

Mesure des biomarqueurs de génotoxicité

Garantir l'opérationnalité du test des comètes en biosurveillance environnementale

M. Bonnard

Ensemble des collaborateurs :

Xuereb B, Abbaci K, Amara R, Auffret M, Bado-Nilles A, Bonnard I, Bonnard M, Burlion M, Cant A, Catteau A, Charle M, Chaumot A, Costil K, Coulaud R, Couteau J, Dedourge-Geffard O, Delahaut L, Delorme N, Diop M, Duflot A, Garnerio L, Geffard O, Fisson C, Le Foll F, Le Guernic A, Maillet G, Palos-Ladeiro M, Peignot Q, Porcher J-M, Poret A, Recourra-Massaquant R, Rioult D, Serpentine A, Tremolet G, Geffard A

Portage & coordination



Financement



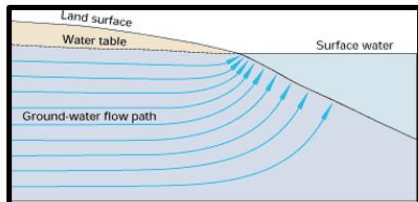
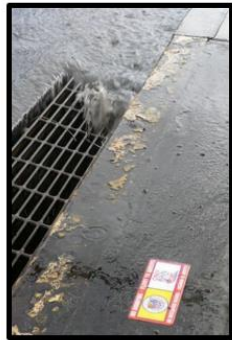
Labélisation



Consortium scientifique



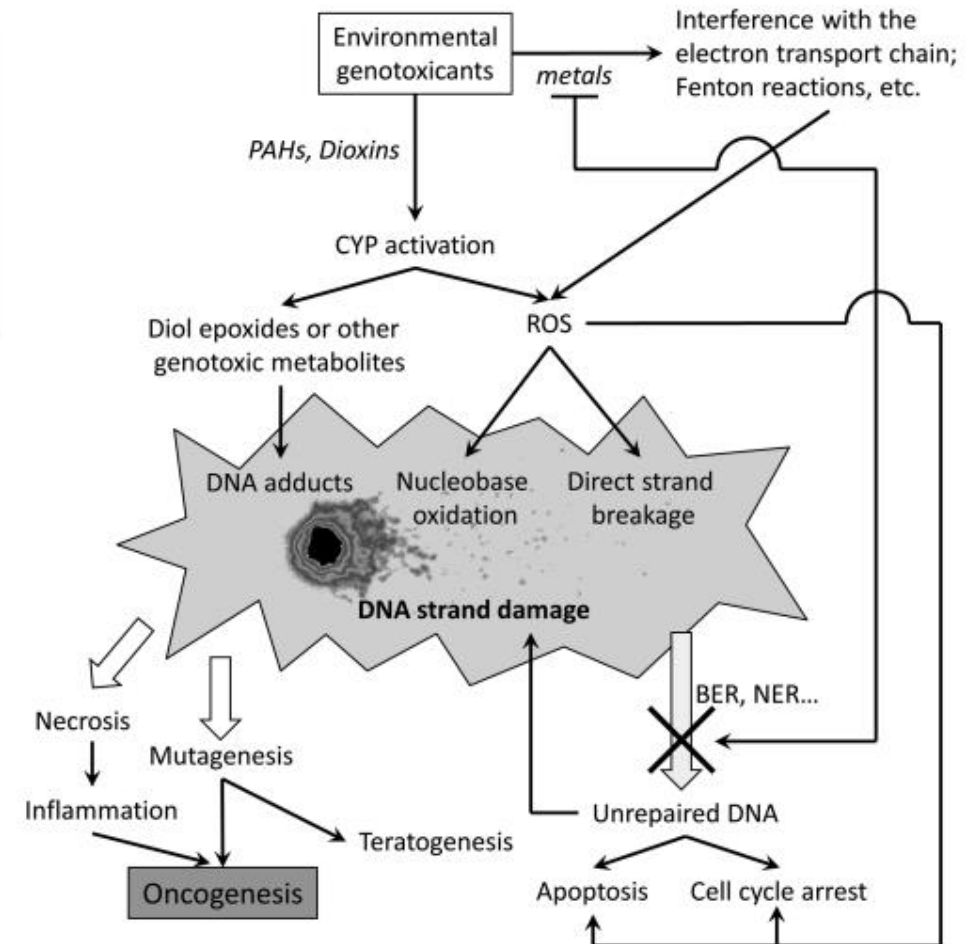
- Génotoxicité environnementale : **Un tiers des contaminants** rejetés dans les compartiments aquatiques ont des **propriétés génotoxiques** (par action directe ou indirecte) (Claxton et al., 1998)
- Substances prioritaires (DCE) : 1/3 cancérigènes dont 2/3 génotoxiques



