

Etude de l'effet génotoxique des huiles hépatiques brutes de trois espèces de requins méditerranéens par application du test de numération des micronoyaux dans les lymphocytes T humains

Volume 58, Numéro 5, Septembre - Octobre 2000

- Auteur(s) : [E. Bartfai](#), [T. Orsière](#), [F. Duffaud](#), [P. Villani](#), [J. Pompili](#), [A. Botta](#)
- Mots-clés : Huiles hépatiques Requins Squalène Mutagenèse Test de numération des micronoyaux Lymphocytes T humains
- Année de parution : 2000

Résumé : L'apparition de tumeurs du système lymphoïde chez deux salariés ayant manipulé pendant de nombreuses années de l'huile de foie de requins de Méditerranée et du squalène extrait de l'huile, ainsi que les résultats de travaux scientifiques publiés en 1959 par Kröning démontrant l'induction de tumeurs lymphoïdes après badigeonnage cutané de souris C 57 B1 avec du squalène, ont conduit à poser la question suivante : existe-t-il un pouvoir mutagène de l'huile de foie de requins ? Pour mettre en évidence la présence ou l'absence d'un tel effet, les auteurs ont analysé *in vitro* la génotoxicité des huiles hépatiques brutes de trois espèces de requins provenant de la Méditerranée. Des échantillons d'huiles issus de deux espèces de requins de grand fond, *Centrophorus granulosus* et *Galeus melastomus*, et d'une espèce de surface, *Prionace glauca*, ont été testés par application du test de numération des micronoyaux. Ce test détecte simultanément les effets clastogènes et aneugènes. Il est de réalisation aisée et d'interprétation rapide. L'incubation des cellules humaines en présence des huiles hépatiques brutes de *Centrophorus granulosus* entraîne une augmentation du taux de cellules binucléées micronucléées de façon dose-dépendante. Les taux de cellules micronucléées sont de $9,0\% \pm 1,1$ chez les témoins et de $27,1\% \pm 4,0$ à la plus forte concentration testée. Des résultats similaires ont été obtenus avec les huiles de foies brutes de *Galeus melastomus* et de *Prionace glauca*. Ces résultats démontrent que les huiles hépatiques brutes de trois espèces de requins sont génotoxiques et confirment que le risque de cancérogénicité est élevé.

Les requins (classe des *Chondrichthyens*) sont des poissons cartilagineux à fentes branchiales nues. Chacun des huit ordres majeurs comporte une ou plusieurs familles. En tout, 30 familles de requins englobent un peu plus de 400 espèces.

Les huiles de foies de requins constituent une source de matière grasse relativement importante. Elles sont connues pour présenter des compositions chimiques particulières, notamment le squalène, hydrocarbure terpénique poly-insaturé, la vitamine A, le cholestérol, des triglycérides, des diacylglycéril-éthers [1-3]. Chez certaines espèces, notamment chez les requins de grandes profondeurs, le foie, qui représente 15 à 29 % du poids total de l'animal, est essentiellement composé de lipides, jusqu'à 89 % [4], constituant ainsi une réserve d'énergie [5]. De nos jours les huiles de foies de requins sont utilisées comme source de squalène dans les industries cosmétologiques et pharmaceutiques en raison de la particulière stabilité de ce composé aux températures extrêmes [6]. Sa concentration dans les lipides hépatiques de requins varie de 63 à 96 %, le maximum étant retrouvé chez certaines espèces de grands fonds [7]. Les premières études expérimentales sur la toxicité de l'huile de foie de requins ont été réalisées en 1959 par Kröning [8], et ont démontré que le badigeonnage répété de la peau de souris par du squalène purifié à partir d'extraits d'huiles hépatiques de requins, déclenchait une leucémie chez ces animaux. Ces résultats, et la constatation de pathologies cancéreuses chez des salariés exposés pendant plusieurs années au contact direct de foies de requins (voir encadré), nous ont conduit à envisager l'étude des propriétés mutagènes des huiles brutes au moyen d'un test *in vitro* de mutagenèse à court terme sur cellules humaines : le test de numération des micronoyaux dans les lymphocytes T binucléés en culture. L'apparition des micronoyaux peut être consécutive, d'une part, à un événement clastogène (production de fragments) et, d'autre part, à une action aneugène (perte de chromosomes). À ce titre, les micronoyaux sont le reflet d'une action génotoxique et peuvent révéler le premier stade de la cancérogenèse chimique au même titre que les aberrations chromosomiques [9].

