



**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**  
**Année Universitaire: 2013-2014**

**Les bioindicateurs doivent être utilisés pour :**

- **émettre des signaux précoces de problèmes environnementaux ;**
- **identifier les relations de cause à effet entre les facteurs d'altération et les effets biologiques ;**
- **évaluer l'état de stress global de l'environnement à travers différentes réponses d'organismes indicateurs ;**
- **évaluer l'efficacité de mesures réparatrices sur la santé des systèmes biologiques.**

# Concept et Utilisation de bioindicateurs de la qualité du milieu

## 1) Paramètres physico-chimiques

(transparence, température, bilan oxygène, salinité, nutriments, polluants fixés par d'autres textes)

## 2) Paramètres hydromorphologiques

(profondeur, zone inter-tidale, structure sédiment, débit, exposition aux vagues, etc.)

## 3) Paramètres biologiques ou plutôt .... écologique

- Phytoplancton : composition, biomasse
- Macrophytes benthiques : Phanérogames et macroalgues, composition et abondance
- Macrofaune benthique : composition et abondance
- Ichtyofaune : composition et abondance, âge (eaux douces et transition uniquement)

# Accumulation de contaminants dans les organismes

## Trois types de mesures pour trois informations complémentaires

- **1/ Dans l'eau** : image instantanée de la quantité totale de polluants présents dans le milieu
- **2/ Dans les sols, les sédiments** : accumulation à travers le temps, intégration des sources de variations
- **3/ Dans les organismes** : image de la fraction biodisponible, potentiellement toxique

# Accumulation de contaminants dans les organismes

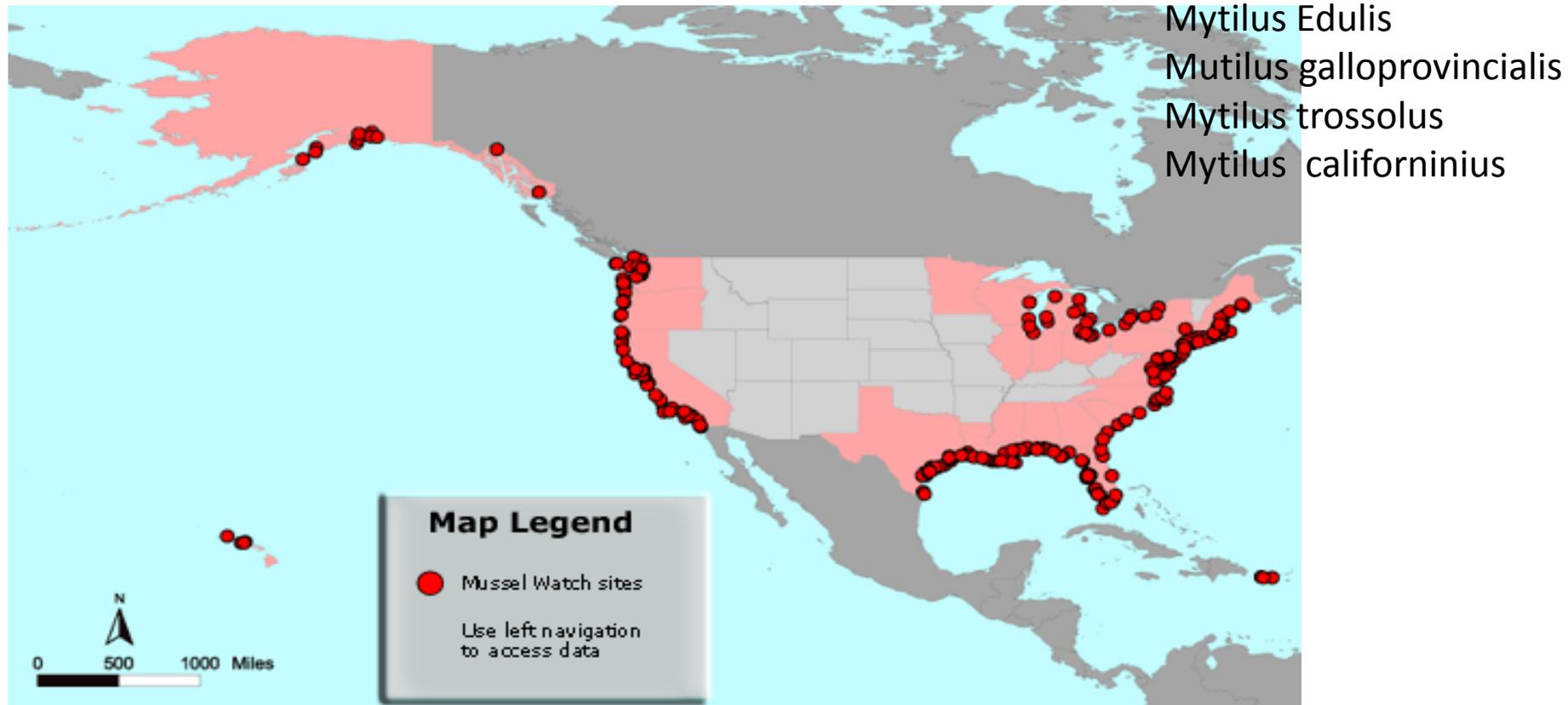
L'intérêt de l'étude de la bioaccumulation des contaminants par les organismes marins pour évaluer la qualité du milieu marin réside dans :

- 1/• leur **capacité de rétention et d'accumulation de micropolluants** difficilement détectables directement dans l'eau de mer,
- 2/• leur **intérêt dans le suivi spatial** (gradients de pollution) et temporel de la contamination du milieu marin,
- 3/• **le suivi de la contamination de la chaîne alimentaire** dont les applications se traduisent en terme de santé publique mais également en terme d'impacts écologiques de la contamination du milieu.

