

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Sâad Dahlab, Blida 1**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**



**Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de Master

**Filière : Sciences Biologiques**

**Option : Génétique**

**Mise au point des méthodes d'études de la  
génétoxicité des xénobiotiques**

**Réalisée par**

**MAZOUZ Asma**

Devant le jury composé de

ZETRA.Y	MCB	Université Blida 1	Présidente
BOUKHATEM.N	MCA	Université Blida 1	Examinateur
CHADER H.	Professeur	LNCPP	Promoteur
AMOKRANE A.	MAA	Université Blida 1	Co-promotrice

**Promotion 2019/2020**

## *Dédicace*

*Je dédie, tout d'abord ce modeste travail de recherche à ma famille.*

*A la mémoire de mon oncle et mes grands-parents paternels et maternels, que DIEU garde leurs âmes dans son vaste paradis.*

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*Frère et sœur, leurs encouragements permanents, leur appui, et leur soutien moral.  
A tous mes proches.*

*A tous mes ami(e)s.*

*Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infailible.*

*Merci d'être toujours là pour moi.*

## *Remerciements*

La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui je voudrais témoigner toute ma gratitude.

Je voudrais en premier temps remercier, mon promoteur M.CHADER professeur en pharmacologie à l'université d'Alger, pour sa patience, surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion, et qui m'ont trop aidé à réaliser mon travail.

J'exprime mes profonds remerciements à mes directrices de thèse, car ce mémoire n'aurait pas pu avoir lieu sans un encadrement de grande qualité, celui de mes deux co-promotrices Madame ZERMANE Professeur à l'Université de Blida 1 et Madame AMOKRANE MAA à l'Université de Blida 1 pour l'aide qu'elles m'ont apporté, pour leur patience et leur encouragement. Leur œil critique m'a été très précieux pour structurer le travail et pour améliorer la qualité des différentes sections et à succéder à terminer mon mémoire. Je veux vraiment vous remercier car j'ai eu beaucoup de chance de vous avoir comme directrices de thèse.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent aussi aux membres du jury, Mme ZETRA et M BOUKHATEM pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre travail et pour avoir accepté de l'examiner et de l'enrichir avec leurs connaissances.

Enfin, j'adresse de spéciaux remerciements à l'ensemble des enseignants de département de Biologie et Physiologie Cellulaire qui nous ont suivis et formés tout au long de notre cursus universitaire.



## Résumé

Les événements toxiques existent sous différentes formes, parmi lesquelles, les produits chimiques comme les xénobiotiques génotoxique qui sont quotidiennement présents dans notre vie, en particulier sous forme de médicaments qui possèdent un coté nocif affectant nos cellules plus profondément au niveau moléculaire, provoquant des lésions et des dommages de l'ADN, en causant des mutations et des aberrations chromosomiques qui peuvent se développer pour donner différentes formes de cancers et des maladies plus graves. Pour mieux comprendre les effets et les mécanismes d'action des xénobiotiques, il faut les étudier, en commençant par la molécule mère ou produit actif.

Dans cette mesure, différents tests sur des animaux, sur des cellules humaines ou bien sur des cultures cellulaires ont été développés in vitro et in vivo, parmi eux on trouve le test de micronoyau et de comète, se sont les plus utilisés dans le domaine de la génotoxicité et la détermination de cette dernière. Tout ces tests ont permis d'évaluer chaque molécule toxique. Ces résultats ont été compatibles avec le degré des dommages causés par l'agent chimique.

Mots clés : génotoxicité ; xénobiotique ; test de comète ; test de micronoyau ; test in vivo ; cellules hématopoïétiques des souris ; culture cellulaire in vitro.

## Abstract

Toxic events are present in different forms including chemicals / agents like genotoxic xenobiotics which are common in our daily life especially in the form of drugs and medicine, which have a harmful side that affect our cells more deeply, at the molecular level, which is our DNA, by causing lesions and damage, mutations and chromosomal aberrations that can develop into different forms of cancer and into more serious and dangerous diseases.

To understand better and more the effects and mechanisms of actions of these xenobiotics, studies were done, starting with the source molecule or active agent.