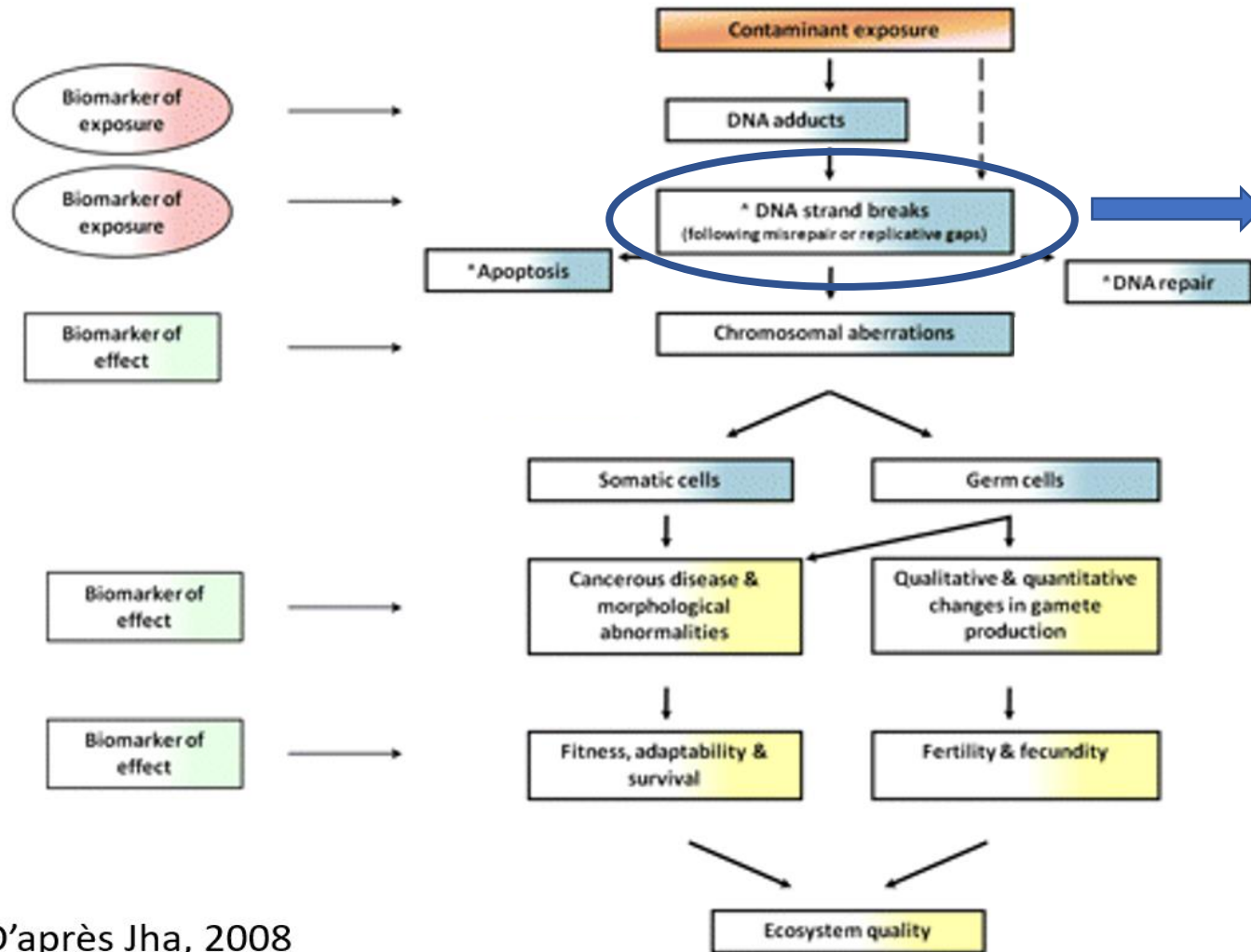
SOURCES

Dilution, Decay,
Sorpton, Sedimentation

POST-EMISSION
EXPOSURE



Biomarqueurs de génotoxicité : Outils intégrés, capables de fournir une information complémentaire aux analyses chimiques et écologiques pour évaluer la toxicité liée à la pollution aquatique (Jha, 2008 ; Lacaze et al., 2011a ; Bolognesi et al., 2014 ; Hussain et al., 2018)



Test des comètes en condition alcaline (pH > 13) (Singh et al., 1988)

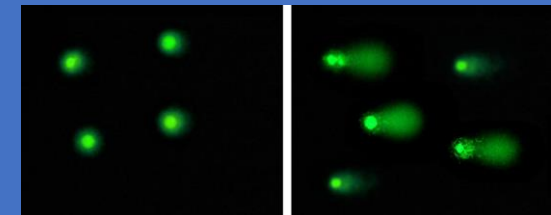
Mise en évidence d'une diversité de dommages :

cassures de brins (+ sites alcali-labiles)

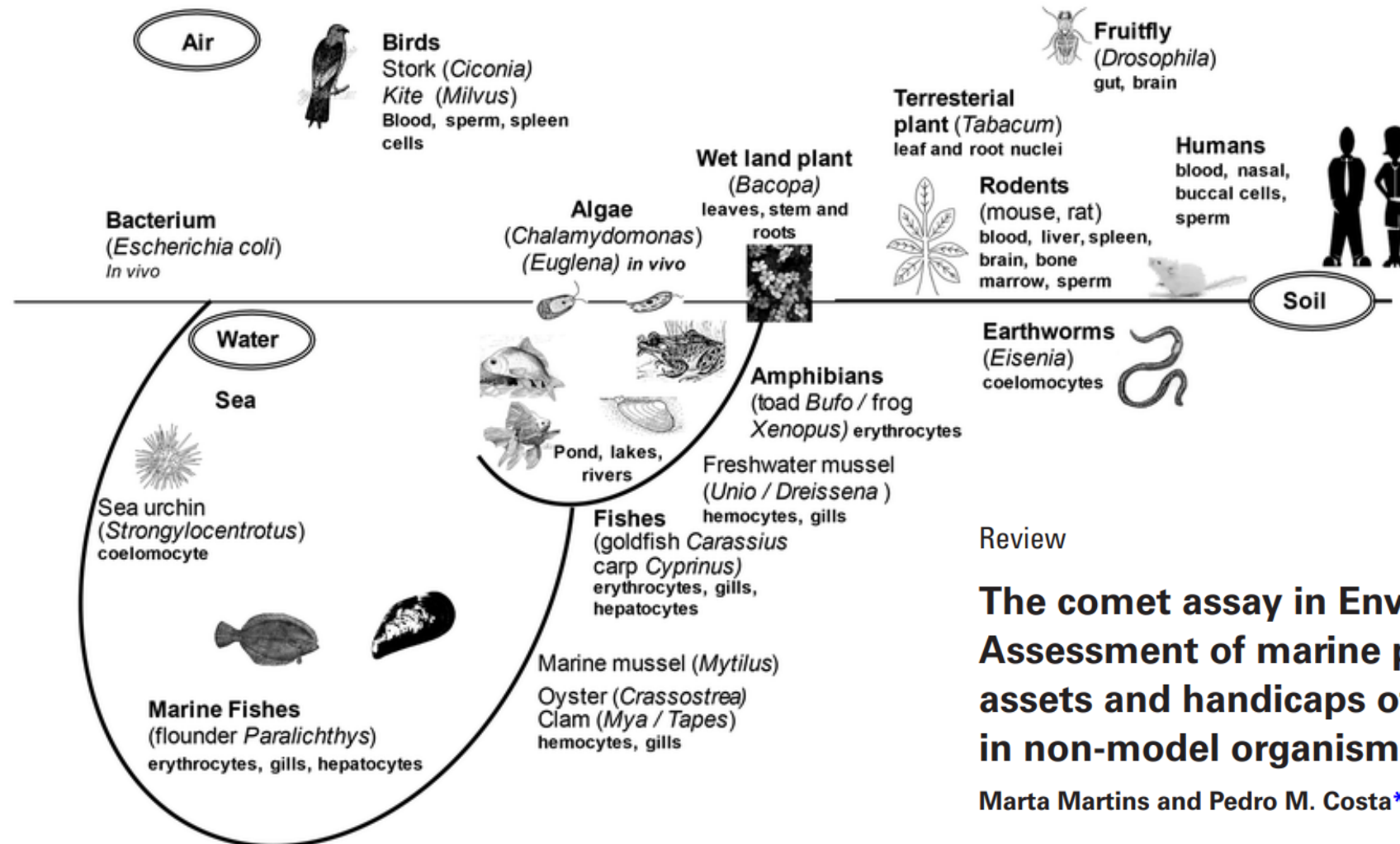
Sensibilité de l'essai

Rapidité (résultat dans la journée)

Evaluation au niveau de cellules individualisées



Test des comètes préconisé en biosurveillance de la génotoxicité environnementale (Bolognesi et al., 2014).