# Les bioaccumulateurs idéaux

- **Espèces opportunistes, tolérantes faces aux perturbations de l'environnement.**
- **Espèces sédentaires et abondants** sur les sites à étudier.
- **faciles à récolter et à identifier.**
- **Accumule et non pas régule les contaminants ; reflète les variations de la qualité chimique du milieu**
  - **Les végétaux : algues et phanérogames marines**  
*sources dissoutes de contaminants*
  - **Les invertébrés filtreurs : bivalves et spongiaires**  
*sources particulières et dissoutes de contaminants*
  - **Les détritivores : vers polychètes et crustacés**  
*contaminants accumulés dans les sédiments*

# L'exemple du « Mussel Watch »



## Variabilité spécifique

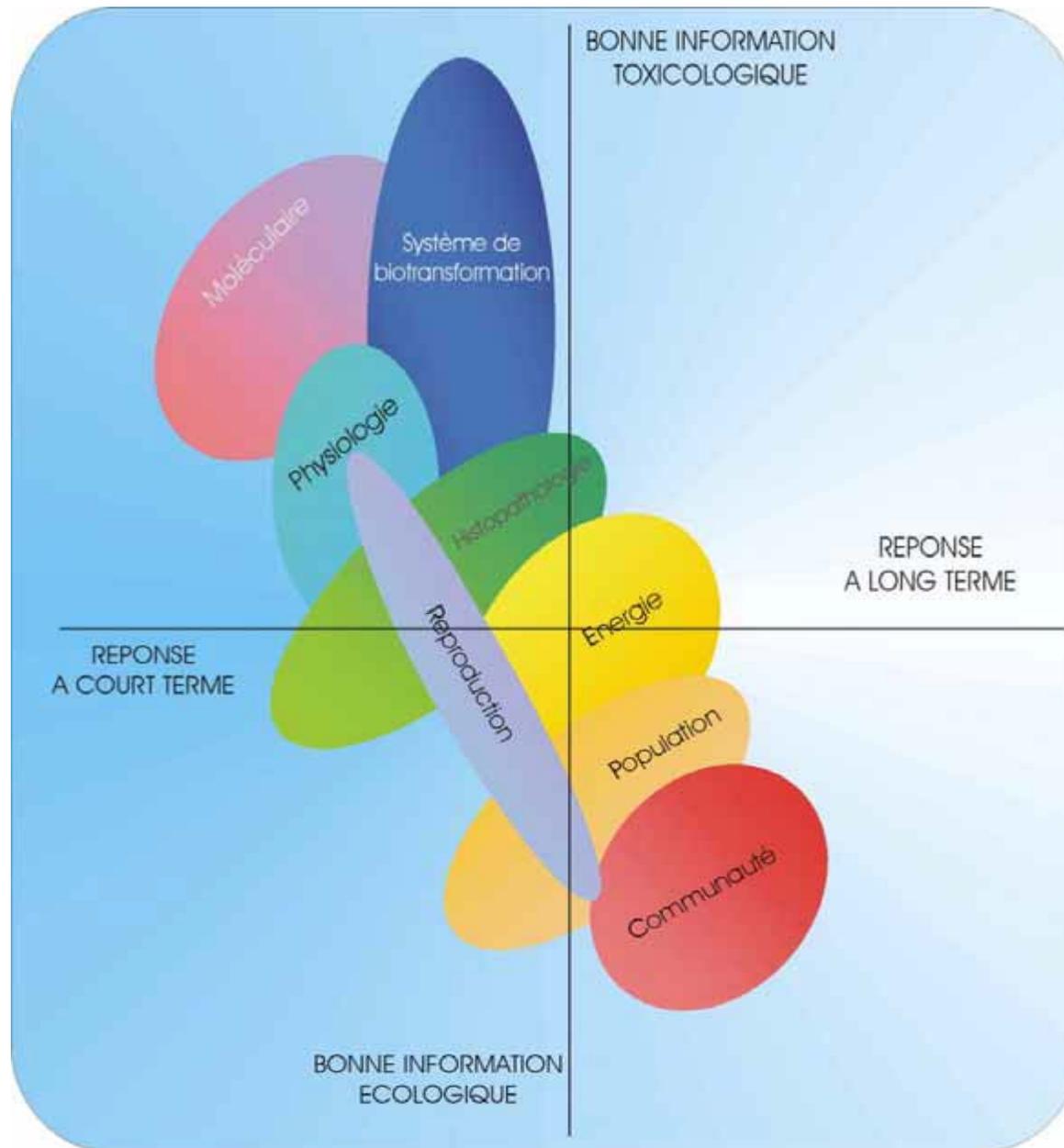
Les organismes marins constituent des entités complexes tant au point de vue structural que fonctionnel. Cette complexité est une limite majeure de l'utilisation et du développement de nouveaux organismes bioaccumulateurs indicateurs de la qualité du milieu marin.

# Bioindicateurs de quoi?

- est-ce que les bioindicateurs peuvent attirer notre attention sur **la qualité de l'environnement** ?
- est-ce qu'un bioindicateur peut suggérer **une cause responsable d'une altération**, et nous permettre d'en déduire des conséquences et éventuellement des mesures de remédiation ?
- est-ce qu'un organisme donné, présélectionné, peut servir à caractériser brièvement ou à exprimer une généralité ?

# Mesures d'effets biologiques

Les mesures d'effets biologiques peuvent se faire à différents niveaux, de l'infra individuel jusqu'à l'écosystème



# Mesures d 'effets biologiques - les biomarqueurs - Définitions

Les biomarqueurs sont définis comme des **paramètres biologiques** de **réponses sub-létales** et **d'effets des polluants sur des organismes**.

Cette définition inclut un certain nombre de paramètres moléculaires, cellulaires et physiologiques, qui peuvent, en principe, être mesurés par des méthodes peu onéreuses .

