

# 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, Garnero 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



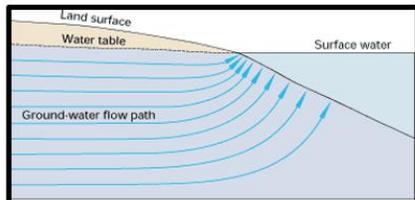
Labélisation



Consortium scientifique



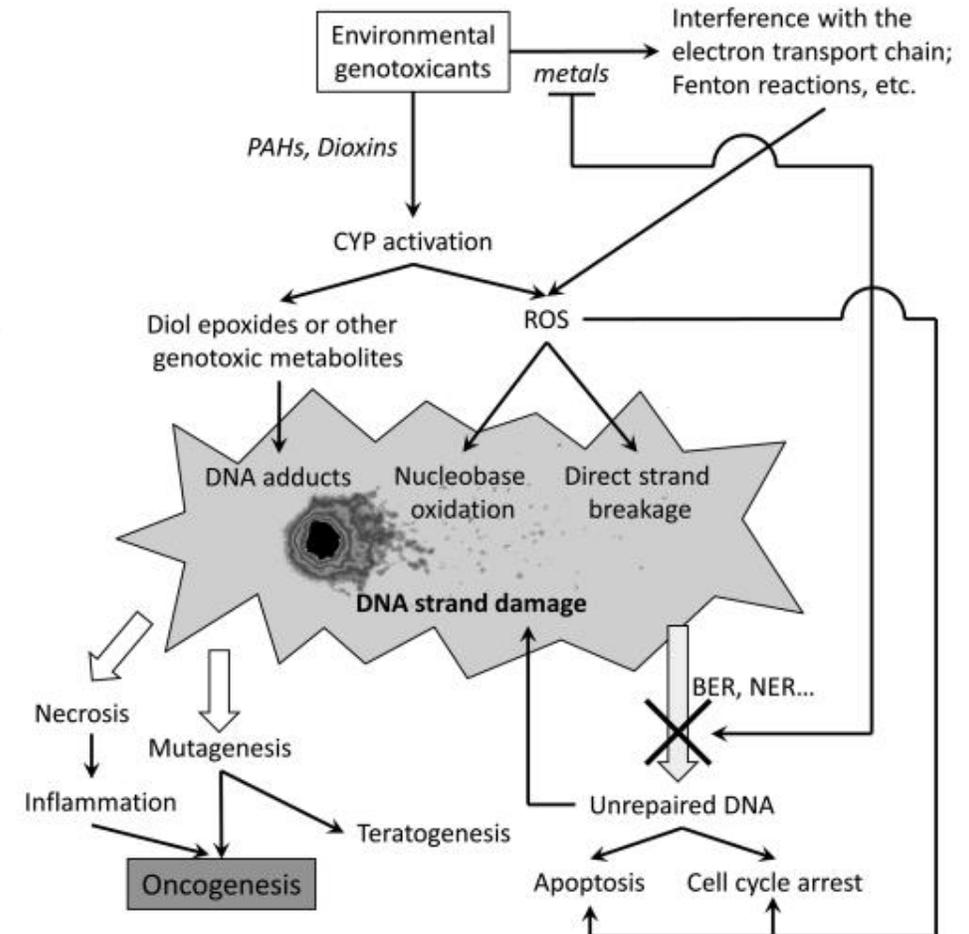
- Génotoxicité environnementale : **Un tiers des contaminants** rejetés dans les compartiments aquatiques ont des **propriétés génotoxiques** (par action directe ou indirecte) (Claxton et al., 1998)
- Substances prioritaires (DCE) : 1/3 cancérigènes dont 2/3 génotoxiques



