Université Mohammed V-Agdal
Faculté des Sciences de Rabat
Laboratoire de Zoologie et de Biologie générale

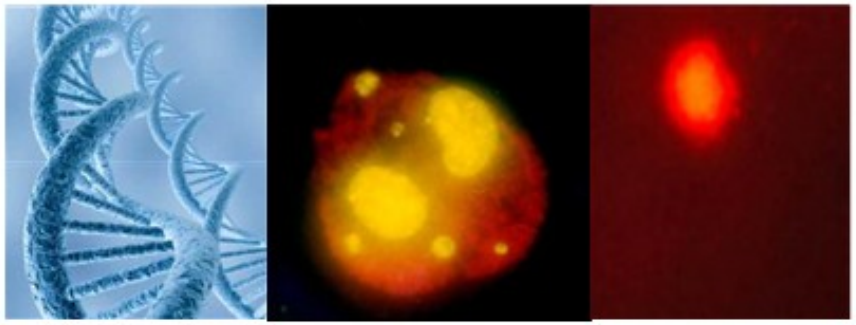
Bio-marqueurs et Bio-indicateurs de Génotoxicité

Pr Mariam Naciri

Bio-marqueurs et Bio-indicateurs de Génotoxicité

Paramètre biologique qui met en évidence des effets génotoxiques

Lésions de l'ADN (cassures de brin, adduits, etc…)
Mutations géniques
Mutations chromosomiques



Organisme chez lequel il est possible de mettre en évidence des effets génotoxiques

Espèces opportunistes et tolérantes
Sédentaires et abondants
Faciles à récolter et à identifier.
Qui reflètent les variations de la qualité du milieu

Analyse de bio-marqueurs de génotoxicité chez divers bio-indicateurs

Signaux précoces révélateurs de problèmes environnementaux
Relations de cause à effet entre facteurs de stress et effets biologiques
Efficacité de mesures réparatrices sur les systèmes biologiques.

Génotoxicité des atmosphères

Bio-indicateurs

Plantes du genre Tradescantia

HAPs
Métaux
Rayonnements

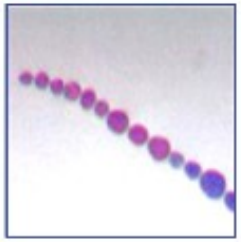
Bio-marqueurs

Mutations géniques

Plantes du genre *Tradescantia* hétérozygotes pour le gène de la couleur des poils (P/p)

Phénotype de base P/p violettes
Phénotype muté p/p roses

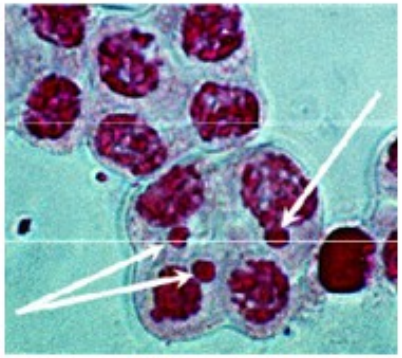
Phénotype sauvage



Phénotype muté

Mutations chromosomiques

Analyse des taux de micronoyaux dans les cellules mères en tétrades du pollen



Contaminants atmosphériques dissous

Génotoxicité des sols

Bio-indicateurs

Plantes

HAPs
Métaux
Pesticides

Vicia faba

Allium cepa

Bio-marqueurs

Mutations chromosomiques

Analyse des taux de micronoyaux dans les cellules de méristèmes au Niveau des racines

Contaminants dissous

Génotoxicité des sols

Bio-indicateurs

Invertébrés détritivores (lombrics)

Vers oligochètes
Eisenia fetida

HAPs
Métaux
Pesticides

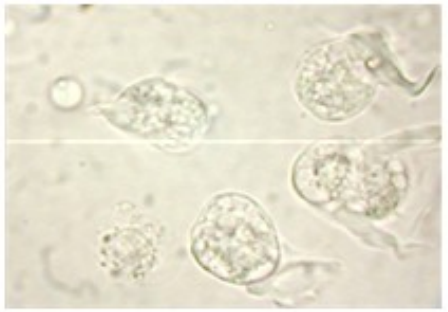
Bio-marqueurs

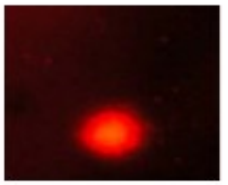
Mutations chromosomiques

Test des micronoyaux effectué sur cœlomocytes

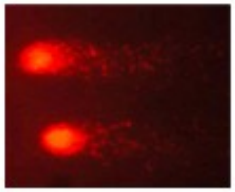
Détection des lésions de l'ADN

Test des comètes effectué sur cœlomocytes





Cellule intacte



Cellule lésée

Contaminants particulaires et dissous

Le test des comètes

Traitement des cellules avec un agent endommageant

↓

Suspension des cellules dans de l'agarose à faible température de fusion sur une lame à microscope