L'unité biologique du monde vivant rend possible l'utilisation des mêmes types de biomarqueurs chez des organismes appartenant à des groupes taxonomiques très variés du règne animal et végétal.

# Mesures d'effets biologiques - les biomarqueurs

On distingue généralement plusieurs types de biomarqueurs :

**Le biomarqueur d'exposition** indique que le polluant présent dans le milieu a pénétré dans l'organisme.

Généralement, il est le résultat d'interactions avec des molécules naturelles ou des liquides biologiques.

**Le biomarqueur d'effet** indique, qu'après avoir pénétré, le polluant s'est répandu dans les différents tissus, en exerçant des effets toxiques ou non

+ les indices généraux de stress, dits " non spécifiques " et les marqueurs plus spécifiques

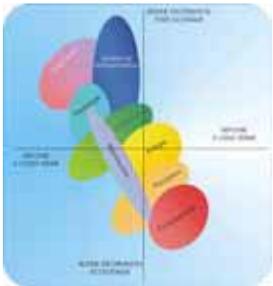
difficulté

*évaluer les conséquences de la contamination des individus sur des niveaux d'organisation biologiques plus élevés (populations, communautés), et finalement sur l'écosystème.*

# Mesures d'effets biologiques - les biomarqueurs

L'utilité des biomarqueurs comme outil d'évaluation de la qualité de l'environnement selon Wolfe, 1992

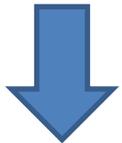
- 1/ **estimer la distribution de substances potentiellement toxiques à la fois dans l'environnement et dans les organismes vivants,**
- 2/ **mettre en évidence des réponses des organismes à l'exposition à des contaminants,**
- 3/ **établir des relations de cause à effet entre la présence des contaminants et les réponses biologiques,**
- 4/ **évaluer les conséquences de la contamination des individus sur des niveaux d'organisation biologiques plus élevés**  
(populations, communautés), et finalement sur l'écosystème.....



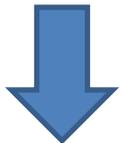
# Mesures d'effets biologiques - les biomarqueurs - Génotoxicité

ADN = structure moléculaire **dépositaire du patrimoine génétique**

L'intégrité de sa structure complexe est essentielle à la survie de la cellule



Modifiable par des agents dits **“génotoxiques”**



DéTECTABLE par :

- l'analyse directe de la structure de l'ADN
- la détection des traductions fonctionnelles

# Mesures d'effets biologiques - les biomarqueurs - Génotoxicité

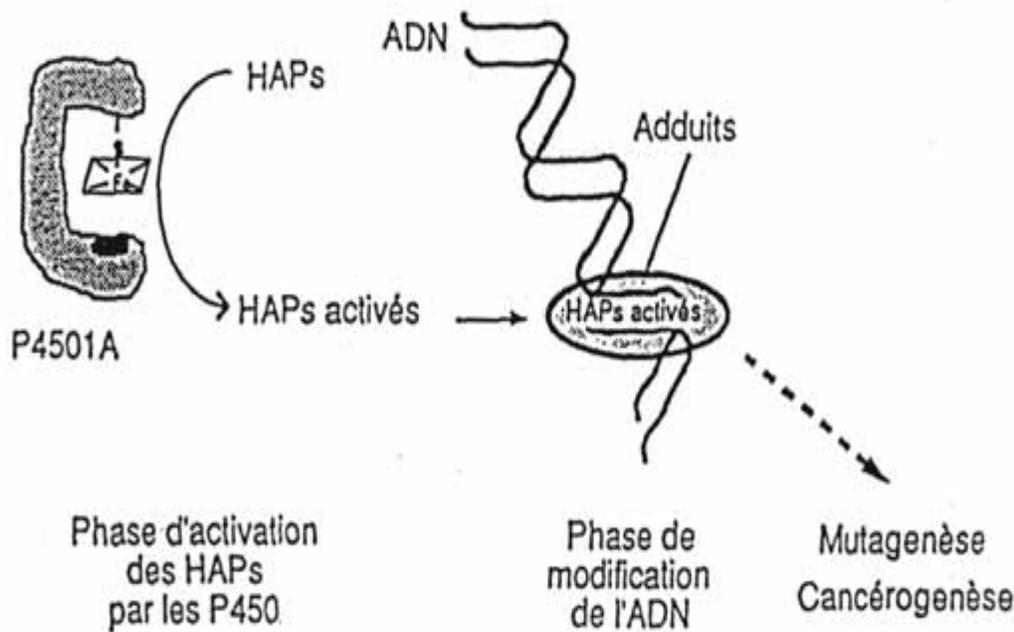
Les xénobiotiques peuvent induire deux types d'altérations susceptibles d'être utilisées comme biomarqueurs:

- 1) la formation de produits d'addition entre **le xénobiotique** et **les nucléotides**, appelés **adduits**
- 2) des **cassures** au niveau d'un seul brin, ou des deux brins, **d'ADN** conduisant parfois à la formation de **micronoyaux**

# Mesures d'effets biologiques - les biomarqueurs - Génotoxicité

## Formation d'adduits

**Liaisons covalentes entre un xénobiotiques (électrophiles) et les sites nucléophiles de l'ADN**



Représentation schématique de l'activation des HAP amenant la formation d'adduits à l'ADN