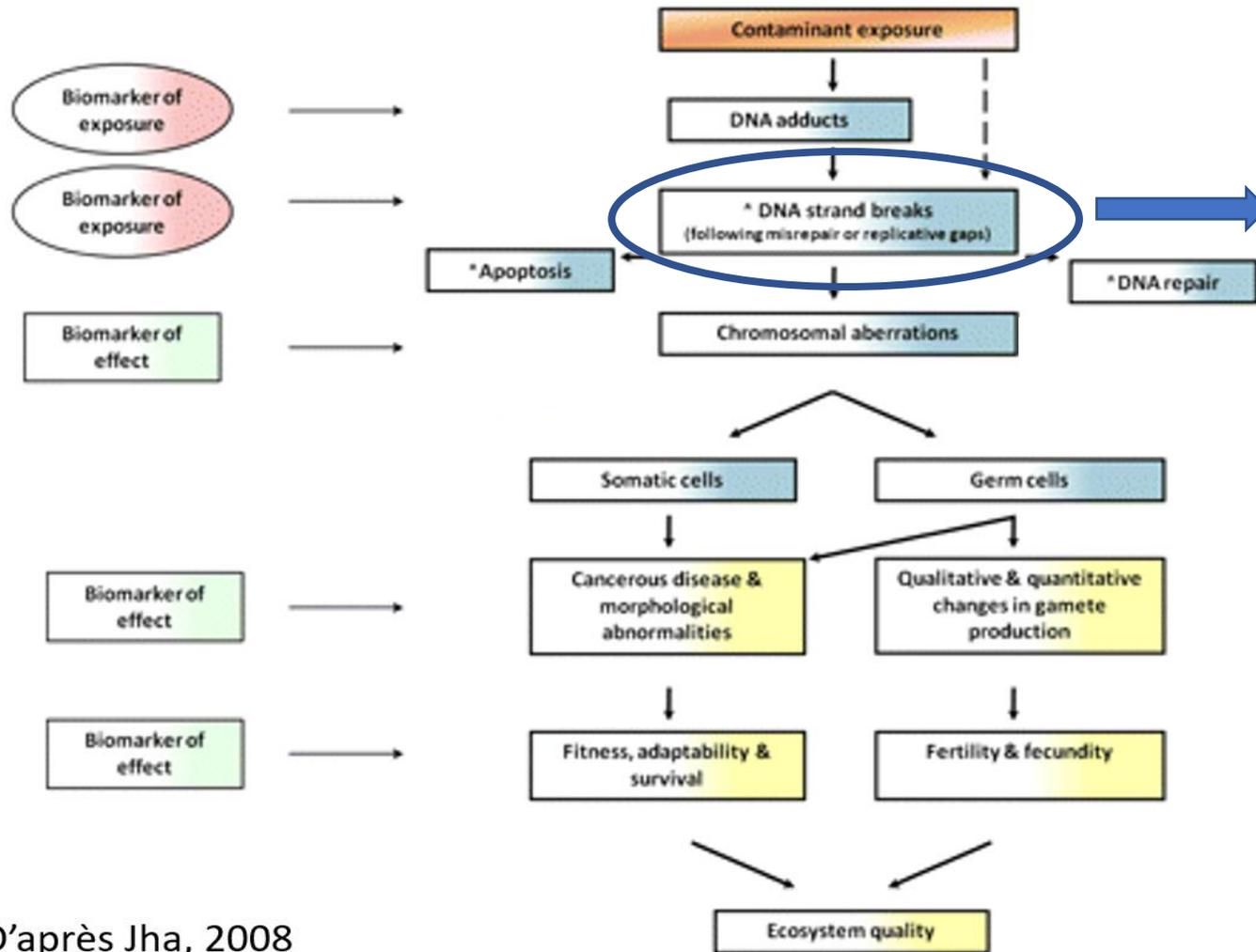
SOURCES

Dilution, Decay, Sorption, 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)

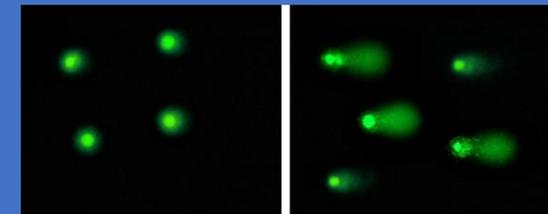
Mise en évidence d'une diversité de dommages :

cassures de brins (+ sites alcali-labiles)