↓

Lyse des cellules

↓

Traitement enzymatique (glycosylase) facultatif

↓

Transfert des lames dans une solution alcaline

Conversion des sites alcali labiles en cassures

Dénaturation de l'ADN

↓

Electrophorèse dans la solution alcaline

↓

Coloration

↓

Analyse des images

Le test des comètes

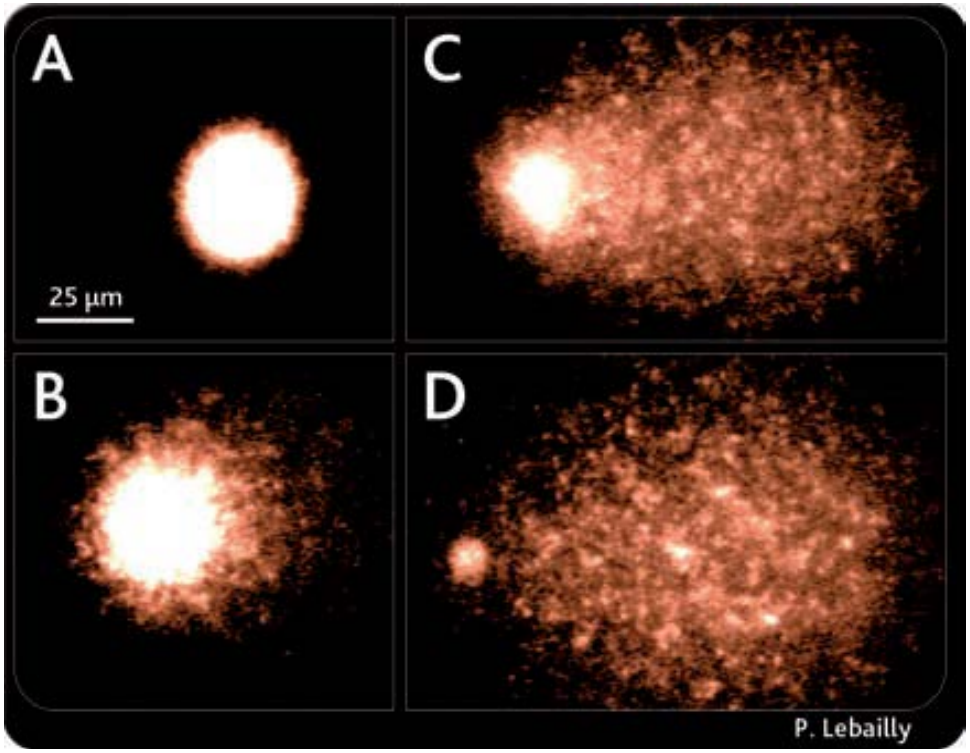
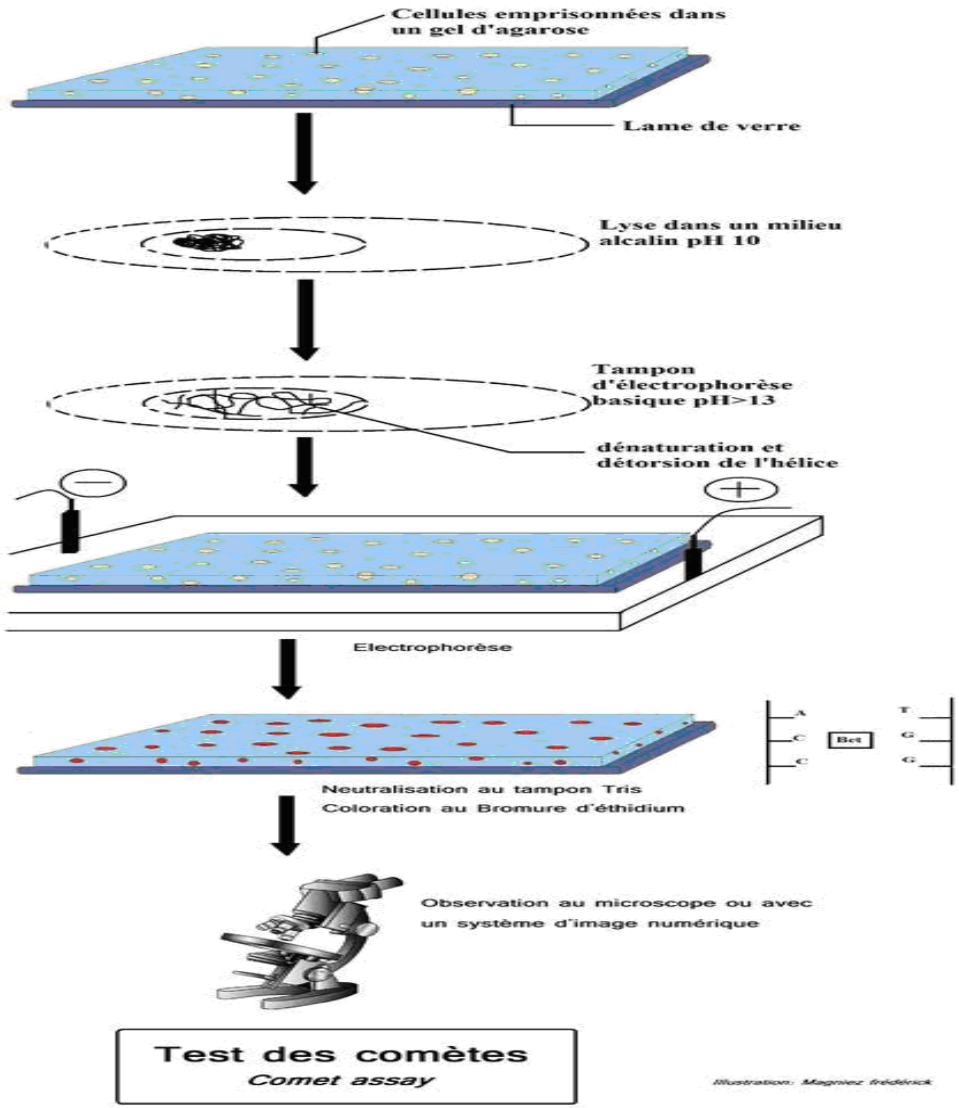


