse**
 - les mutations survenues dans les gènes *ras*, p 53 = **marqueurs de cancérogenèse**
- l'expansion clonale de cellules mutées contribue à augmenter le nombre d'altérations génétiques (mutations, amplification géniques, délétions), évoluant progressivement vers le phénotype cancéreux

Dans le cadre de propositions de recherches en génotoxicité de l'environnement marin, le choix des tests d'évaluation repose sur :

- les données acquises chez les vertébrés supérieurs au cours des études de mutagenèse et de cancérogenèse
- les connaissances, encore très limitées, dans le domaine de la cancérogenèse chez les poissons et les mollusques
- les difficultés méthodologiques
- leurs applications à une étude systématique sur des organismes marins

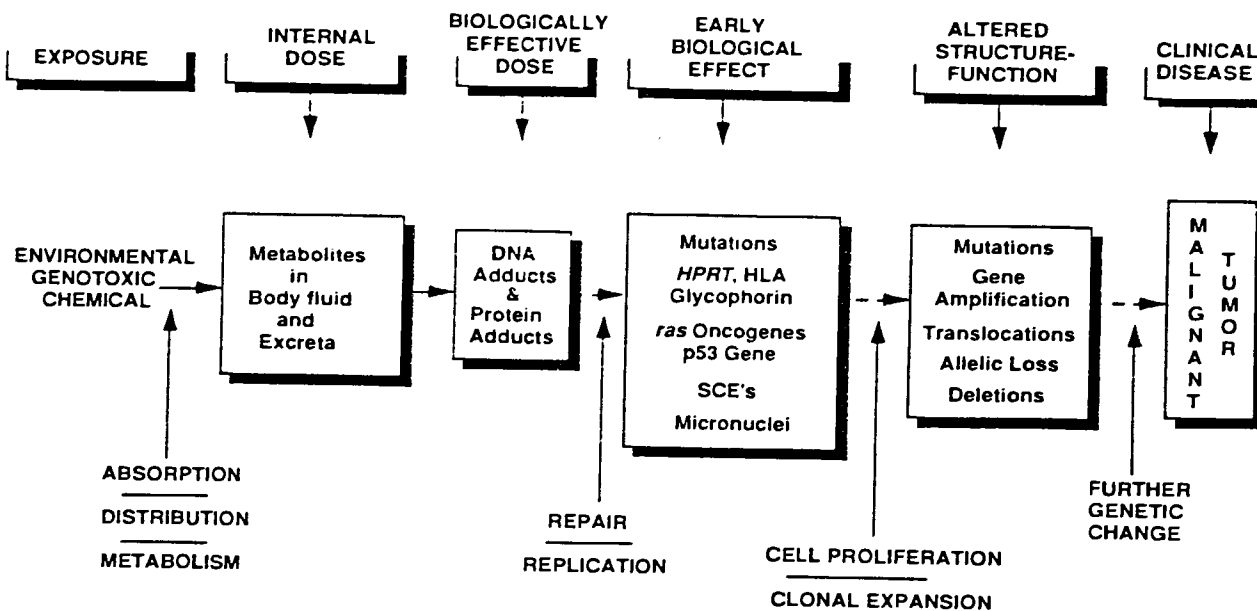


Schéma F : Bases conceptuelles pour le développement de biomarqueurs et leur application en épidémiologie moléculaire (d'après G. N. Wogan).

Il est clair que la génotoxicité associée à l'environnement marin ne peut être déterminée par un seul essai. La diversité des effets génétiques empêche généralement d'en détecter plus d'un avec un seul système d'essai.

Il serait donc souhaitable de pouvoir répondre aux questions suivantes :

Les organismes vivant dans un environnement marin présentent-ils :

- des altérations primaires de l'ADN ?
- des mutations géniques ?
- des mutations chromosomiques ?

Chez les mammifères et les rongeurs, de nombreuses données suggèrent que des cancers d'origines différentes partagent des mécanismes tel que l'activation des oncogènes et l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs. Grâce à ces connaissances, l'analyse moléculaire des mutations géniques est possible dans le diagnostic du cancer chez l'homme.

Chez les poissons et les mollusques, la connaissance plus approfondie de la structure des génomes, de la nature des lésions, des mécanismes de la cancérogenèse est nécessaire pour une analyse moléculaire de la mutagenèse.

Avant d'entreprendre de telles études, il serait préférable de s'assurer du pouvoir mutagène des molécules présentes dans cet environnement par des études de mutagenèse utilisant des essais à court terme.

Enfin la génotoxicité de l'environnement marin risque d'être différente selon les organismes marins (capacités métaboliques, ampleur de l'exposition et de la répartition). Il est nécessaire d'effectuer une étude histo-pathologique sur les différents organismes et il serait souhaitable que ces études soient associées à la caractérisation chimique de l'environnement marin dans lequel vivent les espèces étudiées et à la détermination des éléments chimiques d'origine anthropiques dans les organismes.

RECHERCHES SUR LA STRUCTURE DU GENOME :

DEVELOPPEMENT POUR L'ANALYSE EN TOXICOLOGIE GENETIQUE

Cette étude demande dans un premier temps de connaître parfaitement la séquence des gènes choisis pour les études de mutagenèse. Dans un deuxième temps la mise au point d'une technique de détection des mutations sera effectuée.

Ce travail sera long, il serait donc également nécessaire d'envisager des études de mutagenèse plus classiques qui permettraient d'obtenir des informations plus rapidement (voir tests détaillés dans la 2ème partie du projet).

Nous avons vu que l'étude des mutations géniques chez les vertébrés supérieurs est réalisée sur des gènes présentant un avantage sélectif (HPRT le plus souvent) ou à partir des oncogènes (*ras*, p53).

Ni la séquence, ni la protéine correspondant à un gène présentant un avantage sélectif ne sont décrites chez les poissons et les mollusques.

Par contre, en ce qui concerne les oncogènes, chez *Pleuronectes americanus* vivant dans des zones contaminées en PAH (Boston Harbor), des lésions hépatiques cancéreuses ont été observées et l'oncogène *Ki-ras* muté au niveau du codon 12 a été mis en évidence (Mc Mahon *et al.*, 1990). Plus tard, Moore et Evans (1992) ont mis en évidence la protéine *N-ras* mutée chez *Limanda limanda* vivant en présence de sédiments contaminés de la mer du Nord. Cependant aucune séquence d'un gène *ras* n'est encore connue chez les poissons marins.

Ces résultats ont orienté notre choix vers l'étude des mutations de l'oncogène *ras*.

Plus qu'un marqueur de mutagenèse, ce gène est également un marqueur précoce du développement tumoral chez les vertébrés supérieurs.

Cette étude, si elle est associée à des analyses histo-pathologiques, aura également pour objectif de comparer les mécanismes précoces du développement tumoral chez les vertébrés inférieurs et supérieurs.

Le choix des espèces et des tissus à analyser repose sur les résultats acquis au laboratoire. Les travaux réalisés sur le foie de *Callionymus lyra* et *Limanda limanda* ont montré que l'éthoxyresofurine-O-deéthylase (EROD) était fortement induite dans des sites contaminés du littoral français (Baie de Seine) (Galgani *et al.*, 1992). Compte tenu de ces résultats, il apparaît donc particulièrement intéressant de mener cette étude sur ces espèces. Toutefois, ce travail débutera sur le Callionyme, espèce ayant une plus large répartition sur le littoral français que la Limande (Manche et Atlantique).