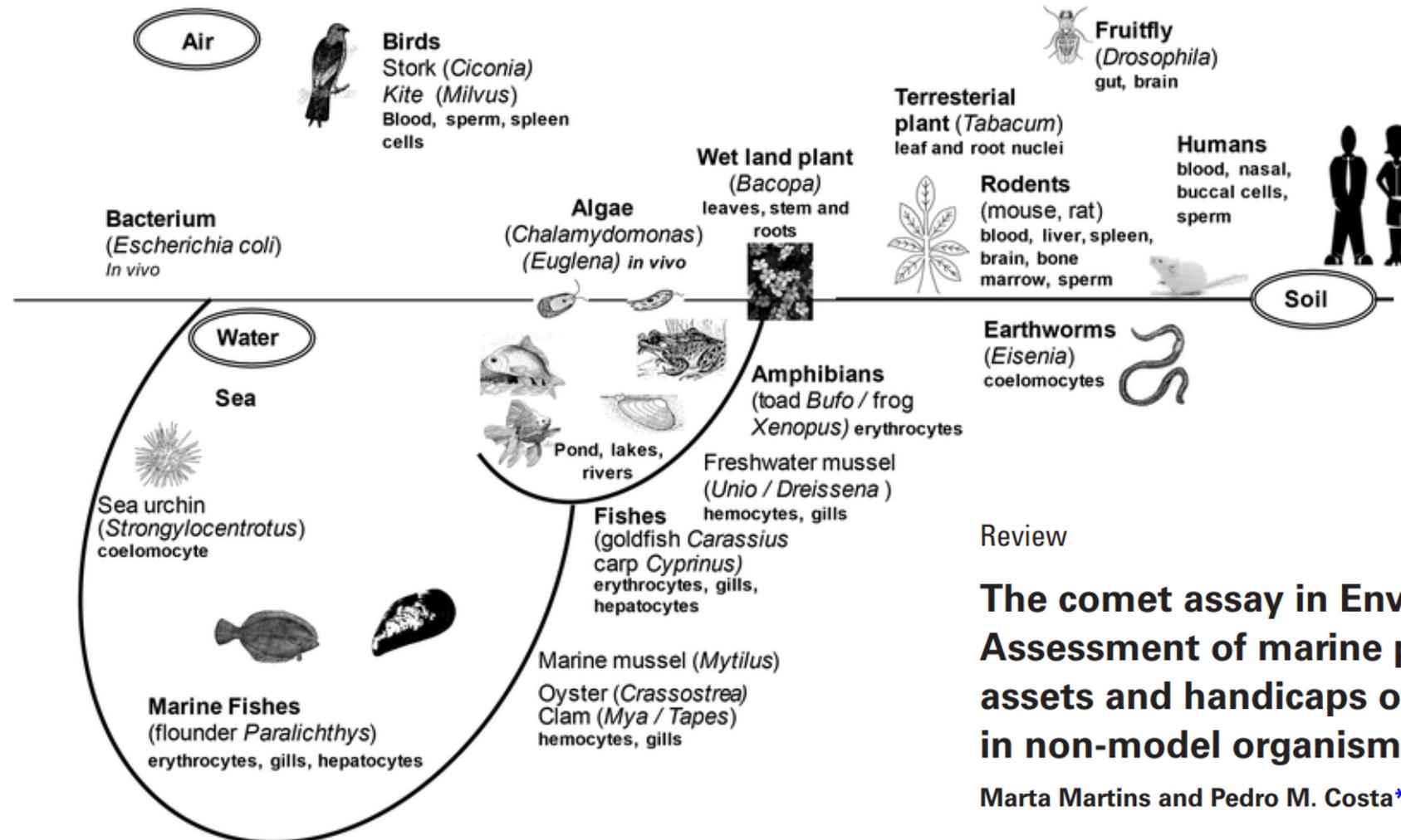
Sensibilité de l'essai

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

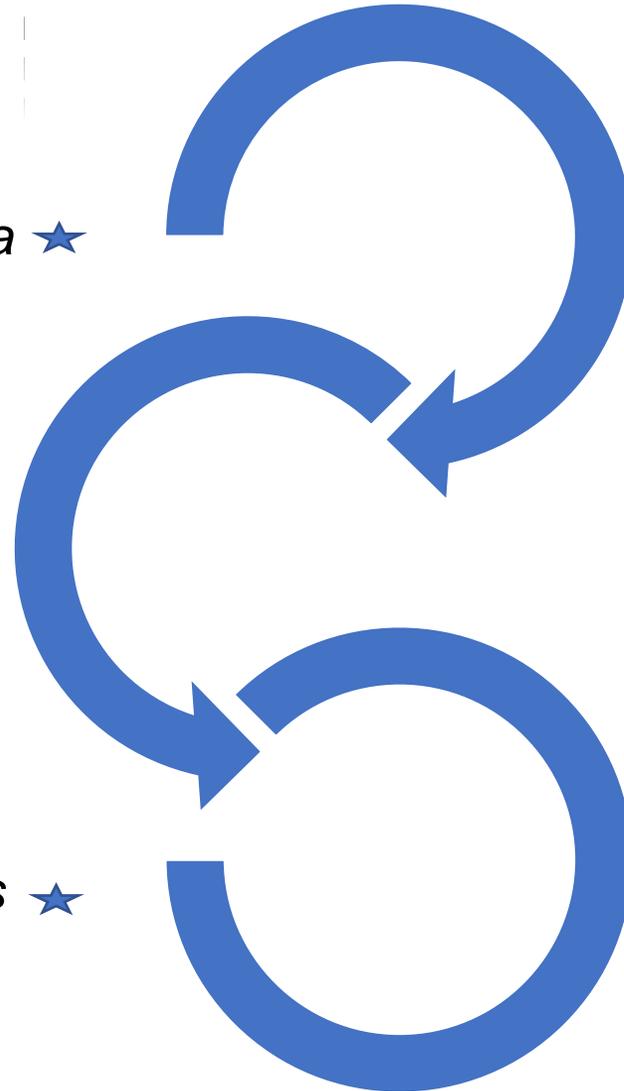
Poissons



*Gasterosteus aculeatus* ★  
L'épinoche à 3 épines



*Platichthys flesus*  