Figure 17 : Photographie de (A) noyau intact, (B) légère comète, (C) comète,
(D) noyau atypique

Le test des comètes

•Cette technique permet de **quantifier** d'une part **les dommages causés à l'ADN** par divers agents toxiques et d'autre part l**a réparation des dommages** dans les cellules eucaryotes ainsi que dans quelques cellules procaryotes in vivo et in vitro.

•Technique **non invasive**.
•Technique sensible (détection d'environ 0,2 à 2 coupures par 10^9 daltons).
•Les résultats sont obtenus en quelques heures par rapport aux techniques conventionnelles.
•50 à 100 cellules sont comptées par échantillon par comptage manuel ou en utilisant un logiciel.



Le test des comètes

Exemples d'application:

•Evaluation des produits chimiques génotoxiques in vivo et in vitro.
•Etude sur la réparation de l'ADN (réparation par excision; Strand Break Repair).
•Etude sur les dommages causés à l'ADN (cassure simple brin; sites alcali-labile; réticulation de l'ADN).
•En éco-toxicologie: test utilisé pour surveiller des sols et étudier la toxicologie aquatique.
•Evaluation des polluants génotoxiques provenant de sites de déchets dangereux.
•Epidémiologie de l'homme:
    •Banque de sang.
    •Suivi de la radio et chimio-thérapie chez les patients cancéreux.
    •Banque de sperme.