I. DETECTION DES MUTATIONS DE L'ONCOGENE RAS CHEZ LES CALLIONYMES

La recherche de la séquence du proto-oncogène *Ha-ras* chez le Callionyme a été entreprise en exploitant la conservation des séquences de proto-oncogènes et en appliquant les techniques d'hybridation moléculaire et d'amplification élective (PCR). Toutefois pour avancer les recherches, il serait souhaitable de poursuivre la recherche de protéine *ras* mutée à l'aide d'anticorps spécifiques.

1. Recherche de protéine p21 ras mutée : étude préliminaire basée sur la séquence de saumon

Il faut préciser que la séquence de l'oncogène *ras* est connue chez le saumon. Au niveau du codon 12, elle est identique à la séquence humaine, ce qui justifie l'emploi des anticorps humains pour ce travail.

Ce travail a débuté par la recherche de la protéine p21 ras chez le callionyme échantillonné en Baie de Seine (Mars 93) par la technique de Western blot. Il est réalisé sur des Callionymes échantillonnés sur un site de référence – activité EROD la plus faible – et un site où l'activité EROD est la plus forte.

2. Clonage et séquençage de l'ADNc ras

Le séquençage du gène *ras* dans sa totalité est difficilement envisageable compte tenu du temps nécessaire pour ce travail. Seule la séquence correspondant aux exons 1 et 2 (régions où sont situées les mutations chez les vertébrés supérieurs) apparaît indispensable à notre étude. Nous envisageons donc de séquencer les régions exoniques.

Afin de s'affranchir des introns, la séquence d'ADN complémentaire (ADNc) synthétisé *in vitro* par transcription inverse à partir des ARN messagers extraits chez le Callionyme.

Les fragments d'ADNc sont ensuite synthétisés en grande quantité par PCR pour permettre soit un séquençage direct sur produits PCR, soit le clonage suivi du séquençage.

Avant de disposer de Callionyme, une étude préliminaire chez la Feuille échantillonnée en Méditerranée a été effectuée afin de déterminer les conditions optimales pour la transcription inverse.

Le séquençage des exons 1 et 2 vient d'être effectué chez le Callionyme, la recherche de la taille du transcrit et l'étude de son expression sont en cours. Les conséquences de ce travail sont la recherche de mutations ponctuelles.

3. Détection des mutations ponctuelles

Parmi les techniques citées plus haut, deux restent particulièrement intéressantes et applicables à la recherche systématique de mutations ponctuelles :

- l'amplification élective (MSPA),
- l'analyse des RFLP.

L'amplification élective offre l'avantage de mettre en évidence une mutation présente en proportion minoritaire et l'analyse des RFLP est intéressante et sans doute plus rapide.

Afin de s'assurer des conditions optimales d'analyses (spécificité de la PCR, digestion enzymatique complète), il est conseillé de recourir soit à une hybridation finale avec une sonde spécifique du gène *ras*, soit au micro-séquençage pour chaque échantillon.

Des témoins positifs correspondant aux différentes mutations possibles (ADN de lignées cellulaires exprimant le gène muté) doivent être réalisés pour permettre d'interpréter les résultats. Ces témoins sont d'autant plus utiles que le micro-séquençage n'est pas envisageable pour une étude comprenant un grand nombre d'échantillon.

Ce travail comprend les étapes suivantes :

- détermination des conditions optimales pour l'étude des fragments de restriction : choix de l'enzyme de restriction, des primers ;
- choix des lignées cellulaires témoins exprimant la mutation ;
- détermination des conditions optimales pour l'hybridation différentielle : marquage de la sonde (radioélément ou chemiluminescence).

La technique adoptée pour l'analyse des mutations devra prendre en compte les paramètres suivants et nécessite au préalable une étude comparative (méthodes MSPA et RFLP) :

- fiabilité,
- sensibilité,
- reproductibilité,
- application à une étude systématique sur un grand nombre d'échantillons.

La mise au point de la technique sera suivie d'une étude sur un site comme la baie de Seine.

Il serait intéressant d'analyser des échantillons de mer du Nord, pouvant servir de références dans notre étude, compte tenu des résultats obtenus par Moore et Evans (1992) en mer du Nord (protéine N-*ras* mutée chez la Limande). Dans ce cadre, ce travail pourrait donner lieu par la suite à une collaboration avec des équipes étrangères.

Ce travail sur la baie de Seine pourrait comprendre les études suivantes :

- 1) l'analyse de l'activité EROD
- 2) caractérisation chimique de l'environnement marin dans lequel vivent les espèces étudiées
- 3) détermination des éléments chimiques d'origine anthropique dans les organismes
- 4) l'analyse des mutations
- 5) l'analyse histo-pathologique des tissus hépatiques

II. CULTURE DE CELLULES DE POISSONS : GENE HPRT

Comme nous l'avons vu, les mutations géniques peuvent être mise en évidence sur des cellules eucaryotes en culture au locus de gènes présentant un avantage sélectif. Le gène codant pour l'enzyme Hypoxanthine-guanine Phosphorybosyl Transférase (HPRT) est sans doute le mieux caractérisé chez les vertébrés supérieurs.

Ce test est très utilisé en tant que test *in vitro* pour déterminer le pouvoir mutagène d'agents génotoxiques et d'effluents industriels. Il pourrait être appliqué directement *in vivo* sur des lymphocytes de poissons vivant dans des sites contaminés.

Plusieurs raisons peuvent encourager le développement de ces études chez le poisson. Ce test présente de nombreux avantages :

- réalisé *in vivo*, il fait intervenir le métabolisme de l'animal ;

- de part sa taille (41,5 Kb chez l'homme), ce gène est *particulièrement sensible aux agents génotoxiques* ;
- ce gène présente un *avantage sélectif* en culture cellulaire.

Les conséquences de cet avantage sélectif sont :

- la **simplicité**, la **fiabilité** et la **rapidité** de l'analyse en culture cellulaire.

Par le suite, l'étude qualitative en biologie moléculaire permettant de déterminer le type de mutations est envisageable mais n'est pas indispensable.

Cependant, chez le poisson, ce travail demande des études préliminaires.

Il faut tout d'abord mettre en évidence le gène HPRT par les techniques de biologie moléculaire et réussir à maintenir en culture les lymphocytes de poissons marins. De nombreux travaux sont réalisés sur les cellules de truites et pourraient nous aider à mettre au point cette technique.

ETUDES DE MUTAGENESE : ESSAIS A COURT TERME

I. MICRONOYAUX

Ce test de génotoxicité couramment utilisé dans le milieu médical a été normalisé chez les amphibiens (A. Jaylet, 1987). Développé chez les poissons marins (R Kenneth *et al.*, 1990) et d'eau douce (Williams et Metcalfe, 1992), il a été étendu aux bivalves marins tels que *Mytilus galloprovincialis* (Majone *et al.*, 1990 ; Brunetti *et al.*, 1992) et aux bivalves d'eau douce, l'Anodonte (Scarpato *et al.*, 1990).

Le laboratoire d'Ecotoxicologie de Nantes travaille actuellement sur la mise au point du test micronucleus sur l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) pour la surveillance de sites contaminés.