Le flet



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

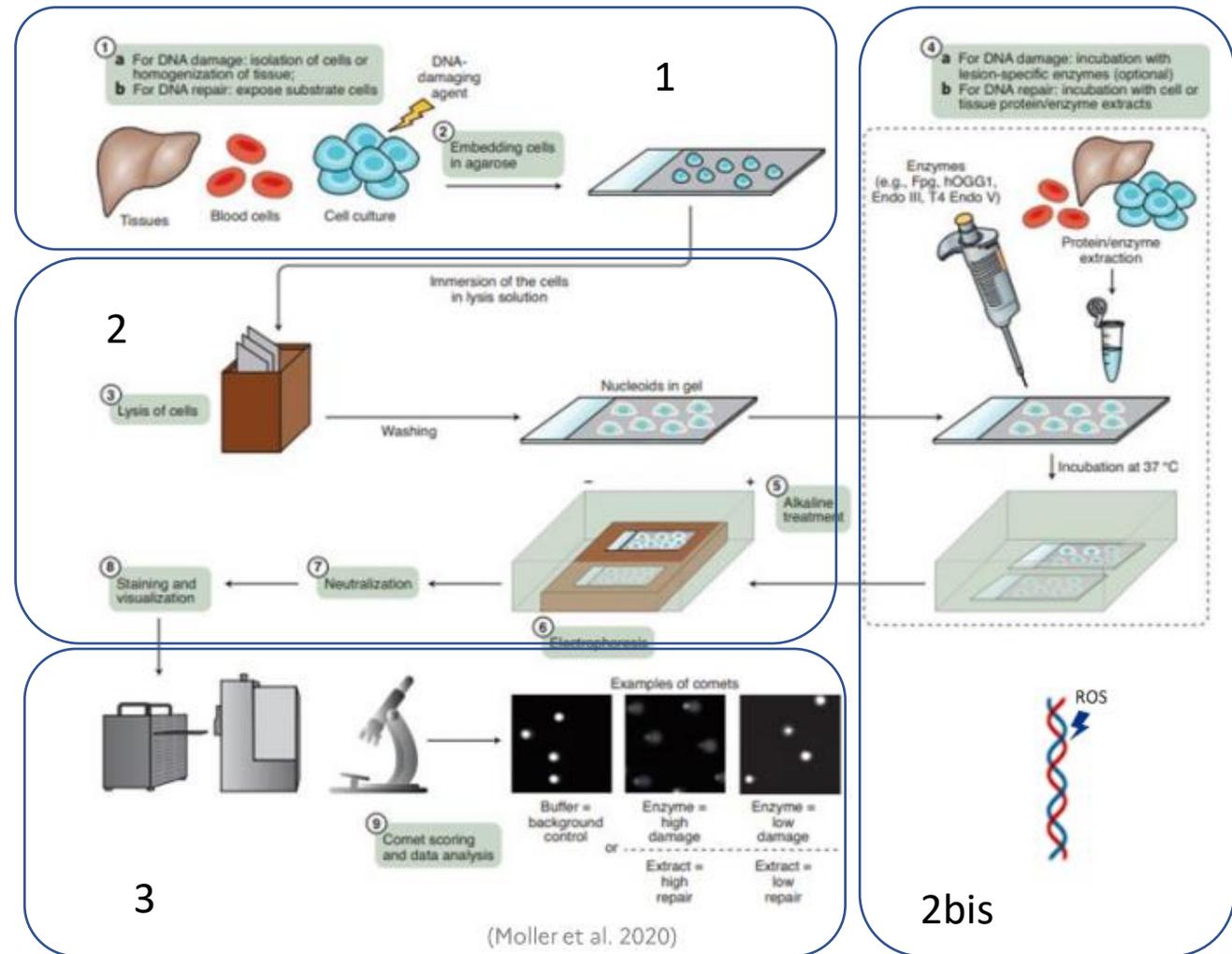
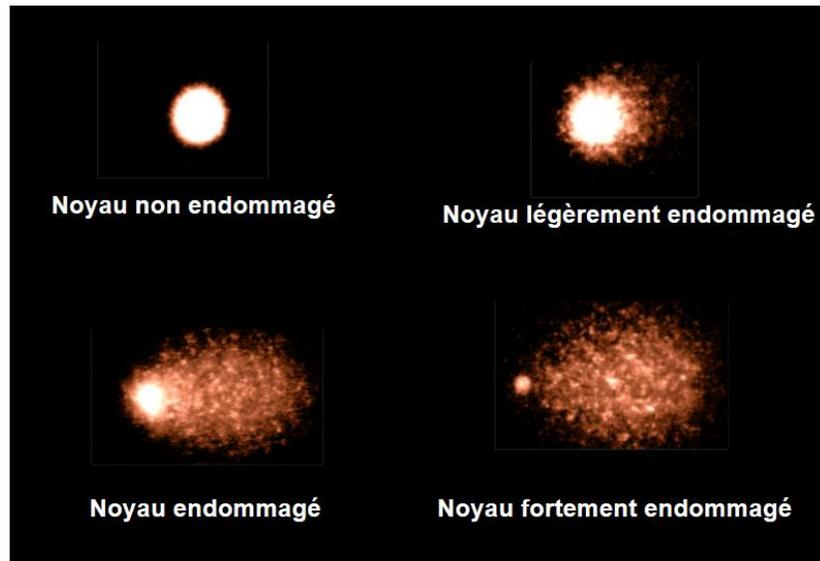
2. **Harmonisation de la mesure** des cassures de brins de l'ADN  
=> Variabilité intra-inter-laboratoires