Le test des comètes : Application environnementale d'un biomarqueur de génotoxicité *in vitro* et *in vivo*

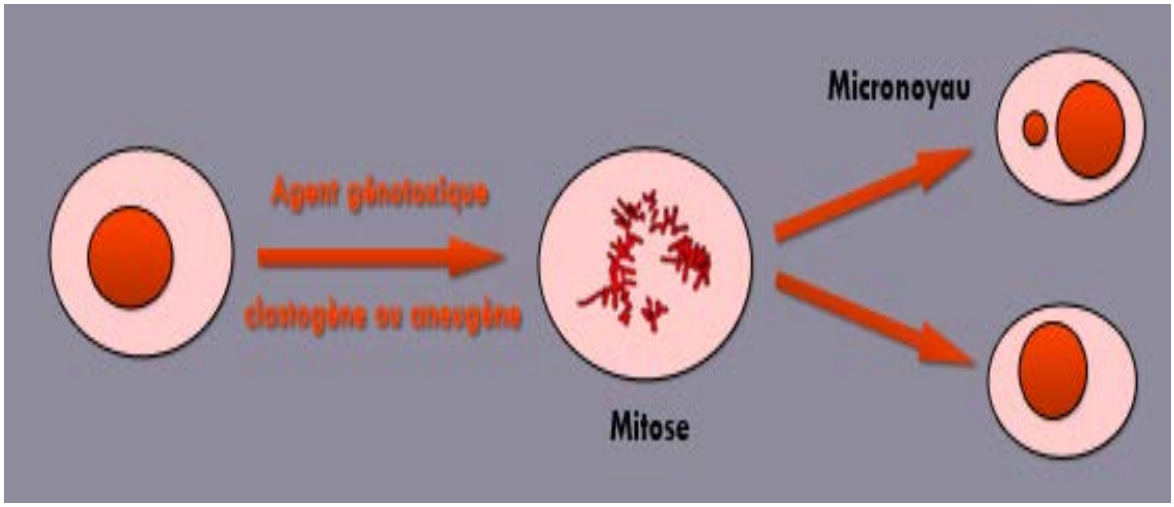
Applications

Le test des comètes est utilisé au Département Polluants Chimiques pour des applications environnementales *in vitro* et *in vivo* :
In vitro, il montre le caractère génotoxique de contaminants organiques présents dans l'eau (contaminants associés aux MES et dissous) ou dans les sédiments **(Fig. 1)** et il permet aussi de calculer la concentration d'équivalents Benzo[a]Pyrène dans les échantillons de l'environnement.

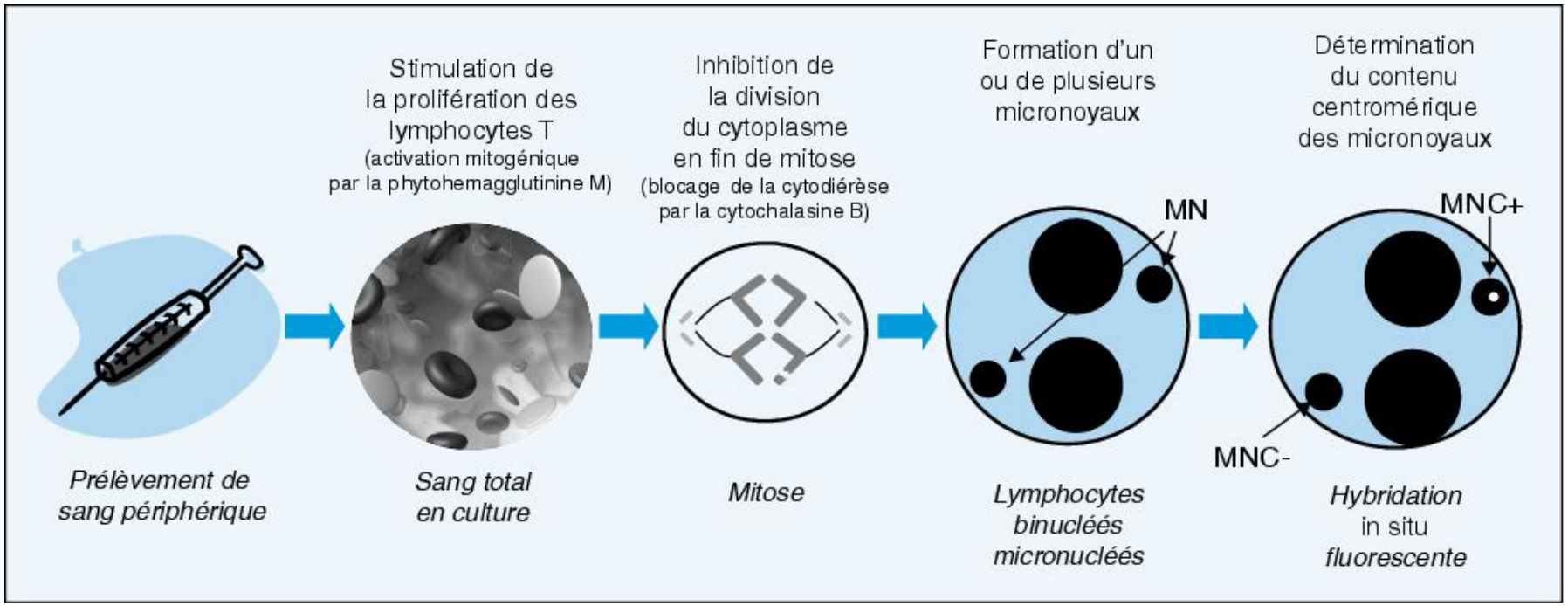
Tests des micronoyaux sur différents types cellulaires