Matériels et méthodes

Les espèces étudiées

L'espèce *Centrophorus granulosus* (figure 1) fait partie de la famille des squalidés ou chiens de mer. C'est une espèce benthique profonde rencontrée sur les fonds de 150 m à plus de 1 000 m, avec une zone préférentielle entre 400 m et 600 m, où, en Méditerranée, la température de l'eau reste constante à environ 13 °C. L'huile hépatique est légère, riche en squalène et représente 67 à 89 % du foie.

L'espèce *Galeus melastomus* (figure 1), est classée dans la famille des scylliorhinidés. C'est également une espèce benthique qui préfère les eaux moyennement profondes (200 m à 1 000 m). Le foie est relativement riche en huile lourde classique (55 %).

L'espèce *Prionace glauca* (figure 1) est classée dans la famille des carcharhinidés, et appartient aux requins de surface. Ce requin bleu est très commun dans les eaux tempérées des plateaux continentaux, typiquement pélagiques, de la surface jusqu'à 350 m de profondeur. Chez les requins de surface, l'huile de foie contient très peu de squalène (10 à 20 %), mais beaucoup de cholestérol, de triglycérides et de vitamine A.

Une quarantaine d'individus des trois espèces ont été pêchés en Méditerranée à l'aide de palangres de grandes profondeurs ou au filet. Les foies de requins ont été retirés et conservés au froid. L'extraction de l'huile brute a été effectuée soit par gravité sans solvant (*Centrophorus granulosus*), soit par l'éther éthylique (*Galeus melastomus* et *Prionace glauca*).

Test de numération des micronoyaux

Les échantillons de sang humain ont été collectés dans des tubes en plastique héparinés et conservés pendant moins de 24 heures à température ambiante à l'abri de la lumière. Ces échantillons provenaient de volontaires, sains, adultes, sans pathologie connue, non exposés à des substances génotoxiques connues, préalablement informés des objectifs de l'étude et ayant donné leur consentement éclairé.

Chaque échantillon est mis en culture selon la procédure suivante : 0,7 ml de sang hépariné, 0,1 ml de phytohémagglutinine (Biochem-Seromed), 0,1 ml de pénicilline-streptomycine 10^3 UI/ml (ATGC), et 2,5 ml de sérum de veau fœtal (Biochem-Seromed) sont additionnés à 6,5 ml de milieu 199 (Institut Pasteur) [10]. Ces cultures sont réalisées dans des flacons stériles de 25 cm² et incubés pendant 72 heures à 37 °C sous une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂.

Les huiles hépatiques brutes de requins (HHB) sont ajoutées au milieu à la 24^e heure à des concentrations croissantes. Les extraits d'huiles hépatiques brutes ont été dilués dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Les concentrations finales en huiles dans le milieu de culture ont été fixées à $1/10^7$ (A), $1/10^6$ (B), $1/10^5$ (C) et $1/10^4$ (D) (volume/volume).

La cytochalasine B à la concentration de 5 µg/ml est additionnée à la 44^e heure. En fin d'incubation, les cellules sont centrifugées, soumises à un choc hypotonique doux (5 ml KCl 0,075M durant 1 min) et fixées (acide-acétique-méthanol 1V : 3V). Les cellules fixées sont ensuite étalées par projection de gouttes sur des lames de microscope préalablement dégraissées et humides. Les lames sont alors séchées à l'air ambiant pendant 24 heures, puis colorées pendant 12 min au Giemsa.

Les huiles hépatiques brutes de *Centrophorus granulosus*, *Galeus melastomus* et *Prionace glauca* ont été testées aux quatre concentrations différentes (A, B, C, D) et 5 mesures pour chaque type d'huile ont été réalisées. Pour chaque série de culture, deux témoins ont été effectués. Un témoin négatif (To) est réalisé par addition de DMSO, solvant utilisé pour diluer les échantillons, en raison de l'absence de l'effet clastogène et aneugène de ce solvant déjà vérifié expérimentalement au laboratoire de biogénotoxicologie. Enfin, un témoin positif (Tplus) a été effectué par ajout d'un mutagène standard, la doxorubicine, additionné à la 24^e heure, à la concentration de 0,003 µg/ml.