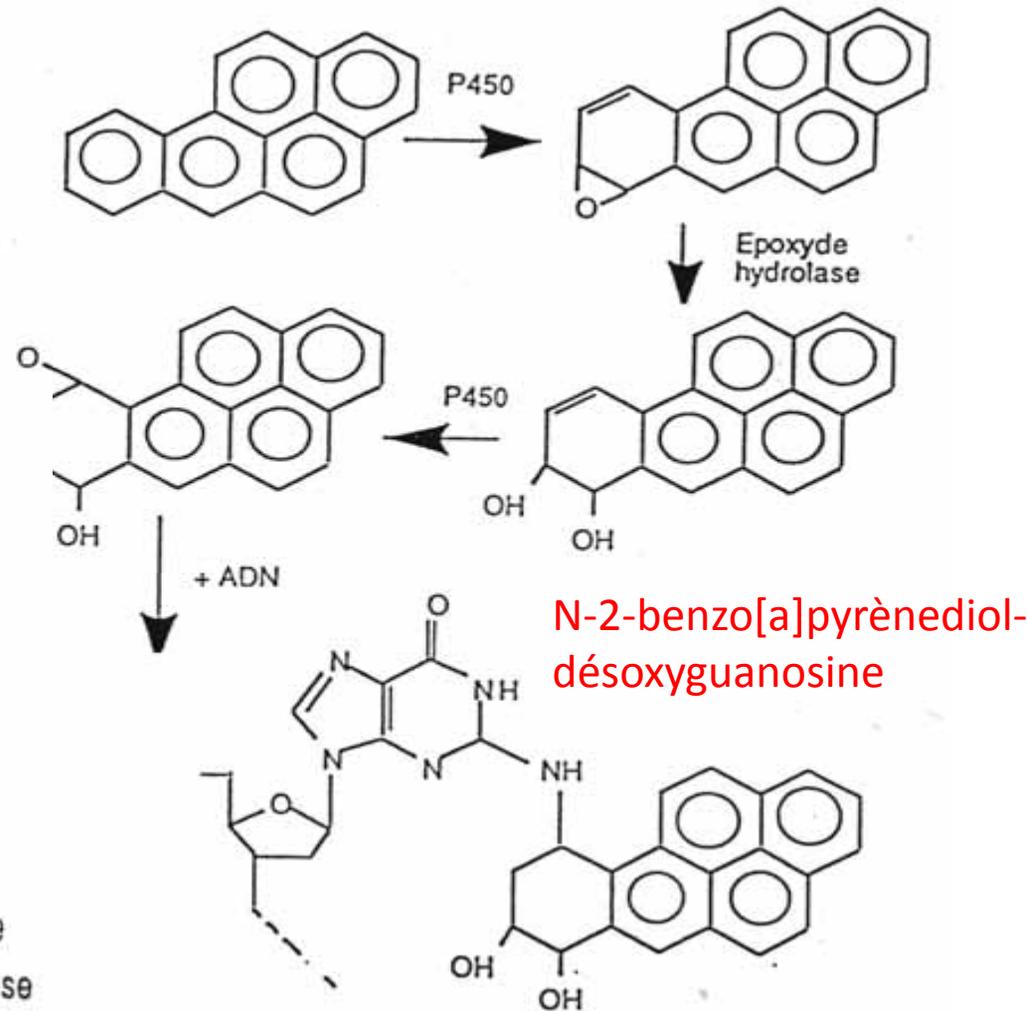


Schéma d'activation du benzo[a]pyrène en carcinogène ultime (\_\_\_diolepoxyde) et formation de l'adduit correspondant

# CYTOCHROMES P450 (CYP)

## Principales enzymes de phase I

- **Hémoprotéines** appartenant à une **famille multigénique**
- exprimées dans le **foie et les tissus extrahépatiques** à l'exception des fibres musculaires et des hématies
- localisées dans la membrane du **réticulum endoplasmique** (xénobiotiques) et **des mitochondries** (endobiotiques)
- Forment un complexe à l'état réduit avec le monoxyde de carbone qui présente un maximum d'absorption **vers 450 nm**
- Nécessitent:
  - NADPH2
  - NADPH cytochrome P450 réductase
  - cytochrome b5 et sa réductase (CYP2E1, CYP3A)

# ABSORPTION

Passage du **xénobiotique** du **site d'administration** jusqu'à la **circulation systémique**

- **Nature chimique** du composé conditionne son absorption:
  - Pour traverser les membranes le xénobiotique doit présenter une certaine **liposolubilité**
  - Seule la **fraction non ionisée** (donc liposoluble) est capable de passer les membranes biologiques
  - L'ionisation est déterminée par:
    - le pKa du xénobiotique ( **$pK_a = -\log K_a$** ; **Pka pour déterminer la force d'un acide; Plus l'acide est fort plus le pKa a est petit**)
    - le pH du milieu

# ABSORPTION

Un toxique peut pénétrer dans l'organisme par différentes voies:

– **voie orale**

– **voie pulmonaire**

– **voie cutanée**

– **voies mineures:**

- absorption sous-cutanée
- absorption intramusculaire
- voie intraveineuse (pas d'absorption)