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

4. Evaluation de la **génétoxicité 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

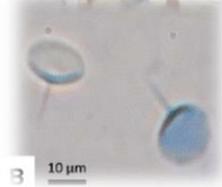
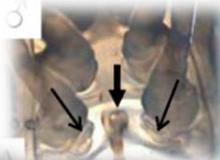
Crustacés



*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**

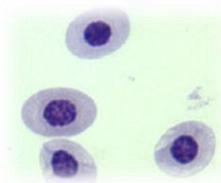
Poissons



*Gasterosteus aculeatus*  
L'épinoche à 3 épines



*Platichthys flesus*  
Le flet



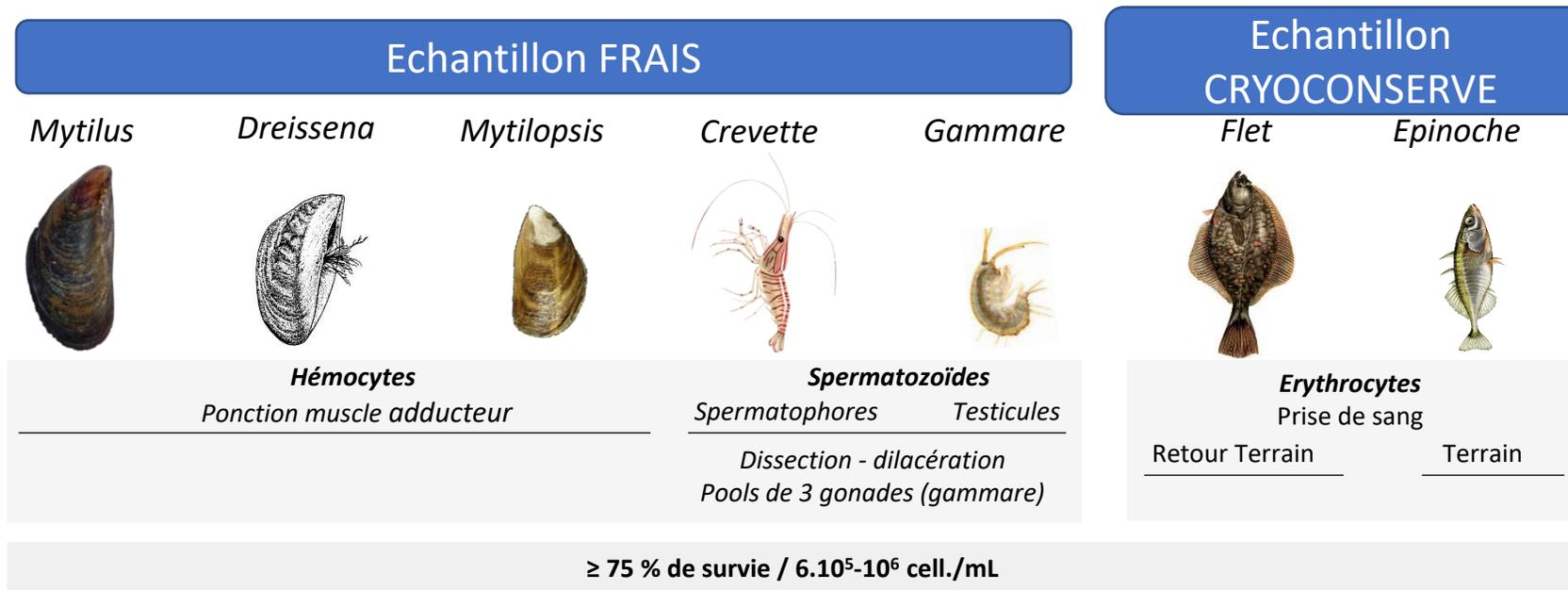
## Erythrocytes

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 le lendemain du prélèvement**  
après stabulation (max 24h) dans eau  
du terrain