II. ANALYSE DES CARYOTYPES ELECTROPHORETIQUES

Cette technique connaît un développement important dans l'étude des mutations géniques. Les mutations peuvent porter sur plusieurs paires de bases, provoquer des insertions ou des délétions dans le gène. Ces modifications de structure pourront être détectées par caryotype électrophorétique après électrophorèse en champs pulsé. Une étude est en cours chez la moule *mytilus edulis* (hépatopancréas et branchie) et le mulot *Mullus barbatus* (foie) échantillonnés en Méditerranée le long d'un gradient de pollution.

III. TEST D'AMES : METHODE DE FLUCTUATION

Il serait utile de déterminer le pouvoir mutagène associé à l'eau par un test rapide tel que le test d'Ames. Ce test est couramment utilisé pour évaluer la mutagénicité des polluants dans l'eau douce et les sédiments.

Après extraction, concentration et activation des molécules par le S9, ce test d'Ames était réalisé classiquement en milieu solide (agar). La préparation des échantillons est longue et délicate (perte, modification de molécules). Une amélioration a été apportée qui permet de réaliser ce test en milieu liquide (test d'Ames : méthode de fluctuation). Il est réalisé sur les eaux douces sans extraction ni concentration des échantillons et pourrait être appliqué au milieu estuarien.

IV. ADDUITS A L'ADN

Ce test est très souvent utilisé dans les études de génotoxicité de l'environnement. Avec l'étude des micronucleus, il fait partie des tests de génotoxicité du programme européen de génotoxicité de l'environnement.

Les méthodes immunochimiques, immunodosage par ELISA et immunocytochimie, utilisent des anticorps dirigés contre les différentes formes d'adduits pouvant exister (Strickland *et al.*, 1984 ; Den Engelse *et al.*, 1990). En ce qui concerne la sensibilité, les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus par analyse HPLC (Van Delft *et al.*, 1993). Une étude préliminaire sera réalisée en Méditerranée en utilisant des anticorps humains pour déterminer les adduits à l'ADN de PAH.

CONCLUSION

L'évaluation de la génotoxicité de l'environnement marin est une discipline récente. L'utilisation des techniques de biologie moléculaire dans ce domaine est inexistante.

Ce projet devrait contribuer à répondre à différents objectifs.

L'objectif initial est d'évaluer la génotoxicité associée à l'environnement marin, en déterminant l'exposition des poissons et des mollusques à l'environnement présumé génotoxique (marqueur d'exposition) et les risques de mutagenèse et de cancérogenèse (marqueur de risque). On peut obtenir ces informations en mesurant les adduits à l'ADN et en réalisant un test d'Ames.

L'objectif final est de savoir si les organismes marins vivant dans un environnement pollué présentent des altérations génétiques. Il demande la connaissance plus approfondie de la structure du génome. Ces études sont indispensables et permettront d'acquérir les informations nécessaires pour le développement d'analyses moléculaire de la mutagenèse et devront être associées à des études d'histopathologie.

L'association des méthodes de biologie moléculaire, permettant de détecter les altérations de l'ADN et des techniques de cytogénétiques, permettant de révéler l'exposition à un cancérigène, est nécessaire. Elle devrait contribuer dans un premier temps, à élucider le rôle des agents génotoxiques dans la mutagenèse et la cancérogenèse et dans un deuxième temps, à développer une stratégie pour la surveillance biologique.

Enfin, l'utilisation de modèles d'études *in vitro* pourrait contribuer à l'évaluation de la génotoxicité des polluants. Chez les vertébrés supérieurs, la culture cellulaire est un outil indispensable, il serait intéressant de l'adapter chez les poissons marins et les mollusques pour des études de toxicité aiguë mais également dans un autre cadre à l'étude des phénomènes de résistance aux xénobiotiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR (1987). Essais des eaux. Détection en milieu aquatique de la génotoxicité d'une substance vis-à-vis de larves de batraciens (*Pleurodeles walt* et *Amphystoma mexicanum*). Essai des micronoyaux. Association Française de Normalisation, T90-325.
- AMES B.N., McCANN J. & YAMASAKI E. (1975). Method for detecting carcinogens and mutagens with salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutation Res.*, **31**, 347-363.
- ATTARDI G. & SCHATZ G. (1988). Biogenesis of mitochondria. *Ann. Rev. Cell. Biol.*, **4** : 289-333.
- BAILEY G., HENDRICKS J. & DASHWOOD R. (1992). Anticarcinogenesis in fish. *Mutat. Res.*, **267** : 243-250.
- BAILEY G., SELIVONCHICK D. & HENDRICK S. (1987). Initiation, promotion and inhibition of carcinogenesis in rainbow trout. *Environ. Health. Perspect.*, **71** : 147-153.
- BAILEY G.S., GOEGER D.E. & HENDRICKS J.D. (1989). Factors influencing carcinogenesis by polynuclear aromatic hydrocarbons and other genotoxins in laboratory fish models, in : U. VARANASI (Ed.), Metabolism of polynuclear aromatic hydrocarbons in the aquatic environment, CRC Press, Boca Raton, FL : 253-268.
- BALMAIN A. & PRAGNEL I.B. (1983). *Nature*, **303** : 72-74.
- BALMAIN A., RAMSDEN M., BOWDEN G.T. & SMITH J. (1984). Activation of the mouse cellular Harvey-ras gene in chemically induced benign skin papillomas. *Nature*, **307** : 658-660.
- BARBACID M. (1987). Ras genes. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 779-827.
- BARBACID M. (1990). Ras oncogene : their role in neoplasia. *Eur. J. Clin. Invest.*, **20** : 225-235.
- BELAND F.A. & POIRIER M.C. (1993). Significance of DNA adducts studies in animal models for cancer molecular dosimetry and risk assessment. *Environm. Health Perspectives.*, **99** : 5-10.
- BERANEK D.T. (1990). Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.* **231** : 11-30.
- BOS J.L. (1989). Ras oncogenes in human cancer : a review. *Cancer, Res.*, **49**, 4682-4689.
- BRANDT-RAUF P.W. (1991). Oncogene proteins as biomarkers in the molecular epidemiology of occupational carcinogenesis. The example of the ras oncogene encoded p21 protein. *Int. Anch. Occup. Environ. Health.*, **63** (1) : 1-8.
- BROWN K., BUCHMANN A. & BALMAIN A. (1990). Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87** : 538-542.
- BRUNETTI R., FUMAGALLI O., VALERIO P. & GABRIELE M. (1992). Genotoxic effects of anoxia on *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Ecol. Prog. Series*, **83** : 71-74.
- C.E.E. (1992). Communication du conseil concernant le rapprochement des dispositions législatives réglementaires et administratives relatives à la classification, l'emballage et l'étiquetage des substances dangereuses. Directives 92/32/CEE. Journal Officiel des Communautés Européennes, 5 juin 1992.