Harmonisation et calibration des protocoles => pas le même recul entre les modèles biologiques

Mollusques bivalves



Dreissena polymorpha
La moule zébrée



Mytilopsis leucophaeata ★
La fausse moule brune



Mytilus edulis ★
La moule bleue

Crustacés



Gammarus fossarum
Le gammare



Palaemon spp
La crevette bouquet
et la crevette blanche

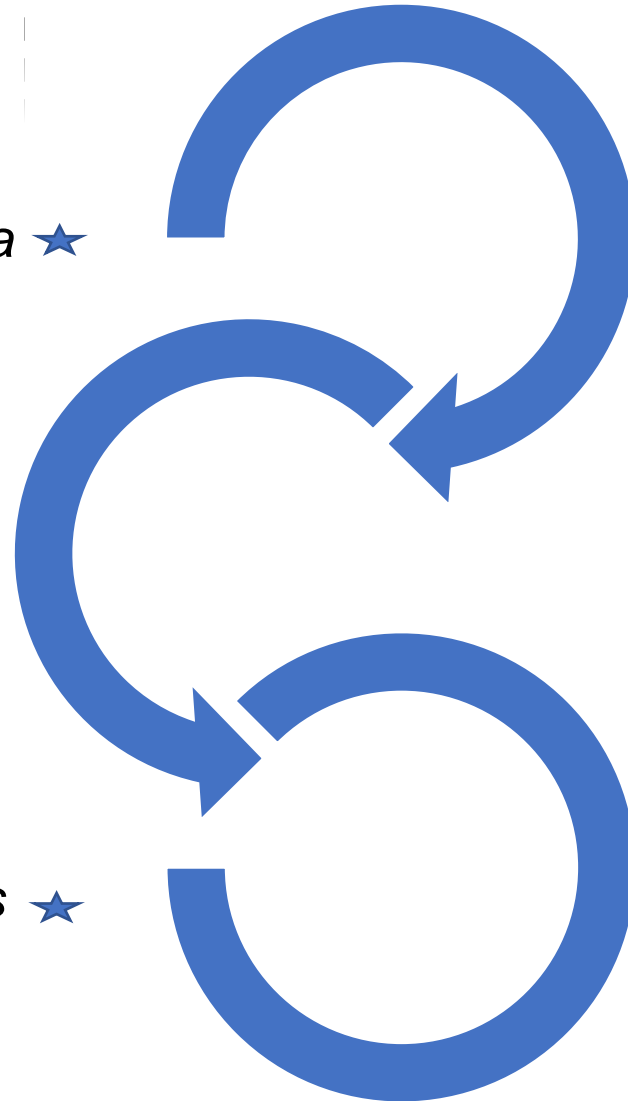
Poissons



Gasterosteus aculeatus ★
L'épinoche à 3 épines



Platichthys flesus
Le flet



1. **Recueil** (expériences partenaires /littérature) **et comparaison** des protocoles expérimentaux