**Analyse différée**

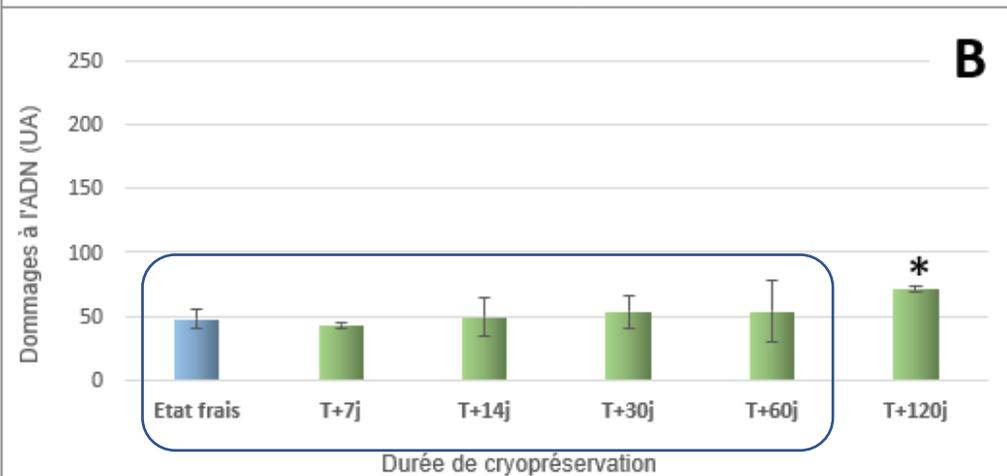
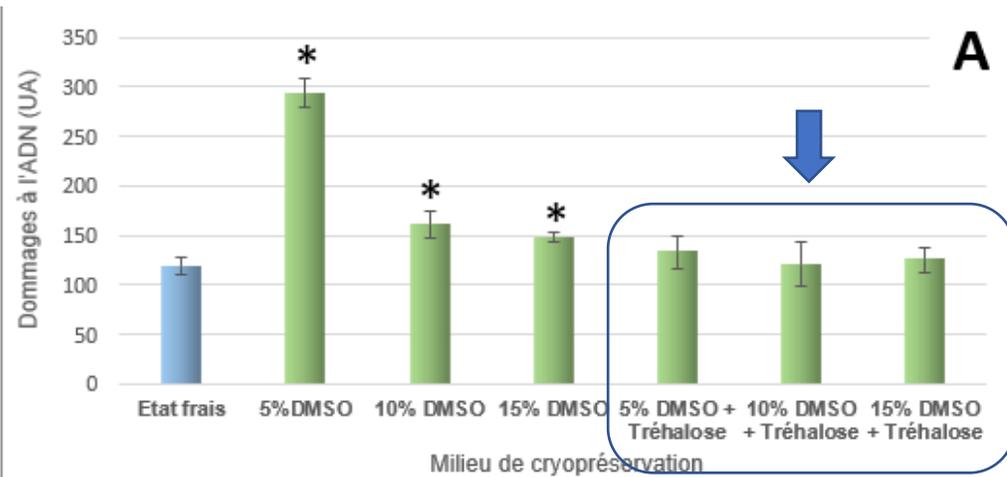
**Optimum  
Survie &  
concentration  
cellulaire  
à respecter**

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

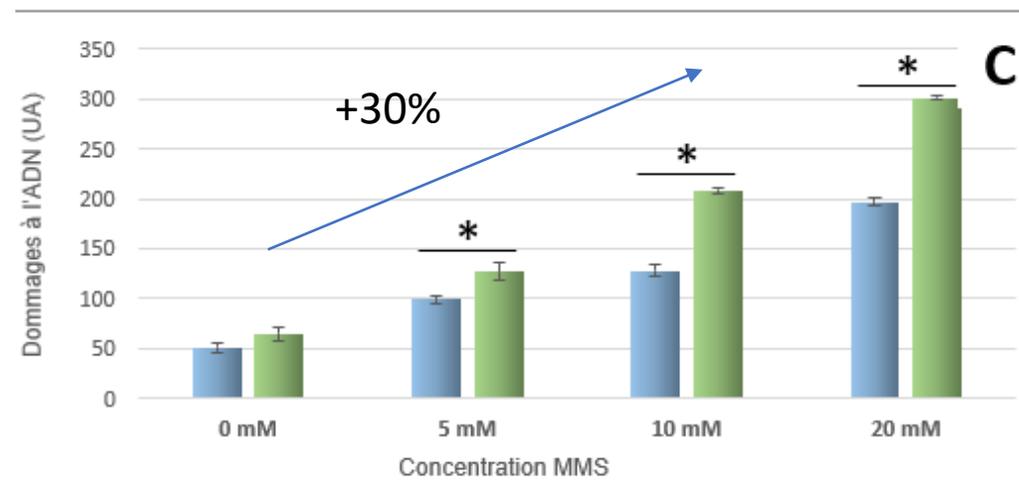
## Cryopréservation testée sur les modèles cellulaires (Bivalves, Crustacés)

⇒ 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 Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10

1 h

18 h

1 h

Dénaturation

300 mM NaOH, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 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*