# Mesures d'effets biologiques - les biomarqueurs - Génotoxicité

## Fragmentation de l'ADN

- **Cassures de mono-brins d'ADN  
(Single Strand Break)**

Extraction, dénaturation et déroulement  
de l'ADN

Les brins cassés sont les premiers

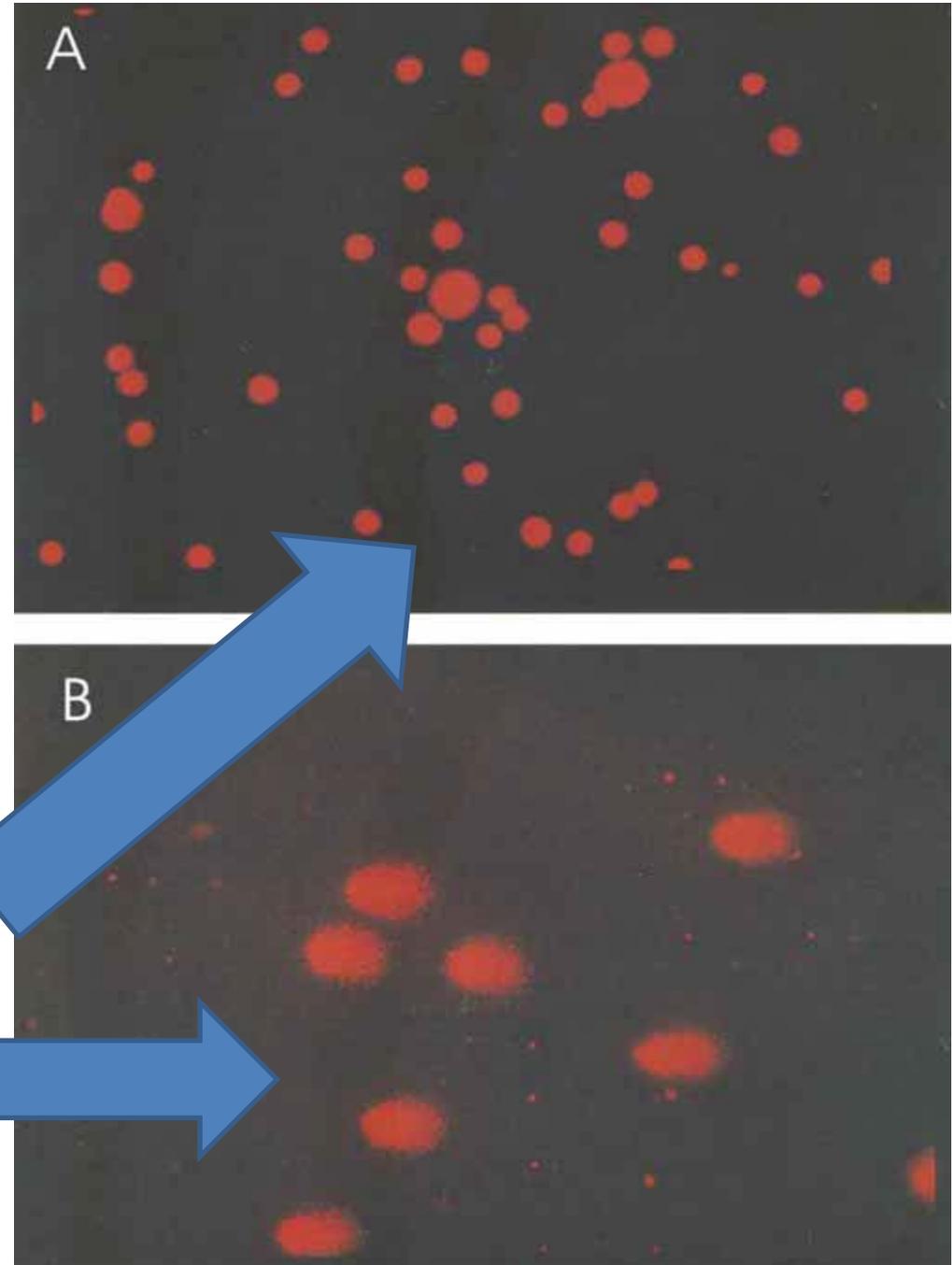
Séparation par chromatographie et  
quantification

- **Le test comète**

Pas d'extraction d'ADN

Analyse sur les noyaux inclus dans de  
l'agarose et présentés sur lame

Dénaturation et migration par électrophorèse



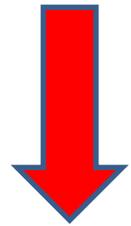
# Mesures d 'effets biologiques - les biomarqueurs - Protéines de stress

**Les protéines de stress** - toutes les protéines inductibles par un sens au sens large : **protéines de choc thermique, protéines « glucose régulées », ubiquitine, métallothionéines ou P-glycoprotéines du système MXR...**

- Une réponse similaire chez tous les organismes. Des molécules ubiquistes, marqueurs phylogénétiques.
- **La réponse universelle à un stress = induction de protéines jouant un rôle clé dans les processus de protection, réparation et/ou élimination des protéines endommagées**
- Des protéines susceptibles d'accroître la tolérance des organismes
- Leur accumulation peut permettre d 'identifier les organes cibles de substances chimiques nouvelles

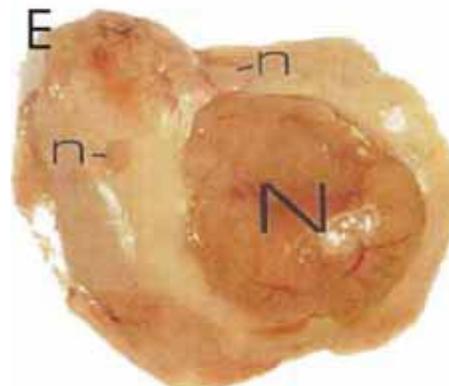
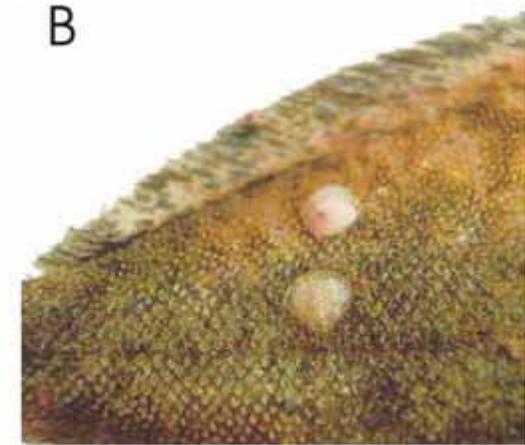
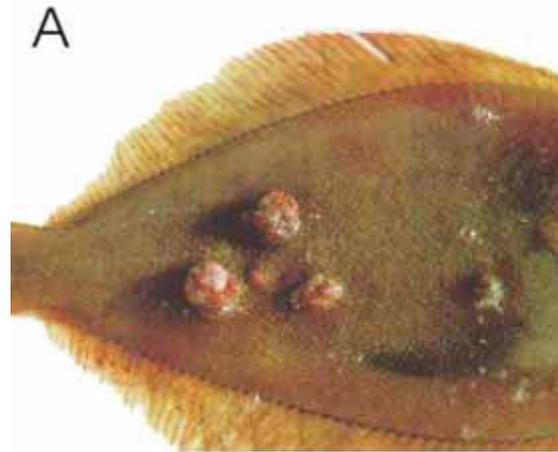
# Mesures d'effets biologiques - les biomarqueurs – Marqueurs morphologiques