- CLIVE D., K.O. JOHNSON, J.F.S. SPECTOR, A.G. BATSON & M.M.M. BROWN (1979). Validation and characterization fo the L5178Y/TK⁺/- mouse lymphoma mutagen assay system, *Mutation Res.*, **59** : 61-108.
- COLE M.D. (1986). The myc oncogene : its role in transformation and differenciation. *Annu. Rev. Genet.*, **20** : 361-384.
- CORRAL M., DEFER N. & KRUH J. (1990). Le génome mitochondrial est-il impliqué dans la carcinogénèse ? *Médecine/Sciences*, **6** : 359-366.
- CORRAL M., TICHONICKY L., GUGUEN-GUILLOUZO C., CORCOS D., RAYMONDJEAN M., PARIS B., KRUH J. & DEFER N. (1985). Expression of C-fos oncogene during hepatocarcinogenesis in liver regeneration and in synchronised HTC cells. *Exp. Cell. Res.*, **160** : 427-434.
- COSTA *et al.* (1992). Workshop report from the division of Research Grants, National Institutes of Health. Metal carcinogenesis. A chemical pathology study section workshop. *Cancer Res.*, **52**, 4058-4063.
- COUCH J.A. & HARSHBARGER J.C. (1985). Effects of carcinogenic agents on aquatic animals : an environmental and experimental overview. *Environ. Carcinog. Rev.* **3** : 63-105.
- D'AMICO D., CARBONE D., MITSUDOMI T., NAU M., FEDORKO J., RUSSEL E., JOHSON B., BUCHHAGEN D., BODNER S., PHELPS R., GAZDAR A. & MINNA J.D. (1992). High frequency of somatically acquired p53 mutations in small- cell lung cancer a cell lines and tumors. *Oncogene*, **7**, 339-346.
- DANIELS C.B. & MEANS J.C. (1989). Assessment of the genotoxicity of produced water discharges associated with oil and gas production using fish egg and larval test. Fifth International Symposium on Responses of Marine Organisms to Pollutants, Plymouth, 12-14 April 1989.
- DAVIDOFF A.M., HERNDON J.E., GLOVER N.S., KERNS B.J., PENCE J.C., IGLEHART J.D. & MARKS J.R. (1991). Relation between p53 over expression and established prognostic factors in breast cancer. *Surgery*, **110** (2) : 259-264.
- de SERRES F.J. & ASHBY J. (eds) (1981). Evaluation of short-term test for carcinogens. "Report of the International Collaborative Program, Progress in mutation research" Vol 1. Amsterdam : Elsevier/North-Holland.
- DEARFIELD K.L., AULETTA A.E., CIMINO M.C. & MOORE M.M. (1991). Considerations in the U.S. Environmental Protection Agency's testing approach for mutagenicity. *Mutat. Res.*, **258** : 259-283.
- DEMARINI D.M. & BROOKS H.G. (1991). Induction of prophage lambda by chlorinated organics : Detection of some single-species/single-site carcinogens. *Environ. Mol. Mutagen.*
- DEMARINI D.M. (1991). Environmental Mutagens/Complex Mixtures, in : A.P. Li & R.H. Heflich (Eds.), *Genetic Toxicology*, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 285-302.
- DEN ENGELSE L., VAN BENTHEM J. & SCHERER E. (1990). Immunocytochemical analysis *in vivo* DNA modification. *Mutat. Res.*, **233** : 265-287.
- DEVORET R. (1979). Des tests bactériens pour identifier les cancérogènes potentiels. *Pour la Science*, **24** : 62-76.

- DIAMOND C.E., GUERRERO I & PELLICIER A. (1988) Concomitant K- and N-ras gene point mutations in clonal murine lymphoma. *Mol. Cell. Biol.*, **8** (5) : 2233-2236.
- DIAZ-GUERRA M., QUINTANILLA L., PALMERO I., SASTRE L. & RENART J. (1989). Differential expression of a gene highly homologous to c-ras during the development of the brine shrimp *Artemia*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **162** : 802-808.
- DUNN B., BLACK J. & MACCUBIN A. (1987). ³²P Post labelling analysis of aromatic DNA adducts in fish from polluted areas. *Cancer Res.*, **47** : 6543-6548.
- DURICA D.S., RESTREPO M.A., THOMAS T.L. & BECKINGHAM K. (1987). Isolation and characterization of abl gene sequences in *Calliphora erythrocephala*. *Gene*, **59**, 63-76.
- EHLEN T. & DUBEAU L. (1989). Detection of ras point mutations by polymerase chain reaction using mutation-specific, inosine-containing oligonucleotide primers. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **160**, 441-447.
- EHLER J. *et al.* (1991). Rapid estimation of chromosomal damage in yeast due to the effects on environmental chemicals using pulsed field gel electrophoresis. *Ecotox. Environ. Safety.*, **22** : 133.
- EHRlich M. & YANG R.Y.H. (1981). 5-Methylcytosine in Eukaryotic DNA. *Science*, **212** : 1350-1357.
- EPHRUSSI B. (1953). Nucleoplasmatic relation in microorganisms. Londres - New-York : Oxford University Press.
- EVERAATS J.M., SHUGART L.R., GUSTIN M.K., MORGAN D., MILLSAP D., HAWKINS W.E., HEARD C.R. & BARNES D. (1991). Biological markers in fish : DNA integrity, hematological parameters and liver somatic index. Sixth International Symposium on Responses of Marine Organisms to Pollutants, woods Hole, 24-26 April 1991.
- FARBER (1948). *New England J. Med.* **236** : 787-793.
- FARMER G., BARGONETTI J., ZHU H., FRIEDMAN P., PRYWES R. & PRIVES C. (1992). Wild-type p53 activates transcription *in vitro*. *Nature*, **358** : 83-86.
- FASANO O., ALDRICH T., TAMANOI F., TAPAROWSKY E., FURTH T. & WIGLER M. (1984). Analysis of the transforming potential of the tumor H-ras gene by random mutagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81** : 4008-4012.
- FOJO, A.T., UEDA, K., SLAMON, D.J., POPLACK, D.G., GOTTESMAN, M.M. & PASTAN, I. (1987). Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **84** : 265-269.
- FOJO, A.T., WHANG-PENG, J., GOTTESMAN, M.M. & PASTAN, I. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82** : 7661-7665.
- FREEMAN S.E., BLACKETT A.D., MONTELEONE D.C. SETLOW R.B., SUTHERLAND B.M. & SUTHERLAND J.C. (1986). Quantitation of radiation-, chemical-, or enzyme-induced single strand breaks in non-radioactive DNA by alkaline gel electrophoresis : application to pyrimidine chimers. *Analyt. Biochem.*, **158** : 119-129.
- GALGANI F., BOCQUENE G., TRUQUET P., BURGEOT T., CHIFFOLEAU J.F. & CLAISSE D. (1992). Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the french coasts. *Oceanologica Acta*, **15** : 355-364.