For this purpose, different tests on animals, human cells and cell cultures have been developed in vitro and in vivo, among them we find the micronucleus and comet test, they are the most used in the field of genotoxicity and the their determination. This helped to evaluate each toxic molecule. These results were consistent and coherent with the degree of damage studied of the chemical agent.

Keywords: genotoxicity; xenobiotic; Damaged DNA; the comet assay; micronucleus assay; cell culture in vitro; mice hematopoietic cells; in vivo assay.

## المخلص

العوامل المضرة المتواجدة في المحيط وفي حياة الانسان اليومية كثيرة ومختلفة مثل مادة عامل- كمياني المتمثل في الاكسينوبيوتيك , ذات الخاصية السامة للجينات, نستعملها خاصة على شكل ادوية التي تملك جانب مضر الذي يؤثر على الخلايا الحية, وبشكل اعمق على المستوى الجزيئي المتمثل في الحمض النووي, التي تسبب ضرره وتلفه وتشكيل طفرات جينية وتغيرات كروموزومية, التي يمكن ان تتطور لتعطي اشكال مختلفة للسرطان وامراض اكثر خطورة . لاجل فهم تأثيرها واليات المواد الكيميائية يجب علينا دراستها بدا بالمادة الاولية .

على هذا المنوال اجريت عدة فحوصات على الحيوانات وعلى الخلايا البشرية, وتقنيات استنبات الخلايا التي تم وضعها بصفتين فحوصات في المختبر وفحوصات على الجسم الحي من بينها نجد اختبار النواة الدقيقة والمذنب , وهما الأكثر استخدامًا في مجال السمية الجينية. ساعدت كل هذه الاختبارات في تقييم وفهم عمل الجزيئ المضر.

هذه النتائج كانت متوافقة مع حجم الضرر الناتج عن العوامل الكيميائية .

كلمات مفتاحية العوامل السامة للجينات, الكسينوبيوتيك , الحمض النووي المتضرر, فحص كوميت , فحص النواة الصغيرة استنبات الخلايا في المختبر, الخلايا الام المكونة للفئران, فحوصات في الجسم الحي الحمض النووي .

## Liste des Abréviations

<b>ADN</b>	Acide DésoxyriboNucléique
<b>NAD</b>	Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>NQO</b>	quinone oxydoréductases
<b>TPS</b>	glutathion S-transférases
<b>ADH</b>	Antidiuretic hormone
<b>ALDH</b>	Aldéhyde déshydrogénase
<b>GSTT1</b>	Glutathione S-transferase theta-1 enzyme
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>DM</b>	double minute
<b>PCE</b>	Polychromatic erythrocyte
<b>MN PCE</b>	Micronucleated polychromatic erythrocyte
<b>MN</b>	micronoyau
<b>RT</b>	la thérapie radiologique, radiothérapie
<b>FPG</b>	Formamidopyrimidine-ADN-glycosylase
<b>8-oxo-dGuo</b>	7,8-dihydro-8- oxo-2'-désoxyguanosine
<b>hOGG1</b>	8-oxoguanine DNA glycosylase
<b>MMT</b>	mutagenicity mini test
<b>MLA</b>	mouse lymphoma assay
<b>TK</b>	thymidine kinase
<b>TMP</b>	thymidine monophosphate
<b>TFT</b>	trifluorothymidine
<b>LC</b>	large colony
<b>SC</b>	small colony
<b>2-AAF</b>	2-acetylaminofluorène
<b>HAQ</b>	1,4-bis { 2 - [(2-hydroxyéthyl) amino] éthylamino } -9,10-anthracènedione
<b>DHAQ</b>	1,4-dihydroxy-5,8-bis { 2 - [(2-hydroxyéthyle) ) amino] éthylamino } 9,10-anthracènedione
<b>MI</b>	mitotic index