Changements physiologiques et biochimiques induits par les contaminants



Lésions des cellules, des tissus et organes

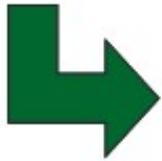
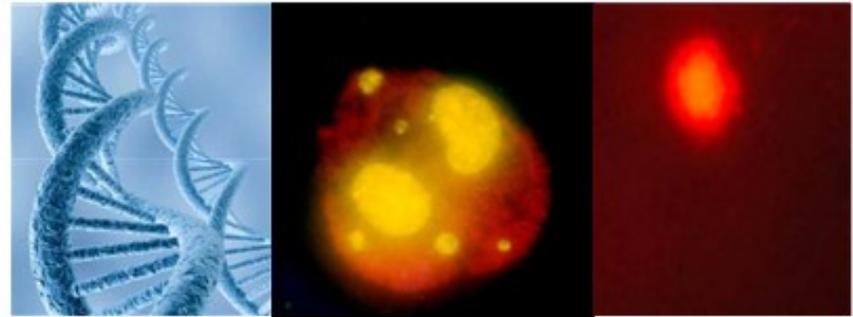
Les altérations morphologiques permettent d'évaluer les effets d'exposition de longues durées, même à de faibles niveaux de contamination



# 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



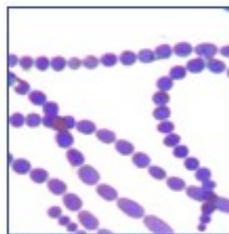
## Bio-marqueurs

### Mutations géniques

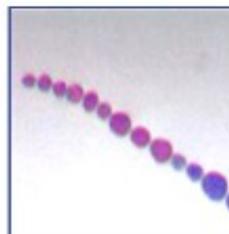


Plantes du genre *Tradescantia*  
hétérozygotes pour le gène de la  
couleur des poils (P/p)

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



Phénotype  
sauvage

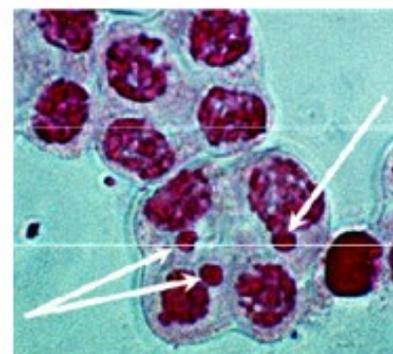


Phénotype  
muté

### 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*



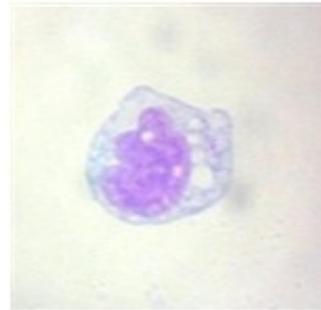
HAPs  
Métaux  
Pesticides



## Bio-marqueurs

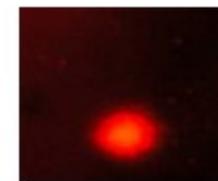
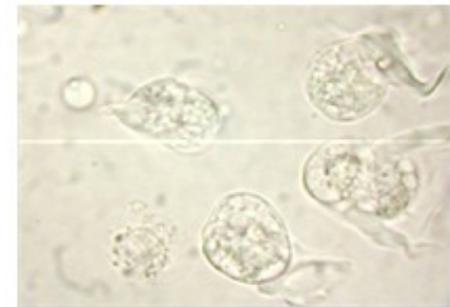
### Mutations chromosomiques