- GARDNER G.R., PRUELL R.J. & MALCOLM A.R. (1991). Tumor induction in oysters by a mixtures of aromatic and chlorinated hydrocarbons, aromatic amines and metals. Sixth International Symposium on Responses of Marine Organisms to Pollutants, Woods Hole, 24-26 April 1991.
- GARRIOTT M.L., ADAMS E.R., PROBST G.S., EMMERSON J.L., OBERLY T.J., KINDIG D.E.F., NEAL S.B., BENSEY B.J. & REXROAT M.A. (1991). Genotoxicity studies on the preemergence herbicide Trifluralin. *Mutation Res.*, **260** : 187-193.
- GIAM C.S., HOLLIDAY T.L., WILLIAMS J.L. & HINTOW D.E. (1989). Laser desorption/ionization FT-ICR-Mas spectrometry of DNA adduct bases, nucleosides and nucleotides. Fifth International Symposium on Responses of Marine Organisms to Pollutants, Plymouth, 12-14 April 1989.
- GODDARD J., WEILAND J.J. & CAPECCHI M.R. (1986). Isolation and characterization of *Caenorhabditis elegans* DNA sequences homologous to the v-abl oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 2172-2176.
- GORELICK N.J. & REEDER N.L. (1993). Detection of multiple polycyclic aromatic hydrocarbon. DNA adducts by a high, performance liquid chromatography, ³²P post labeling method. *Environm. Health Persp.*, **99** : 207-211.
- GOYNS M.H. & HANCOCK B.W (1991). Importance of oncogene research to the cancer clinician. *Clin. Oncol.*, **3** (3) : 168-176.
- GROS, P, BEN NERIAH, Y, CROOP, J.M. & HOUSMAN, D.E. (1986). Isolation and expression of a cDNA (mdr) that confers multidrug resistance. *Nature(London)*. **323** : 728-731
- HABIG C. & DIGUILIO R. (1988). Free radical mediated effects in channel catfish exposed to contaminated sediments. Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Ninth Annual Meeting.
- HANNA G.K., BANERJEE G. & GUPTA S. (1985). Micronucleus test in the peripheral erythrocytes of the exotic fish *Oreochromis massambica*. *The nucleus.*, **28** (3) : 176-179.
- HARADA T., HATANAKA J., KUBOTA S.S. & ENOMOTO M. (1990). *Lymphoblastic lymphoma* in medaka, *Oryzias latipes* (Temminck et Schlegel). *J. Fish Dis.*, **13**, 169-173.
- HASHIZUME T., VEDA K., TOKUTZU S., HANAWA I. & KINAE N. (1992). Monitoring of mutagens in river and marine sediments by salmonella/microsome assay combined with blue cotton method. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **49** : 497-503.
- HAWKINS W.E., FOURNIE J.W., OVERSTREET R.M. & WALKER W.W (1986). Intraocular neoplasms induced by methylazoxymethanol acetate in the medata (*Oryzia latipes*). *J. Natl.. Cancer. Inst.*, **76** : 453-465.
- HAWKINS W.E., OUERSTREET R.M., FOURNIE J.W. & WALKER W.W. (1985). Development of aquarium fish models for environmental carcinogenesis tumor induction in seven species. *J. Appl. Toxicol.*, **5** : 261-264.
- HELTON D.W., KONECKI D.S., BRENNAND J. & CASKEY C.T. (1984). Structure, expression and mutation of the hypoxanthine phosphoryboxyltransferase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81** : 2147-2151.

- HOSE J.E. (1985). Potential uses of sea urchin embryos for identifying toxic chemicals : description of a bioassay incorporating cytologic, cytogenetic and embryologic endpoints. *Journal of Applied Toxicology*, **5** (4) : 245-254.
- HOSE J.E., CROSS J.N., SMITH S.G. & DIEHL D. (1987). Elevated circulating erythrocyte micronuclei in fishes from contaminated sites off Southern California. *Mar. Environm. Resear.*, **22** : 167-176.
- HOUK U.S. & DEMARINI D.M. (1987). Induction fo prophage lambda by chlorinated pesticides. *Mutation Res.*, **182**, 193-201.
- HOUK U.S. (1992). The genotoxicity of industrial waters and effluents. *Mutat. Res.*, **277** : 91-138.
- HUBBARD S.A., GREEN M.H.L., GATEHOUSE D. & BRIDGES J.W. (1984). The fluctuation test in bacteria. In : Handbook of mutagenicity test procedures ; Ed. B.J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols C. Ramel, Pub. : Elsevier Science Publisher BV.
- JANSEN J.G., VRIELING H., VAN ZEELAND A.A. & MOHN G.R. (1992). The gene encoding hypoxanthine-guanine phosphoryboxyl and sequencing of the cDNA from the rat. *Mutat. Res.*, **266** : 105-116.
- JAYLET A., GAUTHIER L. & FERNANDEZ M. (1987). Detection of mutagenicity in drinking water using a micronucleus test in newt larvae (*Pleurodeles walt*), *Mutagenesis*, **2** (3) : 211-214.
- JENKE H.S., MICHEL G., HORNHARDT S. & BERNDT J. (1991). Protooncogene expression in rat liver by polychlorinated biphenyls (PCB). *Xenobiotica*, **21** : 945-960.
- JOLLY D., OKAYAMA M., BERG P., ESTY A.C., FILPULA D. *et al.* (1983). Isolation and characterisation of a full-length expression cDNA for human hypoxanthine phosphorylboxyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80** : 477-481.
- JONES I.M., BURKHART-SCHULTZ K. & CARRANO A.V. (1985). A method to quantify spontaneous and *in vivo* induced thioguanine-resistant mouse lymphocytes. *Mut. Res.*, **147** : 97-105.
- JONGEN W.F.F, CARDINAALS J.M., BOS P.M.J. & HAGEL P. (1985). Genotoxicity testing of arsenobetaine, the predominant form of arsenic in marine fishery products. *Food. Chem. Toxicol.*, **23** : 669-673.
- JULIANO R.L. & LING V. (1976). A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochem. Biophys. Acta*, **455** : 152-162.
- KADA T., MORIJA M. & SHIRASU (1974). Screening of pesticides for DNA interactions by REC-assay and mutagenic testing and frameshift mutagens detected. *Mutation Res.*, **26**, 243.
- KAFER E., B.R. SCOTT, DORN G.L. & R. STAFFORD (1982). *Aspergillus nidulans* : Systems and results of tests for chemical induction of mitotic segregation and mutation. I. Diploid and duplication assay systems. *Mutation Res.*, **98** : 1-48.
- KAPLAN J.C. & DELPECH M. (1990). Biologie moléculaire et médecine. (Flammarion, Médecine Sciences).
- KARTNER, N., EVERNDEN-PORELLE, D., BRADLEY, G & LING, V. (1985). Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature (London)*. **309** : 626-628.