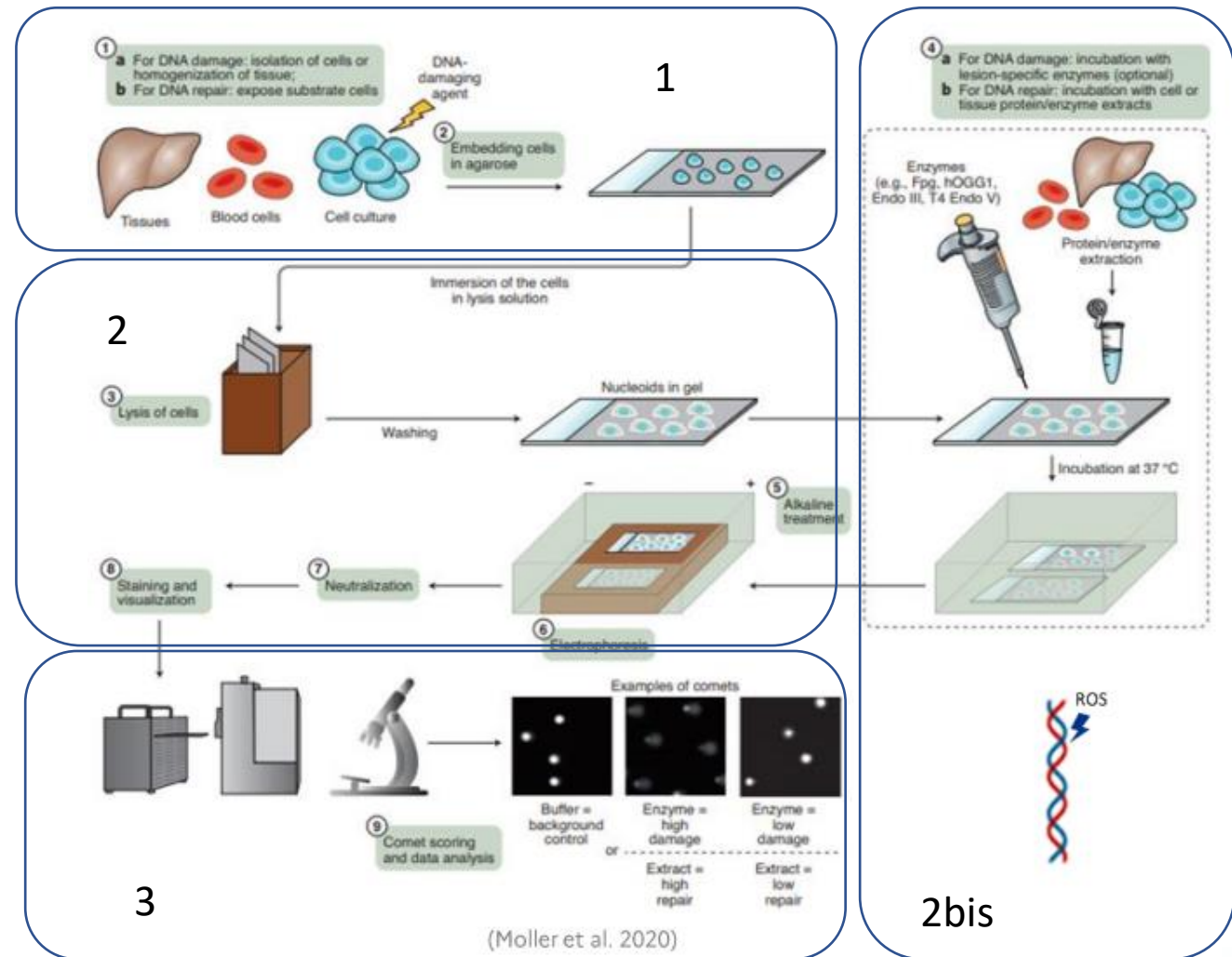
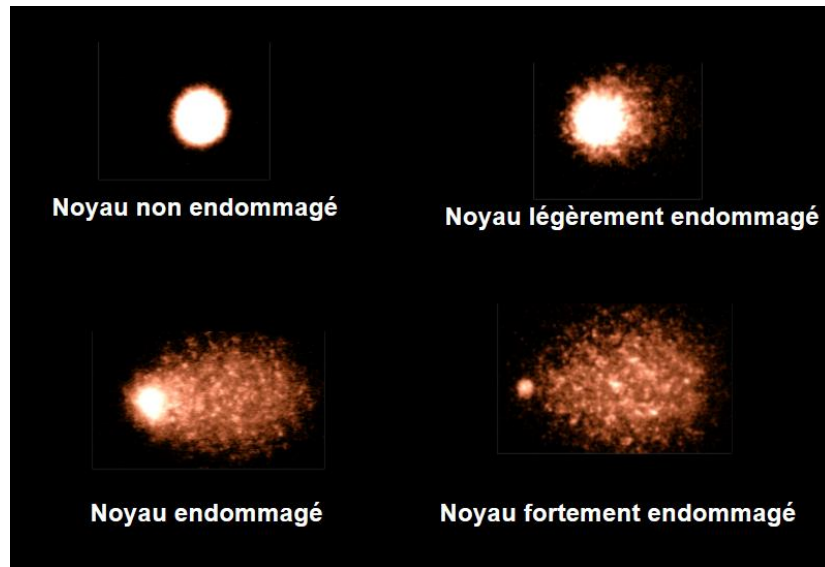
2. **Harmonisation de la mesure** des cassures de brins de l'ADN
=> Variabilité intra-inter-laboratoires

3. Définition/amélioration des **valeurs de référence et seuils** – présentation O. Geffard

4. Evaluation de la **génotoxicité au niveau du continuum Seine** – présentation M. Bonnevalle-Normand

Principe

Mesure des dommages à l'ADN après migration électrophorétique sur micro-gel d'agarose des fragments d'ADN endommagé du reste de l'ADN intact.



Trois étapes principales

1. Prélèvement-préparation des cellules d'intérêt
2. Protocole expérimental du test des comètes
3. Coloration/Scoring et analyse des résultats

Mollusques bivalves



Dreissena polymorpha
La moule zébrée



Mytilopsis leucophaeata
La fausse moule brune



Mytilus edulis
La moule bleue



Hémocytes

Cellules somatiques

Sensibilité aux génotoxiques

Multiples fonctions cellulaires > *Cf lien immunité*

> **Etat de santé des organismes**

Disponibilité toute l'année, prélèvement non létal

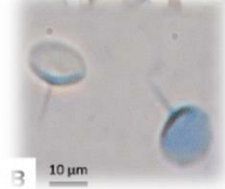
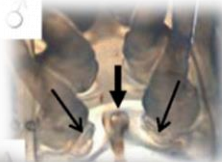
Crustacés



Gammarus fossarum
Le gammare



Palaemon spp
La crevette bouquet
et la crevette blanche



Spermatozoïdes

Cellules reproductrices

+ Densité cellulaire élevée

+ Capacités de réparation absente/limitée (Erraud et al., 2019)