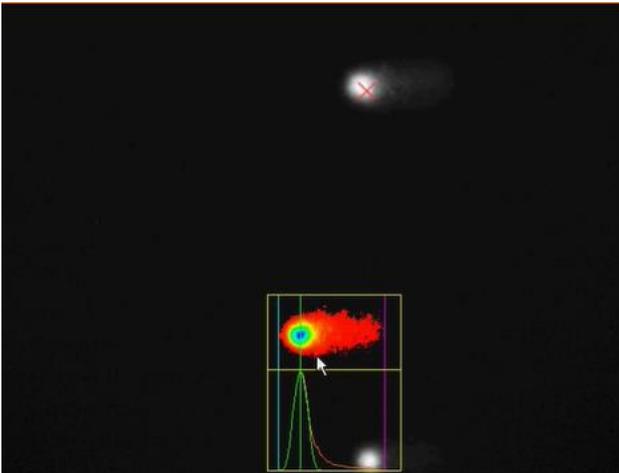
### *Par organisme*

*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 <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	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 <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	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

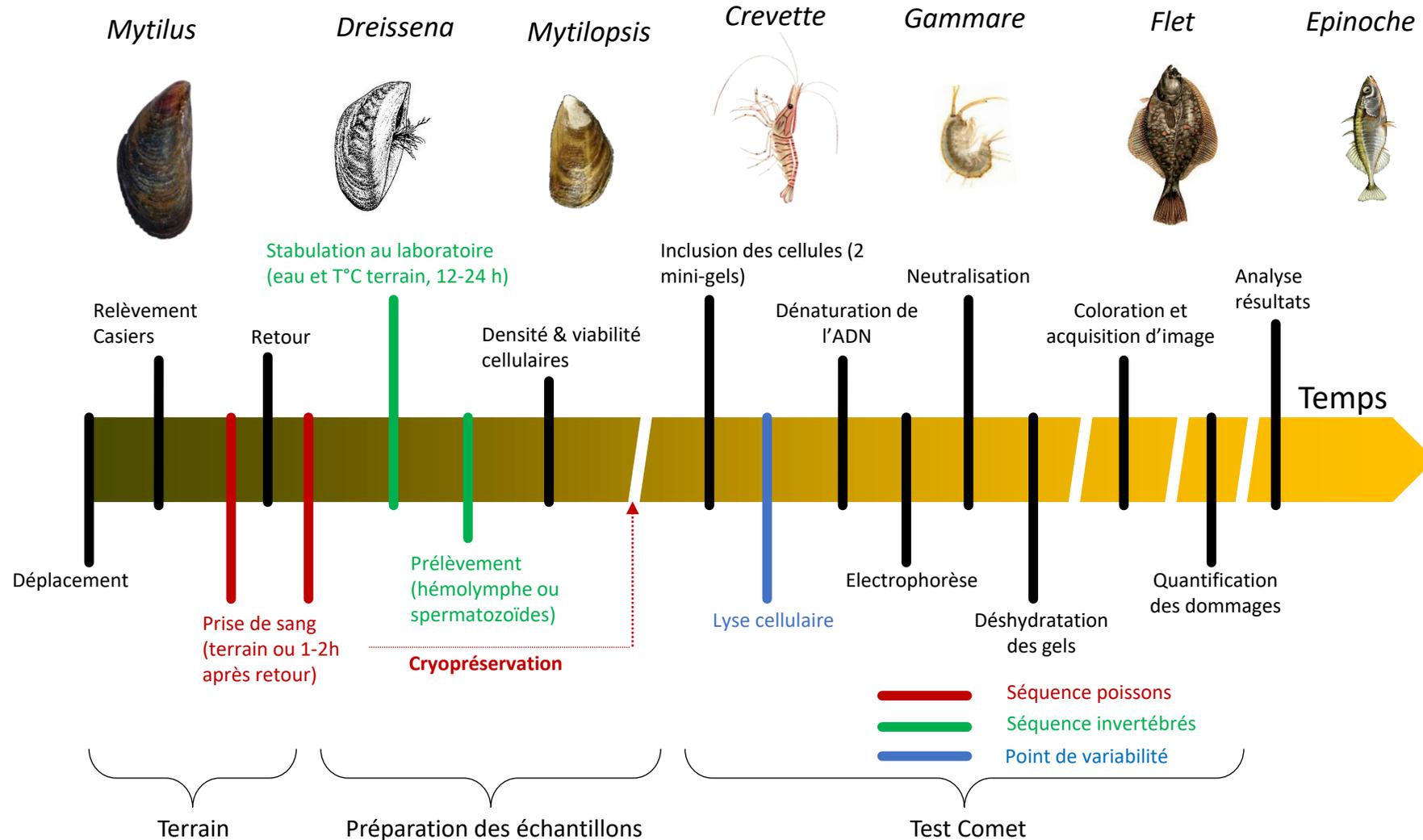


**Comet Assay IV**  
live video measurement system  
for the comet assay

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

➔ Stratégie Sashimi/Biosurveillance  
**Analyse centralisée des données comètes**