- KELLY K., COCHRAN B.H., STILES C.D., LEDER P. (1983). Cell specific regulation of the c-myc gene by lymphocyte mitogens and platelet-derived growth factor. *Cell.*, **35** : 603-610.
- KENNETH R. CARRASCO, KAREN L. TILBURY & MARK S. MYERS (1990). Assessment of the micronucleus test : an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. *Can J. Fish. Aquat. Sci.*, **47** : 2123-2136.
- KÖBERLE B., RÖSCHEISEN C., HELBIG R. & SPEIT G. (1993). Molecular characterization of methyl methanesulphonate (MMS) induced HPRT mutations in V79 cells. *Mutat. Res.*, **301** : 65-71.
- KOBUSH A.B., FISHER G. & BOCK K.W. (1989). Tumor promoting activity and cytotoxicity of 3, 4, 3', 4'-Tetrachlorobiphenyl on N-Nitrosomorpholine induced murine liver foci. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, **115** : 247-252.
- KONECKI D.S., BRENNAND J., FUSCOE J.C., CASKEY C.T. & CHINAULT A.C. (1982). Hypoxanthine guanine phosphoribosyltransferase genes of mouse and chinese hamster : construction and sequence analysis of cDNA recombinants. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6763-6775.
- KUMAR R., SUKUMAR S. & BARBACID M. (1990). Activation of ras oncogenes preceding the onset of neoplasia. *Science*, **248** : 1101-1104.
- KURELEC B., CHACKO M., GUPTA R.C. (1988). Postlabelling analysis of carcinogen-DNA adducts in mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.*, **24** : 317-320.
- KURELEC B., KRCA S., PIVCEVIC B., UGARKOVIC D., BACHMANN M., IMSIECKE G. & MÜLLER W. E. G. (1992). Expression of P-glycoprotein gene in marine sponge. Identification and characterization of the 125 KDa drug-binding glycoprotein. *Carcinogenesis* **13** : 69-76.
- LAFaurie M. (1991). Les effets génotoxiques et cancérigènes utilisés comme biomarqueurs de contamination. *Océanis*, **17** : 475-496.
- LAND H., PARADA L. & WEINBERG R.A. (1983). Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. *Science*, **222** : 771-778.
- LANDOLT M.L. & KOCAN R.M. (1983). Fish cell cytogenetics : A measure of the genotoxic effects of environmental pollutants. In : *Aquatic toxicology* (Nriagu, J.R. Ed), New-York, John Wiley and Sons, 336-353.
- LATT S.A., J.W. ALLEN, E.E. ROGERS & L.A. JUERGENS (1977). *In vitro* and *in vivo* analysis of sister chromatid exchange formation, in : B.J. Kilbey *et al.*, (Eds.), Handbook of Mutagenicity Test Procedures. *Elsevier, Amsterdam*, pp. 275-291.
- LAY J.O., CHIARELLI M.P., BRYANT M.S. & R.W. NELSON (1993). Detection and characterization of DNA adducts at the femtomole level by desorption ionization mass spectrometry. *Environm. Health Perspect.*, **99** : 191.193
- LE CURIEUX F., MARZIN D. & ERB F. (1993). Comparison of three short-term assays : results on 7 chemicals. Potential contribution to the control of water genotoxicity. *Mutation Res.* (in press).
- LECH J.J. & VODICNIK M.J. (1981). Biotransformation of chemicals by fish : an overview. In : Use of small fish species in carcinogenicity testing (Greenwald P. ed) : 355. Proc of a symp. held at Lister Hill Center, Bethesda, Maryland, December 8 to 10.
- LEVINE A.J., NOMAND J. & FINLAY C.A. (1991). The p53 tumor suppressor gene. *Nature*, **351** : 453-456.

- LOHMAN P.H.M., MENDELSHOHN M.C., MOORE D.H., WATERS M.D., BRUSICK D.J., ASHBY J. & LOHMAN W.J.A. (1992). International Commission for protection against environmental mutagens and carcinogens (ICPEMC) : a method for comparing and combining short-term genotoxicity test data : the basic system. *Mutation Res.*, 266, 7-25.
- Mac GREGOR J.T., WEHR C.M. & GOULD D.M. (1980). Clostogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes : the basis of an improved micronucleus test. *Environ. Mutagen.* 2 (4) : 509-514.
- Mac MAHON G., HUBER L.J., MOORE M.J., STEGEMAN J.J. & WOGAN G.N. (1990). C-k-ras oncogenes : prevalence in livers of winter flounder from Boston Harbor. In : Biomarkers of environmental contamination (Mc Carthy J.F., Shugart L.R. eds) : 229-235. Lewis publishers.
- Mac MAHON G., HUBER L.J., STEGEMAN J.J. & WOGAN G.N. (1988). Identification of a c-Ki-ras oncogene in a neoplasm isolated from Winter Flounder. *Mar. Environ. Res.*, 24 : 345-350.
- MACCUBIN A.E. & ERSING N. (1991). Mutagenic potential of sediments from the Grand Calumet River. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47 : 308-315.
- MADAULE P. & AXEL R. (1985). A novel ras-related gene family. *Cell*, 41 : 31-40.
- MAEHLE L., METCALF R.A., RYBERG D., BENETT W.P., HARRIS C.C. & HAUGEN A. (1992). P53 gene structure and expression in human epithelial cells after exposure to Nickel. *Cancer Res.*, 52 : 218-221.
- MAJONE F., BRUNETTI R., FUMAGALL O., GABRIELE M. & LEVIS A.G. (1990). Induction of micronuclei by mitomycin C and colchicine in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mutation Res.*, 244 : 147-151.
- MANAM S., STORER R.D., PRAHALADA S., LEANDER K.R., KRAYNAK A.R., LEDWITH B.J., VAN ZWIETEN M.J., BRADLEY M.O. & NICHOLS W.W. (1992). Activation of the Ha-Ki-, and N-ras genes in chemically induced liver tumors from CD-1 mice. *Cancer Res.*, 52 : 3347-3352.
- MANGOLD K., CHANG Y.J., MATHEWS C., MARIEN K., HENDRICKS J. & BAILEY G. (1991). Expression of ras gene in Rainbow Trout liver. *Mol. Carcinog.*, 4 : 97-102.
- MARAFANTE E., SORS A., FARMER P., NATARAJAN A.T., SORSA M. & WATERS R. (1991). Biomonitoring of human population exposure to environmental genotoxic chemicals : the EEC project. *New Horizons in Biological Dosimetry*, 433-442.
- MARSH J.W., CHIPMAN J.K. & LIVINGSTONE D.R. (1991). Metabolic activation of carcinogens by three marine invertebrates. Sixth International Symposium on Responses of Marine Organisms to Pollutants, Woods Hole, 24-26 April 1991.
- MARSHALL C.J., VOUSDEN K.H. & PHILLIPPS D.H. (1984). Activation of c-Ha-ras-1 protooncogene by *in vitro* modification with a chemical carcinogen, benzo [a] pyrene diol-epoxide. *Nature*, 310 : 586-589.
- MASAHITO P., ISHIKAWA T. & SUGANO H. (1988). Fish tumors and their importance in cancer research. *Jpn. J. Cancer. Res.* 79 : 545-555.
- MÄUELER W., RAULF F. & SCHARTL M. (1988). Expression of protooncogenes in embryonic, adult and transformed tissue of xiphophorus (Teleostei : Poecillidae). *Oncogene*, 2 : 421-430.