=> **Intégrateur des pressions génotoxiques**

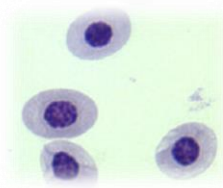
Poissons



Gasterosteus aculeatus
L'épinoche à 3 épines



Platichthys flesus
Le flet



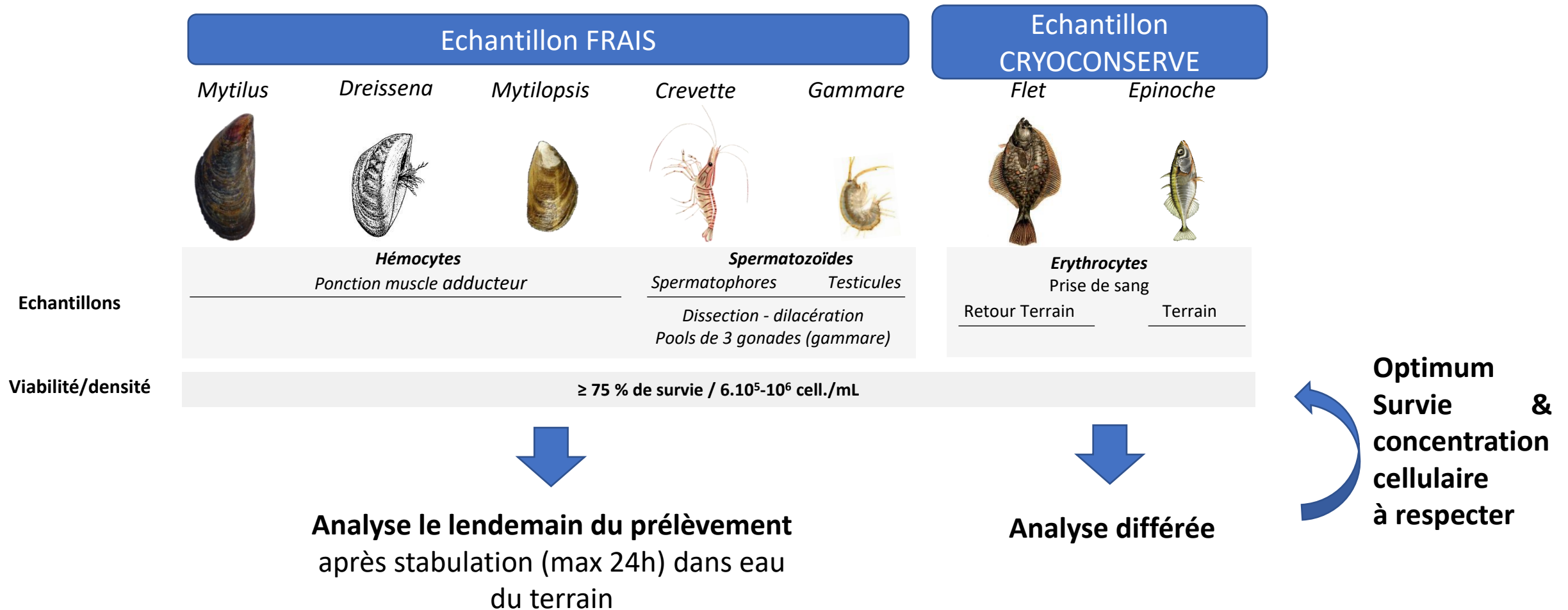
Erythrocytes

Cellules somatiques

+ Densité cellulaire élevée

+ Capacités de réparation limitée (Santos et al., 2014)

Double stratégie : Analyse sur échantillons frais (Mollusques, Crustacés) ou congelés (Poissons)

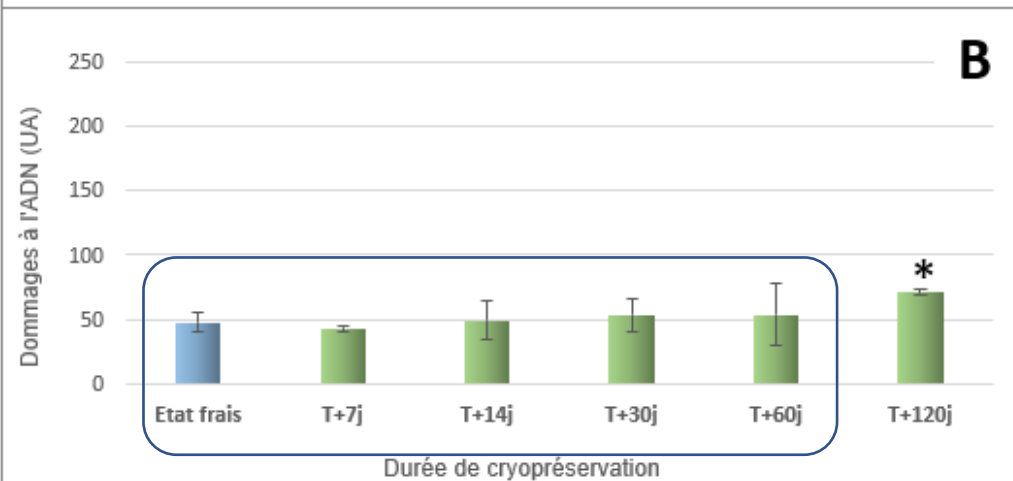
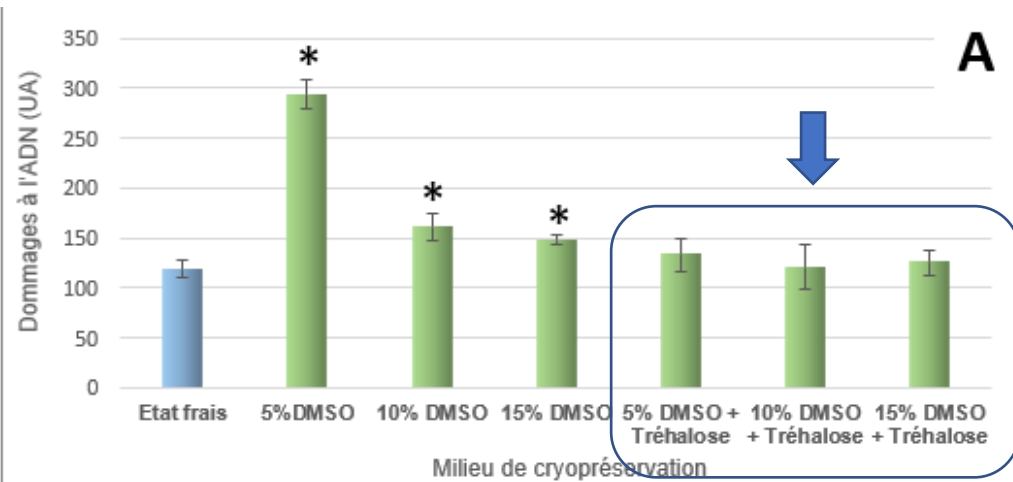


⇒ Analyse comètes peut conditionner **la stratégie de déploiement** sur le terrain

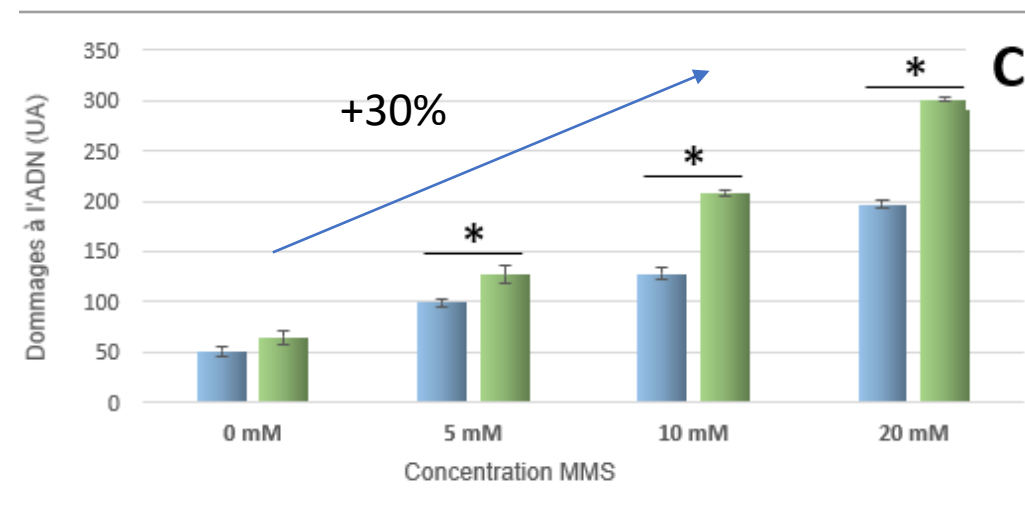
Cryopréservation testée sur les modèles cellulaires (Bivalves, Crustacés)