La lecture est effectuée au microscope optique (x 400) par le même opérateur et seuls les lymphocytes binucléés sont observés pour la détection et la numération des micronoyaux. Les critères de reconnaissance des micronoyaux sont strictement définis : entités nucléaires indépendantes des noyaux principaux, taille comprise entre le seizième et le tiers du plus petit des deux noyaux principaux.

Pour chaque lame, 1 000 lymphocytes binucléés sont examinés et, parmi ceux-ci, les cellules portant au moins un micronoyau sont comptabilisées. Les résultats sont ainsi exprimés en nombre de lymphocytes binucléés micronucléés pour 1 000 lymphocytes binucléés observés. L'étude du taux de variation des micronoyaux a été effectuée par une analyse de variance (Anova).

Résultats

Pour les trois espèces, des essais préliminaires comparant les deux procédés d'extraction (gravité et éther éthylique) n'ont montré aucune différence significative.

Les résultats ([figure 2](#)) obtenus avec l'huile hépatique brute de *Centrophorus granulosus* femelle et mâle montrent une augmentation statistiquement significative des taux de cellules binucléées micronucléées par rapport au témoin négatif (To) qui est observée dès les plus faibles doses. L'analyse de variance met en évidence une importante génotoxicité dose-dépendante de l'huile hépatique brute de *Centrophorus granulosus* aussi bien femelle que mâle démontrant ainsi l'absence d'influence du sexe. Des résultats identiques sont obtenus avec *Galeus melastomus*. Avec l'huile hépatique brute de *Prionace glauca*, on observe une augmentation modérée mais qui reste statistiquement significative.

Pour s'assurer du caractère spécifique de la mutagénicité des huiles brutes de foies des trois espèces de requins étudiées, deux séries de culture ont été réalisées en additionnant des huiles végétales (huile d'olive et huile de tournesol). Les résultats obtenus ([figure 3](#)) mettent en évidence des taux de cellules micronucléées pour chaque concentration testée d'huiles végétales (A, B, C, D) comparables à ceux du témoin négatif (To). Cela démontre que la génotoxicité des huiles hépatiques brutes de trois espèces de requins est indépendante de leur lipophilie.

Commentaires

Ces résultats confirment l'existence d'un effet mutagène des huiles hépatiques brutes des trois espèces de requins méditerranéens étudiées. Ils montrent que les huiles de foies brutes des deux espèces de grandes profondeurs présentent *in vitro* une génotoxicité importante tandis que celle du requin de surface ne possède qu'une génotoxicité modérée.

Cette différence peut être en relation soit avec la physiologie particulière de ces animaux, soit avec leur écologie principalement liée à la profondeur de leur habitat, soit enfin avec la pollution des fonds marins [11, 12]. Il est possible que les hydrocarbures et les métaux lourds, en s'accumulant sur les fonds de mer et polluant les chaînes alimentaires, soient responsables des propriétés mutagènes des huiles de foies de requins de grand fond.

Le mécanisme génotoxique à l'origine du caractère mutagène de ces huiles devra être déterminé en associant des tests de mise en évidence des lésions primaires de l'ADN, tels que le test des comètes et le postmarquage au ³²P, des tests de mutations géniques, tels que le test HPRT et le test d'Ames, et des tests de mutations chromosomiques, tels que le test des échanges entre chromatides sœurs et le test des aberrations chromosomiques.

Observations

Monsieur R., né en 1927, a travaillé sur les requins depuis les années 1960. À partir des années 1980, il a étudié essentiellement les requins de Méditerranée. Il s'est intéressé principalement à l'huile de foie de requin et au squalène extrait de l'huile brute. Il participe régulièrement à des pêches de requins, en moyenne 8 à 10 par an. Au cours de celles-ci, en plein air, au soleil, les requins sont manipulés à mains nues, sans aucune protection, afin d'extraire l'huile du foie. Les mains, les bras et les avant-bras sont ainsi, pendant plusieurs heures, en contact direct avec l'huile brute. Le foie de chaque requin, d'abord retiré à la main puis ouvert, est déposé sur un entonnoir afin de laisser couler l'huile par déclivité. Il est ensuite découpé par fragments pour parfaire l'extraction. Monsieur R. a ainsi manipulé entre 500 et 1 000 requins. En 1987, suite à l'apparition d'une hyperlymphocytose sanguine et d'une splénomégalie de volume modéré, une leucémie lymphoïde chronique est diagnostiquée. Devant la stabilité du volume splénique et de l'hyperlymphocytose, seule une surveillance clinique et biologique rapprochée est

proposée. Au début de l'année 1999, le patient rechute et malgré une polychimiothérapie, il décède à la fin de l'année.