Les micronoyaux se définissent comme des **fragments de chromosomes** ou des chromosomes entiers perdus **par le noyau cellulaire** au cours de la mitose et formant de petites entités bien individualisées dans le cytoplasme des cellules en interphase.

Ils proviennent de **cassures chromosomiques** ou **d'anomalies du fuseau mitotique** et reflètent une **action génotoxique directe** ou **un mécanisme épigénétique** qui aboutissent tous deux à **l'apparition de mutations chromosomiques stables et héréditaires.**
Ainsi, ils sont à l'origine de clones de cellules initiées constituant la première étape de la cancérogenèse.

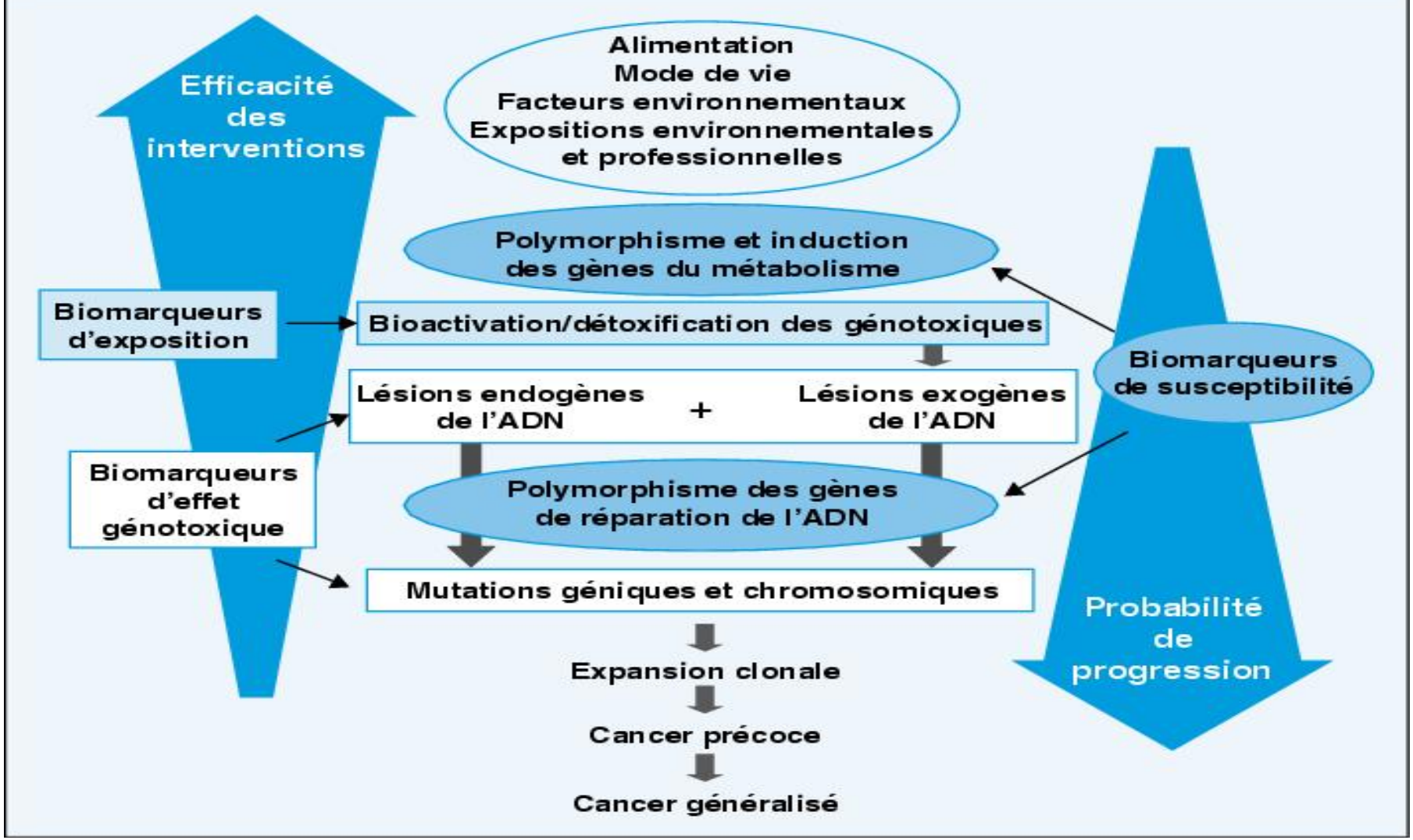


Tests des micronoyaux sur différents types cellulaires



Principe du test des micronoyaux, avec blocage de la cytodiérèse, associé à l'hybridation in situ fluorescente de sondes pancentromériques.

Pour chaque sujet, 1 000 lymphocytes binucléés sont observés et les cellules micronucléées contenant un ou plusieurs MN (jusqu'à 6 MN) sont comptabilisées selon les critères définis par Fenech [29]. Pour chaque cellule micronucléée, le nombre de MN est enregistré, de même que la présence ou non de centromères dans les MN (MNC- ou MNC+) et le nombre de spots de fluorescence (correspondant chacun à un centromère donc à un chromosome) au sein de chaque MNC+.MN : micronoyaux ; MNC- : fragments chromosomiques acentromériques ; MNC+ : chromosomes entiers centromériques.



Inter-relations des composantes environnementales et génétiques dans le processus de cancérogenèse : place des biomarqueurs d'exposition et d'effet génotoxique en fonction des polymorphismes des gènes du métabolisme et de réparation de l'ADN.Les tests de génotoxicité sont susceptibles de quantifier