⇒ Garantir que la cryoconservation n'impacte pas la qualité de l'ADN

⇒ Maitriser la cinétique/temps de (dé)congélation



Ex. Crevette





Garantir

Inclusion

2 min-gels agarose 0.5 %
Support : Lame microscope

qualité des gels

Lyse

2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10

1 h

18 h

1 h

Dénaturation

300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH >13 ; 30 min

Electrophorèse

300 mA / 20 V ; 24 min
Cuve 20 lames

Neutralisation

0.4 mM Tris-HCl, pH 7.5 ; 2 x 10 min

Déshydratation

EtOH absolu ; 5 min

Coloration

SYBR Green (1X) ; 5 min
Système d'acquisition d'image : EVOS®

Quantification

100 comet / gel
Unité : % tail DNA
Système d'analyse : Comet assay IV®

Accès ADN et
migration optimale
des fragments
endommagés

Analyse robuste
des résultats



- ⇒ *Analyse semi-automatisée du taux d'endommagement à l'ADN*
- ⇒ *Harmonisation expérimentateurs*

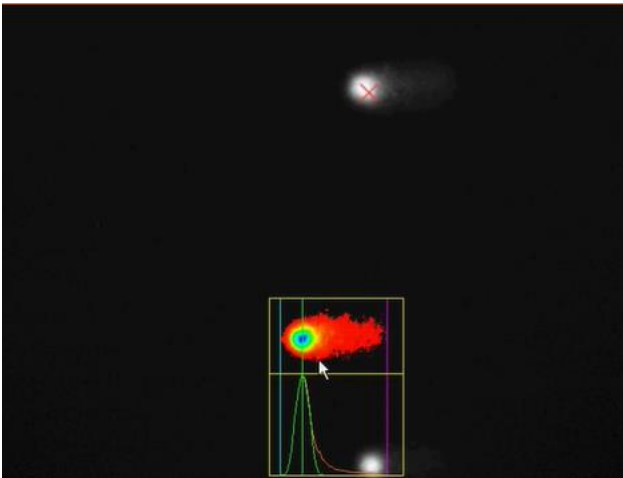
Par organisme

min. 100 comètes/gel
2 minigels/lame

Paramètre mesuré :

% Tail Intensity (*% ADN endommagé*)

=> Moyenne des médianes des gels

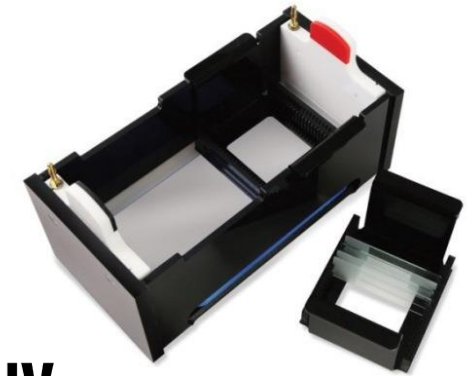


Travail d'inter-calibration (échantillons d'érythrocytes d'épinoche exposés-MMS ou non)

- ⇒ **CONSTAT** : Bonne REPETABILITE mais défaut de REPRODUCTIBILITE (variabilité inter-laboratoires)
- ⇒ **CAUSES ?** 1. couple *générateur & cuve électrophorétique* (migration différentielle des brins d'ADN)
- 2. Système d'acquisition des résultats (logiciels d'analyse d'image)

Noms des produits	Numéros CAS	Lab A	Lab B	Lab C & D
2-Hydroxyethyl agarose, type VII low gelling temperature	39346-81-1			
Agarose Type I, low EEO	9012-36-6			
Agarose low gelling temperature Type VII-A	39346-81-1			
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	67-68-5			
DAPI, for nucleic acid staining	28718-90-3			
Ethanol	64-17-5			
Ethylenediaminetetraacetic acid sodium salt, dihydrate (Na ₂ EDTA.2H ₂ O)	6381-92-6			
Hydrochloric acid (HCL)	7647-01-0			
Methyl methanesulfonate (MMS)	66-27-3			
Mowiol® 4-88	9002-89-5			
N-Lauroylsarcosine sodium salt	137-16-6			
Phosphate buffered saline tablets	-			
Potassium Chloride (KCl)	7447-40-7			
Potassium phosphate monobasic anhydrous (KH ₂ PO ₄)	7778-77-0			
Propidium iodide	25535-16-4			
Sodium chloride (NaCl)	7647-14-5			
Sodium hydroxyde (NaOH)	1310-73-2			
Sodium phosphate dibasic anhydrous (Na ₂ HPO ₄)	7558-79-4			
SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain - 10,000X concentrate in DMSO	-			
SYBR™ Green I Nucleic Acid Gel Stain - 10,000X concentrate in DMSO	163795-75-3			
Triton™ X-100	9002-93-1			
Trizma® base, Tris(hydroxymethyl)aminomethane	77-86-1			
Trypan Blue Solution	72-57-1			
VistaGreen 1X (OxiSelect™ Comet Assay Kit)...	-			