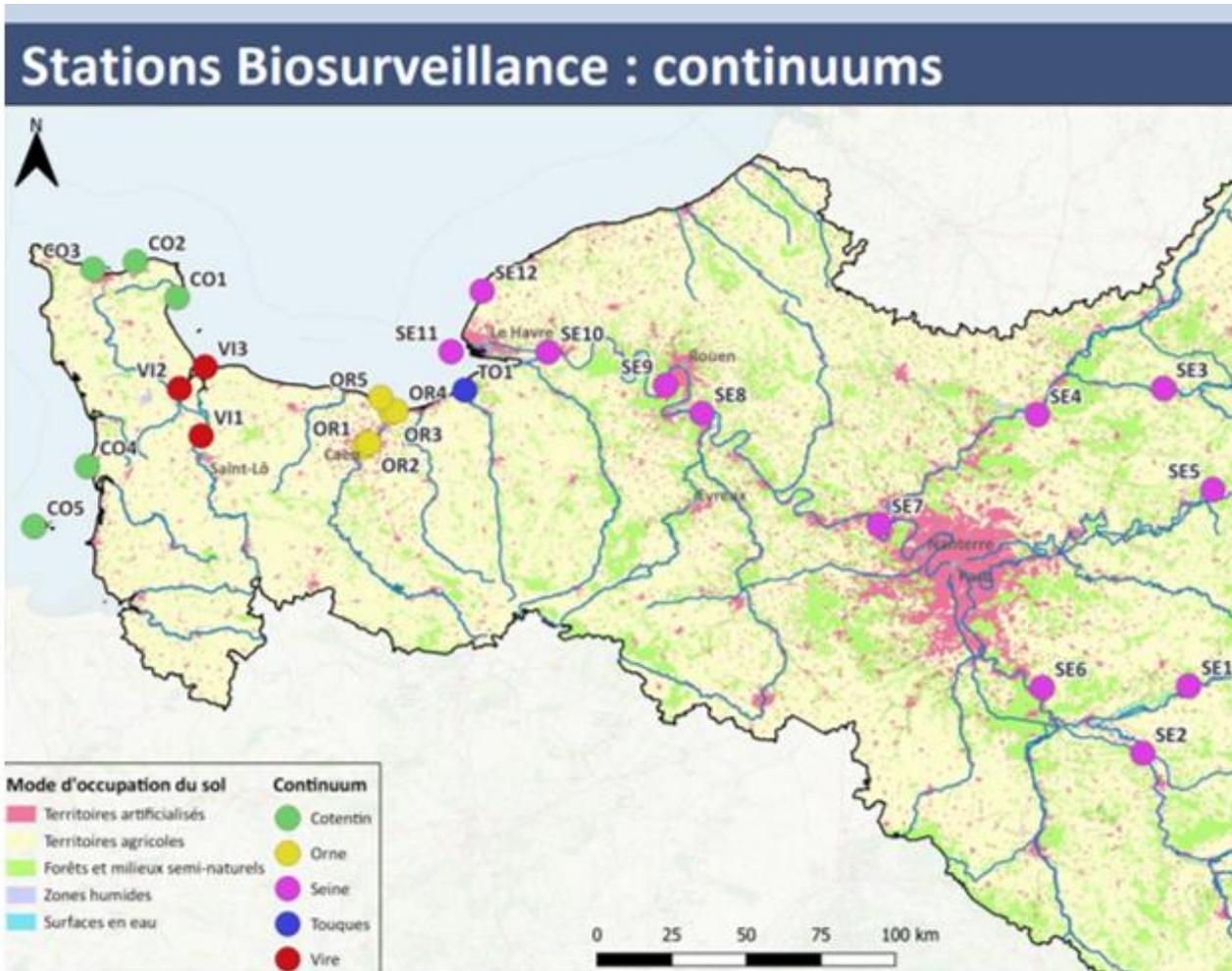
➔ **Perspectives : Référentiel commun inter-laboratoires**  
(matériel, contrôles méthodologiques, ...)



➔ **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**



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)

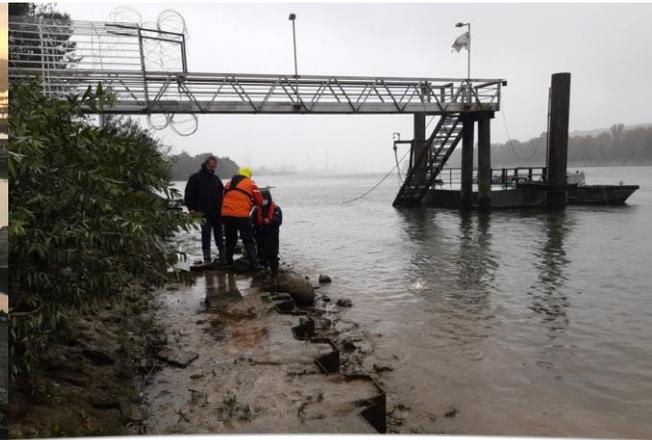


Deux années de suivi

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