(i) l'intensité des lésions primaires à l'ADN, non encore prises en charge par les systèmes de réparation de l'ADN

(ii) les mutations géniques et /ou chromosomiques, modifications irréversibles et transmissibles de l'ADN.

Tests des micronoyaux sur différents types cellulaires

Le test *in vitro* de numération des micronoyaux est un test court de mutagenèse qui permet d'identifier **les agents physiques** ou **chimiques** clastogènes ou aneugènes, c'est-à-dire capables d'induire la formation de micronoyaux dans des cellules de mammifères.

Il permet l'utilisation de nombreux types cellulaires: **cellules normales** (lymphocytes ou kératinocytes humains) ou **lignées de cellules transformées** (cellules d'ovaires de hamster chinois CHO ou cellules de lymphome de hamster chinois CHL).

La méthodologie proposée par **SIGENTEC** utilise un protocole mettant en jeu le blocage de la cytokinèse cellulaire par l'ajout de cytochalasine B et permet ainsi un contrôle intrinsèque de la division nucléaire et une mesure de la toxicité des substances testées.

TEST STANDARD
Les études théoriques et les données scientifiques indiquent, que la plupart des agents aneugènes et clastogènes sont détectés suite à temps de contact court (3 heures) en présence et en l'absence d'une activation métabolique exogène .

TEST DE CONFIRMATION
Le test de confirmation a pour but de vérifier les résultats négatifs ou équivoques obtenus avec le test standard en utilisant le temps de contact plus long (24 heures).

Si le produit chimique à tester possède des propriétés prolongeant considérablement le cycle cellulaires (exemple: analogues de nucléoside), un temps de contact plus long peut être approprié.