diversité des systèmes de migration et de logiciels d'analyse



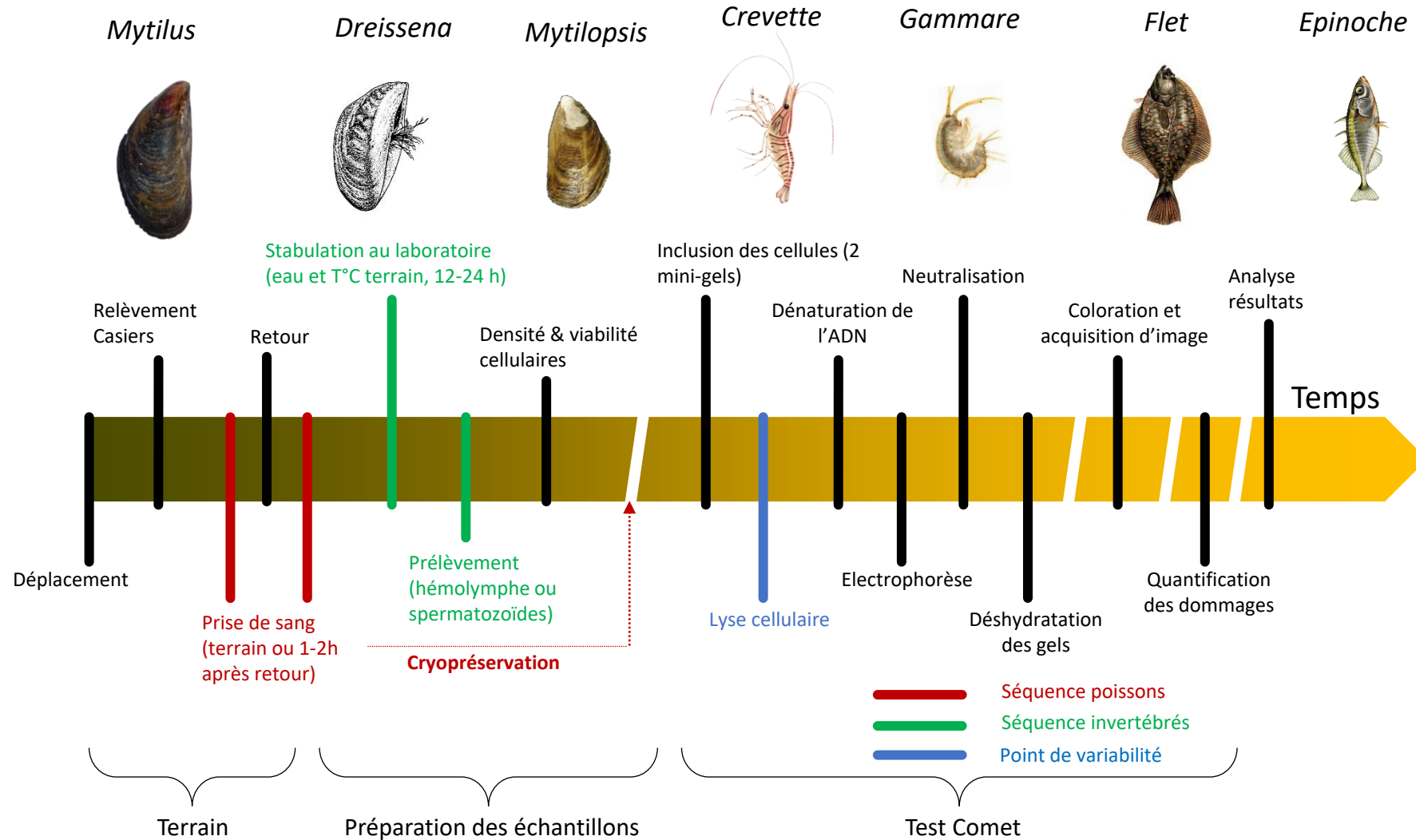
Comet Assay IV
live video measurement system
for the comet assay

Recueil des protocoles expérimentaux
(produits, tampons, étapes...)

➔ Stratégie Sashimi/Biosurveillance
Analyse centralisée des données comètes






Perspectives : Référentiel commun inter-laboratoires
(matériel, contrôles méthodologiques, ...)



➔ **Test des comètes : Evaluation de la génotoxicité environnementale par le test des comètes opérationnelle le long d'un continuum eau douce-eau de transition – eau marine**

Stratégie employée (prés. O. Geffard)

- Acquisition de la donnée (moules *Mytilopsis*, *Mytilus*, épinoche...)
- Compléter/Valider les données antérieures (autres modèles)

	Issues de populations naturelles (référence)	Issues de populations d'élevage
Acquisition en condition (semi)-contrôlée		
Acquisition <i>In situ</i>		



Avancées récentes dans le développement du test des comètes chez la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) et son application en biosurveillance environnementale

Marc Bonnard¹, Laurence Delahaut¹, Isabelle Bonnard², Véronique Gaillot¹, Christelle Lopes², Benoît Xuereb³ & Alain Geffard¹

¹ Université de Reims Champagne-Ardenne (URCA), UMR-102 SEBIO (Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques), 51687 Reims cedex, France
² Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive et Développement UMR 5175, 69622 Villeurbanne, France
³ Université de Haute Normandie (UNHN), UMR-102 SEBIO (Stress Environnementaux et Biosurveillance des milieux aquatiques), 76053 Le Havre cedex, France

Contexte : Impliqués dans de multiples fonctions physiologiques (immunité, détoxication, maintien de l'homéostasie...), les hémocytes ou cellules circulantes de l'hémolymphe représentent un tissu biologique de choix pour le développement et la mesure de biomarqueurs. A ce titre, ils traduisent l'état de santé des dreissenidés face à la contamination de leur milieu.

Cette communication met en avant la mesure de l'intégrité de l'ADN par le test des comètes (SCGE assay - Single cell gel electrophoresis assay) chez la moule zébrée *Dreissena polymorpha* (Polks, 1772) et son application dans un contexte de biosurveillance de la qualité des masses d'eau continentales.

Paramètre	Unité	Condition
Temps de culture	h	24 h
Temps de culture	h	24 h
Temps de culture	h	24 h
Temps de culture	h	24 h
Temps de culture	h	24 h

Prélevement : Moulus Laboure (15-20h)
 Culture : Moulus Laboure (15-20h)
 Suivi : Moulus Laboure (15-20h)
 Expérimentation : Moulus Laboure (15-20h)
 Parcellaire : Moulus Laboure (15-20h)

➤ Définition de valeurs de référence des cassures de brins (SB) pour le suivi de la génotoxicité environnementale

Engagement d'une population contrôlée de dreissenidés (Lac du Der-51) pendant trois semaines sur un total de 26 sites du quart Nord-Est de la France entre 2017 et 2020

Sites sélectionnés en accord avec les agences de l'eau selon des conditions physico-chimiques (TC, conductivité, O2 dissous...) et des contextes variés

➤ Elargir le suivi avec la détection d'autres lésions de l'ADN (i.e. *Fpg sensitive-sites*) et la compilation des réponses hémocytaires dans un indice intégrateur

I. Développement méthodologique du test des comètes *Fpg*-modifié

Détection des sites sensibles à la Formamidopyrimidine glycosylase (Fpg) (sites...)