- MEANS J.C., DANIELS C.B. & BAKSI S.M. (1988). Development of *in vivo* genotoxicity tests in Estuarine fish and their application to aquatic toxicology. *Marine Environ. Resear.*, **24** : 327-331.
- METCALFE R.A., WELSH J.A., BENNETT W.P., SEDDON M.B., LEMMAN T.A., PELIN K., LINNAINMAA K., TAMMILEHTO L., MATTSON K., GERWIN B.I. & HARRIS C.C. (1992). P53 and Kirsten-ras mutations in human mesothelioma cell lines. *Cancer Res.*, **52** : 2610-2615.
- MIFFLIN D. & ROBINSON J.J. (1988). Proto-oncogène homologous sequences in the sea urchin genome. *Bioscience Reports*, **8**, 415-419.
- MINIER C. & F. GALGANI. (1993). Multi-xenobiotic resistance in *Mytilus edulis*. *Mar. Environ. Res.* Soumis.
- MINIER C., F. AKCHA & F. GALGANI. (1993). P-glycoprotein expression in *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* in polluted seawater. *Comp. Biochem. and Physiol.* Sous presse.
- MIX M.C. & SHAFFER R.L. (1979). Benzo(a)pyrene concentrations in mussels (*Mytilus edulis*) from Yaquina Bay, Oregon, during June 1976. May 1978. *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, **23** : 677-684.
- MIX M.C. (1986). Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants : a critical literature review. *Mar. Environ. Res.*, **20** : 1-141.
- MOORE M.J. & STEGEMAN J.J. (1991). The use of endoscopy and bromodeoxyuridine incorporation to evaluate cell proliferation associated with fish liver neoplasia. Sixth International Symposium on Responses of Marine Organisms to Pollutants, Woods Hole, 24-26 April 1991.
- MOORE M.N. & EVANS B. (1992). Detection of ras oncoprotein in liver cells of Flatfish (Dab) from a contaminated site in the North Sea. *Mar. Environ. Res.*, **34** : 33-38.
- MOORE M.N. & LOWE D.M. (1979). The cytology and occurrence of granulocytomas in mussels. *Mar. Pollut. Bull.*, **10** : 137-141.
- MOUSTACCHI E. (1983). Mutagénèse et toxicologie génétique. Colloque INSERM, **119** : 11-14.
- MURCHELANO R.A. & WOLKE R.E. (1991). Neoplasms and non neoplastic liver lesions in winter flounder, *Pseudopleuronectes americanus*, from Boston Harbor, Massachusetts. *Environ. Health Perspect.*, **90** : 17-26.
- MYERS M.S., LANDAHL J.T., KRAHN M.M. & McCAIN B.B. (1991). Relationships between hepatic neoplasms and related lesions and exposure to toxic chemicals in marine fish from the U.S. West coast. *Environ. Health. Perspect.*, **90** : 7-15.
- NACCI D., NELSON S., NELSON W. & JACKIM E. (1992). Application of the DNA alkaline unwinding assay to detect DNA strand breaks in marine bivalves. *Marine Environ. Res.*, **28** : 333-337.
- NELSON M.A., FUTSCHER B.W., KINSELLA T., WIMER J. & BOWDEN G.T. (1992). Detection of mutant Ha-ras genes in chemically initiated mouse skin epidermis before the development of benign tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89** : 6398-6402.
- NEMOTO N., KODAMA K., TAZAWA A., MAZAHITO P., ISHIKAWA T. (1986). Extensive sequence homology of the gold fish ras gene to mammalian ras genes. *Differentiation*, **32**, 17-23.

- NOEL *et al.*, (1992). Etudes des hémocytes et d'une néoplasie hémocytaire chez les moules *Mytilus edulis* et *Mytilus trossulus* (mollusca, bivalvia). Thèse de doctorat de l'Université de Bordeaux II.
- OCDE (1987). Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. Essais de toxicologie génétique et orientations pour le choix et l'utilisation des essais. Conseil de Septembre 1985.
- OGSTERLE D. & DEML E. (1983). Promoting effect of polychlorinated biphenyl on development of enzyme altered islands in livers of weanling and adult rats. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.*, **150** : 141-147.
- OPRANDY J.J. & CHANG P.W. (1983). S-bromodeoxyuridine induction of hematopoietic neoplasia and retrovirus activation in the soft-shell clam *Mya arenaria*. *J. Invertebr. Pathol.*, **42** : 196-206.
- PAPAS T.S., DAHLBERG J.E. & SONSTEGARD R.A. (1976). Type C virus in lymphosarcoma in northern piKe (*Esox lucius*). *Nature*, **261** : 506-508.
- PARRY J.M. & SORS A. (1993). The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals : the European Community Aneuploidy Progress. *Mutat. Res.*, **287** : 3-15.
- QUEST J.A., COPLEY M.P., HAMERNIK K.L., RINDE E., FISHER B., ENGLER R., BURNAM W.L. & FENNER-CRISP P.A. (1991). Evaluation of the carcinogenic potential of pesticides. 2-Methidathion. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **12** : 117-126.
- QUEST J.A., HAMERNIK K.L., ENGLER R., BURNAM W.L. & FENNER-CRISP P.A. (1991). Evaluation of the carcinogenic potential of pesticides 3. Alette. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, **14** : 3-11.
- RAHN R., CHANG S., HOLLAND J.M., SHUGART L.R. (1982). A fluorometric HPLC assay for quantitating the binding of benzo (a) pyrene metabolites to DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109** : 262-269.
- RANI M.V.U. & RAO M.S. (1991). *In vitro* effect of Fenthion on human lymphocytes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47** : 316-320.
- RASMUSSEN L.P.D. (1986). Virus-associated granulocytomas in the marine mussel, *Mytilus edulis*, from three sites in Denmark, *J. Invertebr. Pathol.*, **48** : 117-123.
- RODRIGUEZ-ARIZA A., ABRIL N., NAUAS J.I., DORADO G., LOPEZ-BAREA J. & PUYEO C. (1992). Metal mutagenicity and biochemical studies on bivalve molluscs from spanish coasts. *Environ. Mol. Mutagen.*, **19** : 112-124.
- ROSSMAN T.G., MOLINA M. & MEYER L.W. (1984). The genetic toxicology of metal compounds : I. Induction of phosphage in *Escherichia coli* WP2 λ (λ), *Environ. Mutagen.*, **6** : 59-69.
- SAGER R. (1989). Tumor suppressor genes : the puzzle and the promise. *Science*, **246**, 1406-1412.
- SCARPATO R., MIGLIORE L. & BARALE R. (1990). The microcucleus assay in *Anodonta cygnea* for the detection of drinking water mutagenicity. *Mutation Res.*, **245** : 231-237
- SCHARTL M., WITTBRODT J., MAUELER W., RAULF F., ADAM D., HANNING G., TELLING A., STORCH F., ANDEXINGER S. & ROBERTSON S.M. (1990). Oncogenes and melanoma formation in xiphophorus (Teleostei Poecillidae). In : New trends in Ichthyology, Schroder J.M. & Schartl M. (Eds). Parey Verlag, Berlin pp.