Le test d’Ames

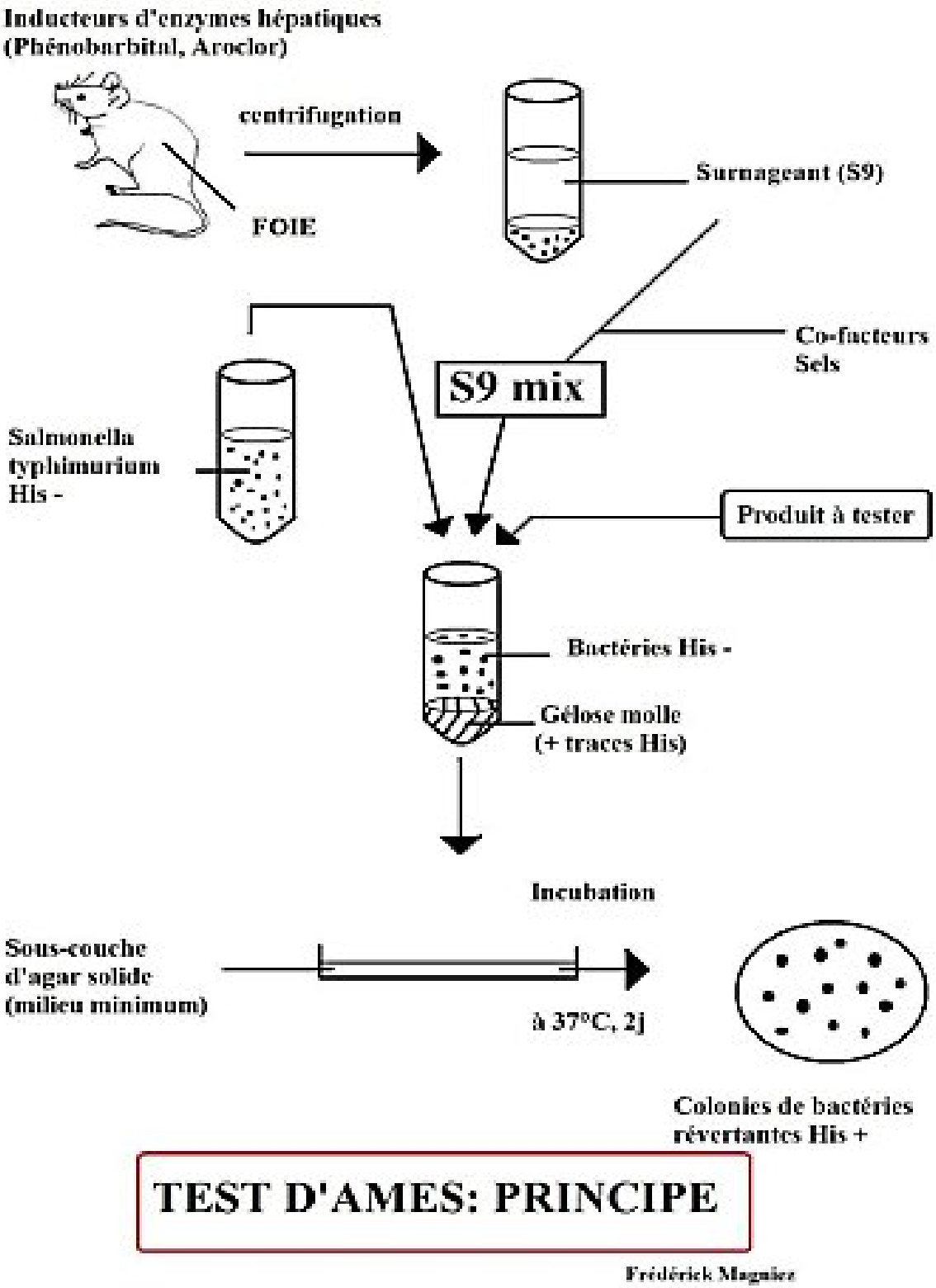
- **Histoire:**

Ce test biologique fut décrit en 1973 par **Bruce Ames.**

- **Intérêt:**

L'apparition d'un cancer est souvent liée à des dommages causés dans l'ADN. Ce test permet **d'estimer le potentiel cancérigène d'une substance**.

Principe du Test d'Ames



Le SOS Chromotest

- **Le SOS Chromotest** est un **test in vitro** qui permet **d'évaluer l'activité génotoxique** d'une substance pure ou d'un échantillon biologique ou environnemental.
- Ce test est effectué sur une souche bactérienne, *Escherichia coli* PQ37.
- Il consiste à **déterminer in vitro** la capacité d'une substance chimique à induire des dommages à l'ADN qui seront quantifiés indirectement par la mesure de l'expression d'un des composants du système de réparation SOS, le gène sfiA.