<b>SCE</b>	sister chromatid exchange
<b>DHAQ diacétate</b>	1,4-dihydroxy5,8-bis {2 - [(2-hydroxyéthyl) amino] éthylamino] -9,10-anthracènedione diacétate
<b>Ara-C</b>	1-β-D-arabinofuranosyl cytosine
<b>MTX</b>	méthotrexate
<b>BMMN</b>	bone marrow micronucleus assay
<b>MPE</b>	micronucleated polychromatic erythrocyte
<b>P.O</b>	Per os oral adiministration
<b>IP</b>	intrapéritonéale
<b>MO</b>	moelle osseuse
<b>NCE</b>	Normochromatique érythrocyte
<b>AV</b>	adénovirus
<b>AAV</b>	virus adéno-associé
<b>γ-RV</b>	γ- rétrovirus
<b>LV</b>	lentivirus
<b>LTR</b>	Long terminal repeat
<b>UTR</b>	Untranslated region
<b>SHE transformation</b>	transformation morphologique de cellules d'embryons de hamster syrien
<b>UDS</b>	synthèse d'ADN non programmée
<b>SB</b>	rupture de brin d'ADN
<b>dFdC</b>	gemcitabine 2',2'-difluorodeoxycytidine
<b>CDDP</b>	cis-diammine-dichloroplatinum
<b>PI</b>	replicative index
<b>GUS</b>	B-glucoronidase
<b>PEG-GO</b>	polyéthylène glycol-glucose oxidase
<b>GO</b>	glucose oxydase
<b>H2O2</b>	peroxyde d'hydrogène
<b>BSO</b>	buthionine sulphoximine
<b>CHO</b>	Chinese hamster ovary cells

<b>CHL</b>	Chinese Hamster Lung cells
<b>V79</b>	Chinese hamster lung cells stain V79
<b>L5178Y</b>	cells derived from mouse lymphoma DBA/2 cells.
<b>MCF7</b>	Michigan Cancer Foundation - 7
<b>TK6</b>	Human lymphoblast thymidine kinase heterozygote cell line
<b>Tkb1</b>	Competent Cells are derived from the BL21 strain.
<b>GSH</b>	forme réduite du glutathion
<b>ATP</b>	Adénosine-Triphosphate
<b>PH</b>	potentiel Hydrogène
<b>Hprt</b>	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransférase
<b>Pt-ADN</b>	adduits d'acide DésoxyriboNucléique
<b>ARNm</b>	acide ribonucléique messenger
<b>SIN</b>	self inactivating
<b>CRISPR-Cas9</b>	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- CRISPR associated
<b>MDR1</b>	Multi Drug Resistance gene 1
<b>ADNc</b>	Acide désoxyribonucléique complémentaire
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>GM-CFU</b>	granulocytic–monocytic colony forming units
<b>FBS</b>	Sérum foetal bovin
<b>HBSS</b>	Hank's Balanced Salt Solution



## Listes des figures

<b>Figure 1 :</b> Un schéma présentant les risque génotoxiques.....	2
<b>Figure 2 :</b> Une représentation simple de la formation de micronoyaux dans les érythrocytes de la moelle osseus.....	9
<b>Figure 3 :</b> Schéma représentant le test de micronoyau in vivo et le test de comète pour l'étude de cancérogénicité.....	13
<b>Figure 4 :</b> Illustration d'un test de comète.....	13
<b>Figure 5 :</b> Un schéma présentatif de MN test sur les cellules de la moelle osseuses des souris.....	32
<b>Figure 6 :</b> Présentation du test micronoyau dans les érythrocytes de la moelle osseuse de souris.....	33
<b>Figure 7 :</b> Frottis de moelle osseuse de souris pour l'analyse du micronoyau coloré avec Mai – Grunwald et Giemsa (1000: grossissement). NCE Normochromatique érythrocyte, PCE érythrocyte polychromatique.....	37
<b>Figure 8 :</b> Frottis de moelle osseuse de souris pour l'analyse du micronoyau coloré avec Mai – Grunwald et Giemsa (1000: grossissement). MNPCE micronucléé érythrocyte polychromatique.....	38
<b>Figure 9 :</b> Détermination de l'effet de la voie d'administration sur la formation de micronoyaux induite par l'étoposide.....	39
<b>Figure 10 :</b> la fréquence des MPE dans la moelle osseuse des souris 24 h après le traitement....	39
<b>Figure 11 :</b> La fréquence des MPE dans la moelle osseuse des souris 24 h après l'administration p.o de la dose finale d'étoposide.....	40
<b>Figure 12 :</b> La fréquence des MPE dans la moelle osseuse des souris traitées avec les doses indiquées d'étoposide .....	41
<b>Figure 13 :</b> Clastogénicité induite chez les cellules humaines MDR-1 et des cellules de souris simulées transduites après traitement et exposition à l'étoposide.....	42
<b>Figure 14 :</b> (a) PCR du chromosome Y de colonies isolées de GM-CFU obtenues à partir de moelle osseuse fémorale; + : contrôle positif. (b) PCR MDR-1 d'extraits de tampon K de colonies isolées de GM-CFU obtenues à partir de moelle osseuse fémorale; + : contrôle positif.....	42
<b>Figure 15 :</b> présentation des résultats des 2 méthodes alcaline et neutre.....	43