- SCHMID W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Res.*, **31** : 9-15.
- SCHOP R.N., HARDY M.H. & GOLDBERG M.T. (1991). Comparison of the activity of topically applied pesticides and the herbicide 2,4-D in two short-term *in vivo* assays of genotoxicity in the mouse. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **15** : 666-675.
- SCOTT D., GALLOWAY S.M., MARSHALL R.R., ISHIDATE M.Jr., BRUSICK D., ASHBY J. & MYHR B.C. (1991). International Commission for protection against environmental mutagens and carcinogens (ICPEMC) : Genotoxicity under extreme culture conditions. A report from ICPEMC Task group 9. *Mutation Res.*, **257** : 147-204.
- SHEA C.R., McNUTT N.S., VOLKENANDT M., LUGO J., PRIOLEAU P.G. & ALBINO A.P. (1992). Over expression of p53 protein in basal cell carcinomas of human skin. *American J. Pathol.*, **141** : 25-29.
- SHEINESS D.K. & BISHOP J.M. (1979). *J. Virol.*, **31** : 514-518.
- SHILO B.Z. & WEINBERG R.A. (1981). DNA sequences homologous to vertebrate oncogenes are conserved in *Drosophila melaenogasta*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **78** : 6789-6792.
- SHUGART L.R. (1988a). An alkaline unwinding assay for the detection of DNA damage in aquatic organisms. *Mar. Environ. Res.*, **24**, 321-325.
- SHUGART L.R. (1988b). Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay. *Aquat. Toxicol.*, **13**, 43-52.
- SINDERMANN C.J. (1980). The use of pathological effects of pollutants in marine environmental monitoring programs. Rapport "Conseil International pour l'Exploitation de la Mer", **179** : 129-134.
- SINGER B. (1990). Alkylation, mutagenesis & repair. Introduction, *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen*, **233**, 1.
- SLOAN S.R., NEWCOMB E.W. & PELLICIER A (1990). Neutron radiation can activate K-ras via a point mutations in codon 146 and induces a different spectrum of ras mutations than does gamma radiation. *Mol. Cell. Biol.*, **10** (1) : 405-408.
- SOBTI R.C., KRISHNAN A. & PFAFFENBERGER C.A. (1982). Cytokinetic and cytogenetic effects of some agricultural chemicals on human lymphoid cells *in vitro* : organophosphate. *Mut. Res.* **102** : 89-102.
- STEHELIN D., VARMUS H.E., BISHOP J.M. & VOGT P.K. (1976). DNA related to the transforming gene(s) fo avian sarcoma virus is present in normal avian DNA. *Nature*, **260** : 170-173.
- STEHN C.M., RHODES L.D. & MYERS M.S. (1988). The ultrastructure and histology of hepatocellular carcinomas of english sole (*Parophorys vetulus*) from puget sound, Whashington. *Toxicol. Pathol.*, **16** : 418-431.
- STOUT J.T. & CASKEY C.T. (1985). HPRT : Gene structure, expression and mutation. *Ann. Rev. Genet.*, **19** : 127-148.
- STRICKLAND P.T. & BOYLE Y.M. (1984). Immuassay of carcinogen-modified DNA, in : W.E. Cohn (Ed), Progress in nucleic acid research and molecular biology, *Academic Press*, New-York pp. **31** : 2-58.

- SUGIO K., ISHIDA T., YOKOYAMA H., INOUE T., SUGIMACHI K. & SASAZUKI T. (1992). Ras gene mutations as a prognostic marker in adenocarcinoma of the human lung without lymph node metastasis. *Cancer Res.*, **52** : 2903–2906.
- SUKUMAN S. (1990). An experimental analysis of cancer : role of ras oncogenes in multistep carcinogenesis. *Cancer Cells.*, **2** : 199–204.
- SURRALES J., CARBONELL E., PUIG M., XAMENA N., CREUS A. & MARCOS R. (1990). Induction of mitotic micronuclei by the pyrethroid insecticide fenvelerate in cultured human lymphocytes. *Toxicol. Lett.*, **54**, 151–155.
- THIEBAUT, F., TSURO, T., HAMADA, H., GOTTESMAN, M.M., PASTAN, I. & WILLINGHAM, M.C. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84** : 7735–7738.
- UIG BALDER K. & SWEARNGIN S.E. (1986). Sequence of centromere separation : kinetochore formation in induced lagards and micronuclei. *Mutagenesis*, **1** : 461–465.
- VAN BENEDEN R.J., WATSON D.K., CHEN T.T., LAUTENBERGER J.A. & PAPAS T.S. (1986). Cellular myc (c-myc) in fish (rainbow trout) : its relationship to other vertebrate myc genes and to the transforming genes of the MC 29 family of virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83** : 3698–3702.
- VAN DELFT J.H.M., VAN WINDEN M.J.M., VAN DEN ENDE A.M.C. & BAAN R.A. (1993). Determining N7-alkylguanine adducts by immunochemical methods and HPLC with electrochemical detection : applications in animal studies and monitoring human exposure to alkylating agents. *Environm. Health Perspect.*, **99** : 25–32.
- VAN DER GAAG M.A., GAUTHIER L. & NOORDSJI A. (1990) Genotoxins in effluents : an efficient approach with *in vivo* tests in aquatic species. *Physiological and Biochemical Approches to the Toxicological Assessment of Environmental. Pollution*, ESCPB, Utrecht, 27–31 août 1990.
- VAN HUMMELEN P., DELEENER A., VANPARYS Ph. & KIRSCH-VOLDERS M. (1992). Discrimination of aneuploidogens from clastogens by c-banding, DNA and area measurements of micronuclei from mouse bone marrow. *Mutation Res.*, **271** : 13–28.
- VANPARYS Ph., VERMEIREN F., SYSMANS M. & TEMMERMAN R. (1990). The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activity. *Mutation Res.*, **244** : 95–103.
- VARANASI U., STEIN J.E., NISHIMOTO M., REICHART W.L. & COLLIER T.K. (1987). Chemical carcinogenesis in fecal fish : Uptake, activation and detoxification of organic xenobiotics. *Environ. Health Perspect.*, **71** : 155–170.
- VASSEUR M. (1989). Les virus oncogènes. Introduction à la biologie moléculaire du cancer. Hermann ed., Paris.
- VERLAAN DE VRIES M., BOGAARD M.E., VAN DEN ELST H., VAN BOOM J.H., VANDEREB A.J. & BOS J.L. (1986). A dot-blot screening procedure for mutated ras oncogenes using synthetic oligodeoxynucleotides. *Gene*, **50** : 313–320.
- WAALKES M.P., REHM S., RIGG C.W., BARE R.M., DEVOR D.E., POIRIER L.A., WENK M.L. & HENNEMAN J.R. (1989). Cadmium carcinogenesis in male wistar [CrI : (WI) BR] rats : dose response analysis of effects of zinc on tumor induction in the prostate, in the testes, and at the injection site. *Cancer Res.*, **49** : 4282–4288.

- WILKIE D., EVANS I.H., EGILSSON V., DIALA E.S. & COLLIER D. (1983). Mitochondrial, cell surface and carcinogenesis. *Int. Rev. Cytol.*, **15** (suppl) : 157-189.
- WILLIAMS R.C. & METCALFE C.D. (1992). Development of an *in vivo* hepatitic micronucleus assay with rainbow trout. *Aquatic Toxicology.*, **23** : 193-202.
- WIRGIN I., CURRIE D. & GARTE S.J. (1989). Activation of the k-ras oncogene in liver tumors of Hudson River tomcod. *Carcinogenesis*, **10**, 2311-2315.
- WOGAN G.N. (1992). Molecular epidemiology in cancer risk assessment and prevention : recent progress and avenues for future research. *Environm. Health. Perspect.* **98** : 167-178.
- WRISBERG M.N. (1990). Induction of micronuclei in hemocytes of *Mytilus edulis*. Physiological and biochemical approaches to the toxicological assessment of environmental pollution, ESCPB, Utrecht, 27-31 août 1990.
- WU D., UGOZZOLI L., PAL B.K. & WALLACE R.B. (1989). Allele-specific enzymatic amplification of beta-globin genomic DNA for diagnosis of sickle cell anemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **86** : 2757-2760.
- YAMAMOTO K.I. & KIKUCHI Y. (1980). A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutation Res.*, **71** : 127-131.
- YAMASAKI E.F., SALAMON D.P. & WANI A.A. (1992). Mutational activation of H-ras oncogene transformability by alkylnitrosourea induced DNA damage. *Mutat. Res.*, **266** : 241-252.
- YEVICH P.P. & BARSZCZ C.A. (1977). Neoplasia in soft-shell clams (*Mya arenaria*) collected from oil impacted sites. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **298** : 409-426.