➤ Lecture du tampon de dilution de la *Fpg*

Tampon 1: 0.1mM KCl, 40mM HEPES, 0.5mM EDTA, 0.2mg/ml BSA, pH 8 (Collins et al., 2011, 2014)

Tampon 2: 50 mM HEPES-KOH, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.6 (Vincens-Hubert et al., 2012)

➤ Traitement enzymatique à la *Fpg* (suivi à l'étape de l'essai)

Temps d'incubation : 15-30-45-60 min

Concentration : 0; 0.1; 0.5; 1; 2.5 U/ml-1

NB : Paramètre retenu en gras

➤ Harmoniser, comparer et replacer la réponse des espèces sentinelles le long d'un continuum eau douce-eau de transition-eau marine

Trois mollusques (M) : dreissine, fausse moule brune, moule bleue / Deux crustacés (C) : gammarus, crevette / Deux poissons (P) : épinoche, flét

Cellules d'intérêt : Hémocytes (H) / Spermatozoïdes (S) & Erythrocytes (E)

RDV Journée de restitution – Rouen – 29/11/2022

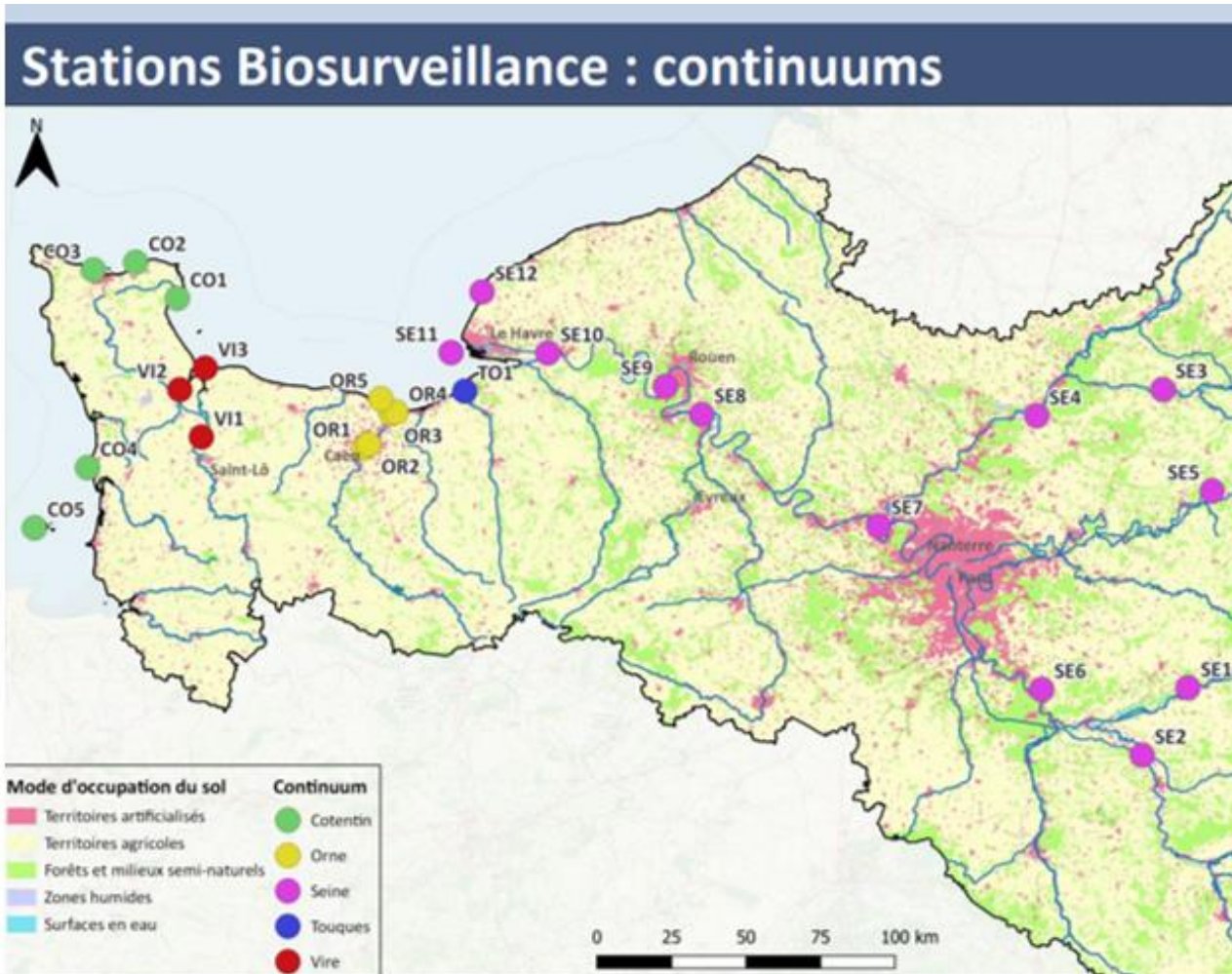
II. Diagnostic du risque écotoxique en Seine (en cours)

Suivi des variations spatiales et temporelles des biomarqueurs de génotoxicité et d'immunotoxicité (phagocytose) en vue de proposer un indice Hémocytes

Encadrement : 3 semaines (automne)
 5 sites sentinelles (2 amont/3 aval)
 1 campagne/an pendant 4 ans

Génotoxicité avérée pour les sites en aval

Replacer et comparer la réponse des biomarqueurs de génotoxicité chez les différentes espèces sentinelles le long d'un continuum eau douce - eau de transition – eau marine (prés. M. Bonneville-Normand)

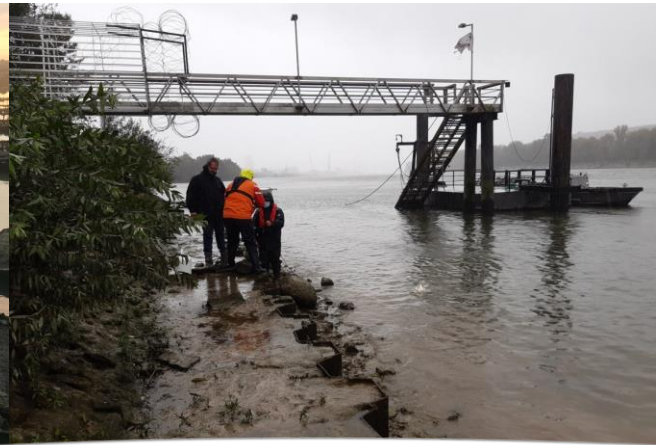


Deux années de suivi

26 stations continentales et 8 marines

Temps de transplantation	Modèle biologique
7 jours	
15 jours	
21 jours	

Merci pour votre attention



Portage & coordination

Financement

Labélisation

Consortium scientifique