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : les enzymes principaux dans le métabolisme des xénobiotiques.....	5
<b>Tableau 2</b> : Exemples d'applications du test du micronoyau par bloc de cytokinèse pour détecter et étudier des maladies génétiques.....	9
<b>Tableau 3</b> : les types de test de micronoyau.....	10
<b>Tableau 4</b> : le matériel non-biologique nécessaire pour la réalisation de test de micronoyau....	27
<b>Tableau 5</b> : le matériel non-biologique nécessaire pour l réalisation de test de comète.....	28
<b>Tableau 6</b> : ration de PCE :NE dans les échantillons des cellules de la moelle osseuse des souris 24h après l'administration des doses indiquées d'étoposide.....	40

# Sommaire

Introduction.....	1
<b>Chapitre I : Synthèse bibliographique</b>	
I.1. Définition de la génotoxicité.....	2
I.2. Notion de base des xénobiotiques.....	3
I.2.1. Définition des xénobiotiques.....	3
I.2.2. Les caractéristiques des xénobiotiques.....	3
I.2.2.1. Origine des xénobiotiques.....	3
I.2.2.2. Métabolisme des xénobiotiques.....	3
I.2.2.3. Variabilité individuelle.....	5
I.3. Méthodes de détermination de la génotoxicité.....	6
I.3.1. Le test de micronoyau.....	6
I.3.2. Le test de micronoyau érythrocytes de mammifères.....	7
I.3.2.1. Origine possible de micronoyau.....	7
I.3.1.2.1 Fragments chromosomiques acentriques.....	7
I.3.1.2.2 Malségrégation des chromosomes.....	7
I.3.1.2.3 Rupture chromosomique dicentrique.....	7
I.3.1.2.4 Instabilité chromosomique.....	8
I.3.1.2.5 Agrégation de doubles minutes (DM).....	8
I.3.3. Test des comètes.....	11
I.3.4 Le test de mutation bactérienne inverse = test d'Ames.....	14
I.3.5. Test d'aberration chromosomique.....	15
I.3.5.1 Les types d'aberrations chromosomiques.....	15
I.3.6. Test de lymphome de souris (MLA).....	15
I.4. synthèse des travaux réalisés dans le domaine de la génotoxicité.....	16
I.4.1. Transformation cellulaire in vitro avec un carcinogène chimique.....	16
I.4.2. Classification génotoxique des médicaments anticancéreux.....	17
I.4.3. Prolifération cellulaire dans la carcinogénèse.....	17
I.4.4. Étude comparative de structure-génotoxicité de trois médicaments à base d'aminanthraquinone et de doxorubicine.....	18
I.4.5. Un test de signal pour la détection de composés génotoxiques: application sur les urines de patients cancéreux en chimiothérapie et d'infirmières manipulant des médicaments cytotoxiques.....	19
I.4.6. Génotoxicité des déchets et effluents industriels.....	20

I.4.7. Thérapie oxydative: l'utilisation d'un système enzymatique génératif d'espèces réactives d'oxygènes pour le traitement des tumeurs.....	21
I.4.8. la cytotoxicité et aberrations chromosomiques in vitro: l'expérience de l'industrie et les arguments en faveur d'une limite supérieure de toxicité dans le test d'aberration.....	22
I.4.9. génotoxicité et cytotoxicité des médicaments anticancéreux Gemcitabine et Cisplatine, séparément et en association: études in vivo.....	22
I.4.10. Un système végétal transgénique sensible pour détecter les composés inorganiques toxiques dans l'environnement.....	23
I.4.11. Prédiction in silico de la génotoxicité.....	24
I.4.12. Vecteurs viraux: la voie de la réduction de la génotoxicité.....	25