Test des micronoyaux  
effectué sur  
cœlomocytes

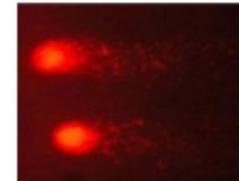


### Détection des lésions de l'ADN

Test des comètes effectué sur  
cœlomocytes



Cellule intacte



Cellule lésée

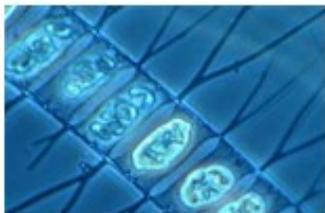


**Contaminants particuliers et dissous**

# Génotoxicité des milieux aquatiques

## Bio-indicateurs

### Organismes invertébrés



*Plancton*



*Hydres*



*Daphnies*



*Gammares*



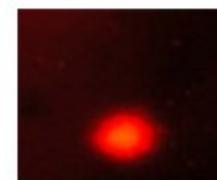
*Gastéropodes*



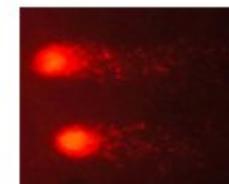
*Polychètes*

## Bio-marqueurs

### Détection des lésions de l'ADN



*Cellule intacte*



*Cellule lésée*



**Contaminants dissous ou particulaires (sédiments)**

# Génotoxicité des milieux aquatiques

## Bio-indicateurs

### Organismes vertébrés



*Poissons*

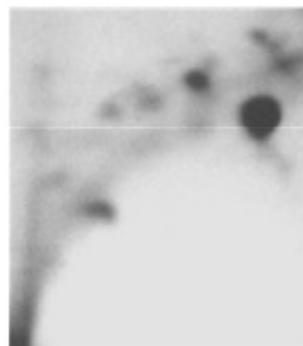


*Larves d'amphibiens*

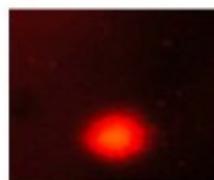


## Bio-marqueurs

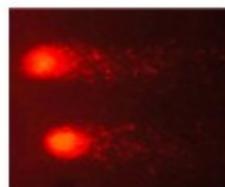
### Détection des adduits à l'ADN



### Détection des lésions de l'ADN

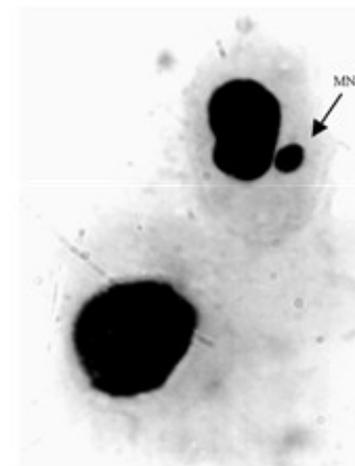


*Cellule intacte*



*Cellule lésée*

### Mutations chromosomiques



*Micronoyaux dans les érythrocytes*



**Contaminants dissous dans le compartiment aquatique**  
**Transfert trophique**

# Etude du risque génotoxique lié à une pollution organique dans les sédiments de l'estuaire de Bouregreg



# Etude du risque génotoxique dans l'estuaire

## Etude pilote :

Quels bio-marqueurs et bio-indicateurs de génotoxicité peut-on utiliser pour estimer le risque génotoxique dans les sédiments ?



### 3 sites de prélèvement :

**B9 : Site 1**

**B10 : Site 2**

**B11 : Site 3**

**Modérément  
impactés**

**Fortement  
impacté**



**Analyses physico-chimiques**

**Génotoxicité des sédiments**

**Effets génotoxiques sur  
espèces sentinelles**

# Etude du risque génotoxique dans l'estuaire

## Analyse physico-chimique de la pollution dans les sédiments

### Taux de métaux cancérogènes



### Taux de HAPs cancérogènes



Importante pollution d'origine organique (HAPs) au niveau du site B11, par rapport aux sites B9 et B10

Contamination due à la présence de l'aéroport, d'un réseau routier dense et des zones industrielles de Salé

# Etude du risque génotoxique dans l'estuaire

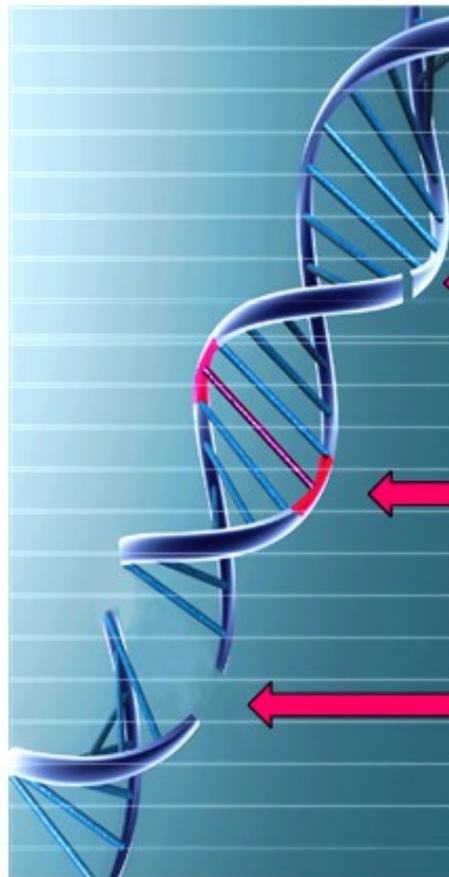
## Etude de l'activité génotoxique des sédiments sur bactéries et lignées cellulaires



Récolte des sédiments



Extraction des polluants organiques (HAPs)



### Lésions de l'ADN

Test des comètes  
Sur cellules en culture

### Mutations géniques

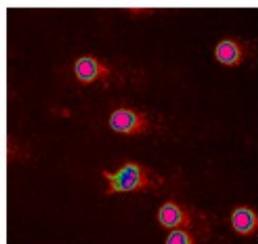
Test d'Ames  
Sur bactéries (TA 98)

### Mutations chromosomiques

Test des micronoyaux  
Sur cellules en culture

# Etude du risque génotoxique dans l'estuaire

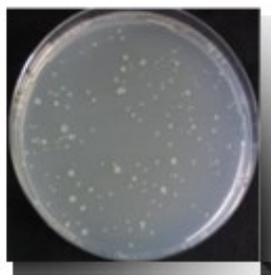
## Etude de l'activité génotoxique des sédiments sur bactéries et lignées cellulaires



**Lésions de l'ADN**  
**Sur cellules en culture**  
Test des comètes

B9  
B10  
6.10<sup>3</sup> Lésions /g

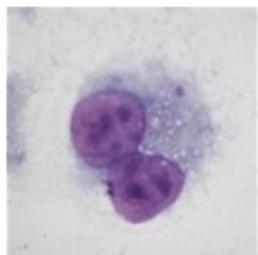
B11  
1.10<sup>4</sup> Lésions /g



**Mutations géniques**  
**Sur bactéries**  
Test d'Ames (TA 98)

B9  
B10  
800 Mutations /g

B11  
800 Mutations /g



**Mutations chromosomiques**  
**Sur cellules en culture**  
Test des micronoyaux

B9  
B10  
700 Micronoyaux /g

B11  
800 Micronoyaux /g

# Etude du risque génotoxique dans l'estuaire

## Etude de l'effet génotoxique des sédiments sur espèces sentinelles

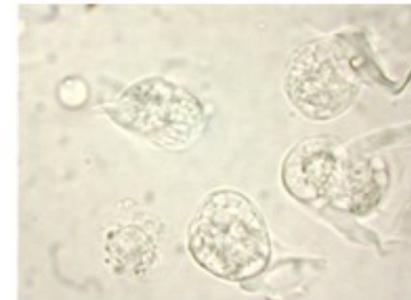
### Choix du bio-indicateur :