Monsieur P., né en 1960, participe pendant 4 ans, au cours des années 1980-1983, aux pêches de requins avec Monsieur R. Au cours de celles-ci, il s'expose de la même manière aux huiles de foies de requins. Il a participé à 8 à 10 pêches par an. En 1984, il fonde une entreprise spécialisée dans le domaine de l'extraction de l'huile de foie de requins. Pendant 4 ans, il ne participe plus aux pêches mais continue à manipuler les foies de requins ainsi que l'huile et le squalène pur à mains nues et en grandes quantités. En avril 1991, Monsieur P. est opéré d'une volumineuse masse ganglionnaire cervicale droite, apparue rapidement. Le diagnostic est celui d'un lymphôme de Burkitt. Le patient est traité par polychimiothérapie, puis subit une autogreffe de moelle en 1992. Il est actuellement en rémission.

Article reçu le 29 octobre 1999, accepté le 29 mai 2000.

REFERENCES

1. Wu CS, Tsay YJ, Liou HJ. Studies on the content and hydrogenation condition of squalene from the liver oil of deep sea sharks. *J Fisheries Soc Taiwan* 1980 ; 7, 1 : 43-55.
2. Bakes MJ, Nichols PD. Lipid, fatty acid and squalene composition of liver oil from six species of deep sea sharks collected in southern Australian waters. *Comp Biochem Physiol* 1995 ; 110B, 1 : 267-75.
3. Sargent JR, Gatten RR, McIntosh R. The distribution of neutral lipids in shark tissues. *Marine Biol Ass UK* 1973 ; 53 : 649-56.
4. Peyronel D, Artaud J, Iatrides MC, Rancurel P, Chevalier JL. Fatty acid and squalene compositions of mediterranean *Centrophorus* Spp egg and liver oils in relation to age. *Lipids* 1984 ; 19, 9 : 643-8.
5. Van Vleet ES, Candileri S, McNeillie J, Reinhardt SB, Conkright ME, Zwiessler A. Neutral lipid components of eleven species of Caribbean sharks. *Comp Biochem Physiol* 1984 ; 79 B, 4 : 549-54.
6. Buranudeen F, Richards-Rajadurai PN. Squalene. *Infofish Marketing Digest* 1986 ; 1 : 42-3.
7. Stevens JD. *Les requins*. Paris : Bordas, 1989 : 18-34.
8. Kroning F. Über die induktion von leukämien bei C57 R1 mausen nach pinselung einer dorsalen hautpartie mit kurzkettigen fettsäuren, fettsäureestern und mit squalen. *Acta Unio Intern Contra Cancrum* 1959 ; 15 : 619-26.
9. Di Giorgio C, Botta A, de Meo MP, Laget M, Dumenil G. Le test de numération des micronoyaux dans les lymphocytes T binucléés : analyse de la répartition et des facteurs de variation sur une population de 100 sujets. *Ann Biol Clin* 1992 ; 50 : 21-4.
10. Ait-Amara-Mokrane Y, Lehucher-Michel MP, Balansard G, Dumenil G, Botta A. Protective effect of alpha-hederin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. *Mutagenesis* 1996 ; 11 : 161-7.
11. Rodriguez-Ariza A, Martinez-Lara E, Pascual P, et al. Biochemical and genetic indices of marine pollution in Spanish littoral. *Proceedings of the Second European Conference on Ecotoxicology* 1993 ; 1-2 : 109-16.
12. Bolognesi C, Parrini M, Poggieri P, Ercolini C, Pellegrino C. Carcinogenic and mutagenic pollutants : impact on marine organisms. *Proceedings of the FAO-UNEP-IOC workshop on the biological effects of pollutants on marine organisms* 1992 ; 69 : 113-21.