- Espèce naturellement présente dans les sédiments de l'estuaire
- Espèce sédentaire et abondante tout au long de l'année
- Espèce capable de survivre dans les milieux perturbés
- Espèce facile à prélever, à identifier et à utiliser

**Oligochète : *Nereis succinea***



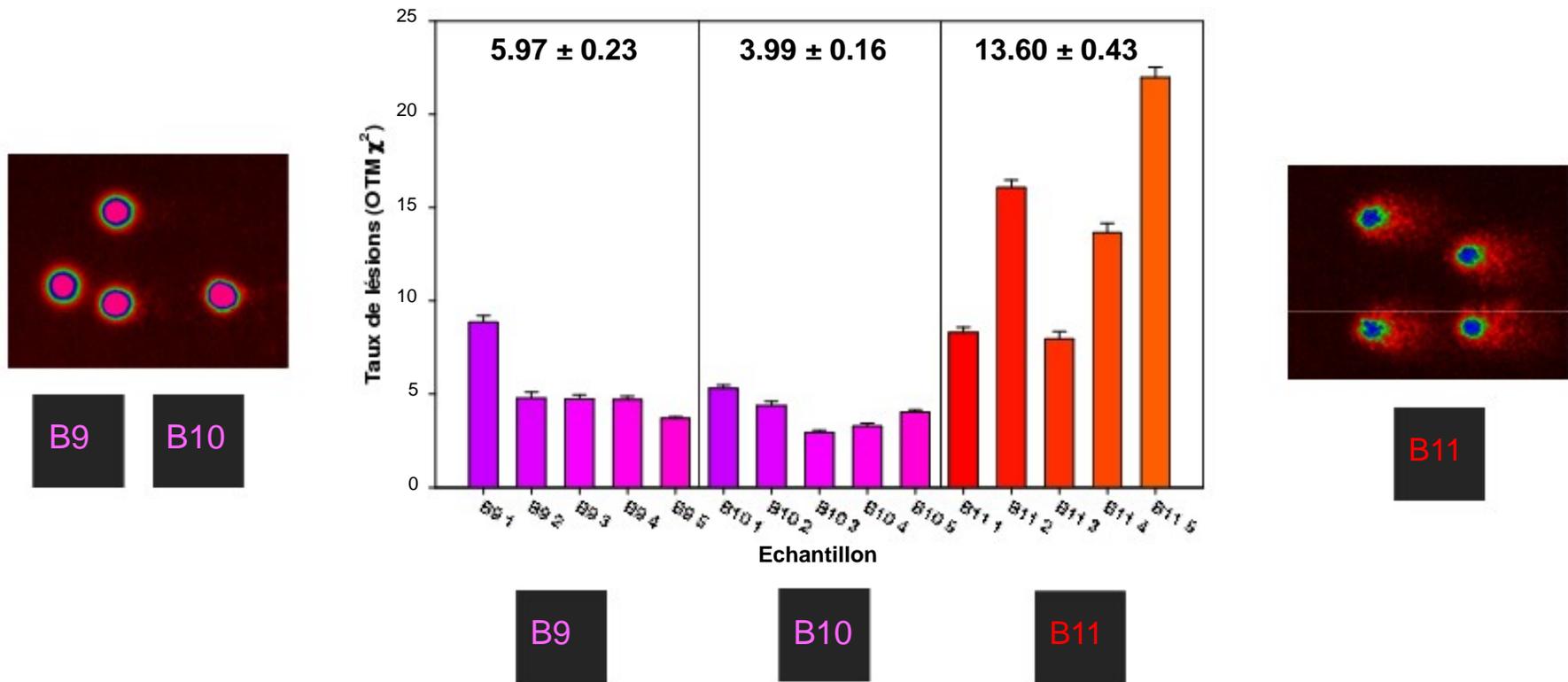
Récolte dans les sédiments



Prélèvement des coelomocytes par piqûre intra-coelomique

# Etude du risque génotoxique dans l'estuaire

Etude de l'effet génotoxique des sédiments sur les néréis (*N. succinea*)  
Test des comètes sur cœlomocytes (sur 5 individus/site)



Augmentation significative des taux de lésions de l'ADN dans les cœlomocytes des néréis prélevées au site B11, par rapport aux sites B9 et B10

# Etude du risque génotoxique dans l'estuaire

## Conclusion

**Mise en évidence d'un effet génotoxique des sédiments sur les néréis pour le site B11 :  
présence de lésions de l'ADN dans les coelomocytes**

**Intérêt de *N. Succinea* comme bio-indicateur d'un risque génotoxique pour l'estuaire de Bourgreg  
Différence significative entre les sites impactés et les sites témoins  
Faible variabilité des résultats dans les sites peu impactés**

**Intérêt du test des comètes comme bio-marqueur de génotoxicité  
Bonne sensibilité  
Bonne applicabilité à de nombreux types cellulaires**

### **Mais :**

**Résultats à confirmer sur un nombre plus important d'individus et un panel plus important de sites**

**Protocole à améliorer pour éviter tout stress supplémentaire au cours de la récolte, du transport, des expérimentations..**

# Etude du risque génotoxique dans l'estuaire de Bouregreg

## Conclusion

### Analyses physico-chimiques

Méthodes sensibles  
Valeurs quantitatives

Analyses ciblées  
Effets biologiques ?



### Activités biologiques

Activité génotoxique globale  
Effets des micropolluants

Efficacité des techniques d'extraction  
Validité des modèles biologiques



### Bio-évaluation

Effets des polluants *in situ*  
Impact global en temps réel

Signification des bio-marqueurs  
Choix des bio-indicateurs



Evaluation globale de la qualité des  
sédiments