## **Chapitre II : Matériel et méthodes**

II.1. Matériel.....	27
II.1.1 Matériel biologique.....	27
II.1.2. Matériel non biologique.....	27
II.2 Méthodes.....	29
II.2.1 Le test de micronoyau.....	29
II.2.1.1. Les conditions de logement et d'alimentation des animaux.....	29
II.2.1.2 Répartition des groupes et numérotation.....	29
II.2.1.3. Sélection de solvant (véhicule) et préparation d'échantillon de test.....	29
II.2.1.4. Le volume d'échantillon et le mode d'administration.....	29
II.2.1.5. Durée de traitement et le temps d'échantillonnage.....	30
II.2.1.6. Collection et traitement de la moelle.....	30
II.2.1.7. préparation et fixation des lames.....	31
II.2.1.8. Coloration au Giemsa-mai-Grunwald (MGG).....	31
II.2.1.9. Notation des lames et analyse des images.....	32
II.2.1.10. Une analyse statistique.....	32
II.2.2. le test de comète.....	33
II.2.2.1. Préparation d'agarose.....	33
II.2.2.2. La pré-préparation des lames.....	33
II.2.2.3. La préparation des échantillons.....	33
II.2.2.4. Lyse et électrophorèse.....	34
II.2.2.4.1. Lyse alcaline et électrophorèse.....	34
II.2.2.4.2. Lyse neutre et électrophorèse.....	35
II.2.2.5. Coloration des lames.....	35
II.2.2.6. Analyse des lames.....	36

## **Chapitre III : Résultats et discussion**

III.1. Résultats.....	37
II.1.1. Résultat de test de micronoyau.....	37
II.1.1.1 : les résultats de test de micronoyau des érythrocytes des souris.....	37
II.1.1.2 : Sensibilité du test du micronoyau de la moelle osseuse à l'étoposide.....	38
III.1.2. Les résultats de test des comètes.....	43
III.1.2.1. Les résultats attendus.....	43
III.Discussion.....	45
III.1. test de comète.....	45

III.2.test de micronoyau.....	45
III.3.test de micronoyau.....	45
Conclusion générale.....	47
Référence bibliographique.....	48
Glossaire	
Annexe	



# Introduction

Le développement de la toxicité prend en compte toutes les manifestations de développement anormales induites par les substances toxiques (xénobiotiques), une infection transmise, un manque de nutriments (par exemple, un manque d'acide folique dans la nutrition pendant la grossesse chez l'homme peut entraîner un spina bifida), et des troubles génétiques (**Seukep et al, 2014**). De nombreux facteurs chimiques, physiques ou biologiques peuvent provoquer la mort cellulaire. Cependant, il existe une classe de facteurs qui ne tuent pas nécessairement les cellules, mais n'endommagent que leur matériel génétique. Ces facteurs sont appelés génotoxines, comprennent à la fois les génotoxines physiques (les différents rayonnements) et les génotoxines chimiques. Bien que de nombreux moyens efficaces de réparation d'ADN ont été découverts, ils ne sont pas suffisants, ce qui pourrait conduire à une fixation des dommages d'ADN, si la cellule endommagée survit et se divise et par la suite transfère les dommages d'ADN aux générations suivantes.

L'être humain est exposé aux différents agents génotoxiques présents dans l'environnement. Les perturbations induites par ces agents au niveau du métabolisme endogène sont une cause potentielle de la toxicité cellulaire, qui peut se manifester sous forme, par exemple, de stress oxydatif. Les événements liés à la toxicité, ont des résultats en commun sur la santé humaine qui sont indésirables et nocifs, en affectant l'homéostasie cellulaire. Pour mieux comprendre mieux, on doit commencer par le cœur de médicaments qui est la molécule mère, le principe actif, La compréhension de leurs mécanismes d'action est cruciale et importante, et suit plusieurs niveaux ; en commençant par l'exposition de l'organisme au médicament, jusqu'au niveau cellulaire et moléculaire.

Par conséquent, des tests et des études sont nécessaires dans le but de déterminer le niveau d'exposition et le risque pour la santé (**Sommer et al, 2020**). Et d'étudier aussi, la génotoxicité et l'évaluation des effets néfastes des xénobiotiques sur les prochaines générations humaines et éventuellement fournir des informations sur la cancérogénicité.

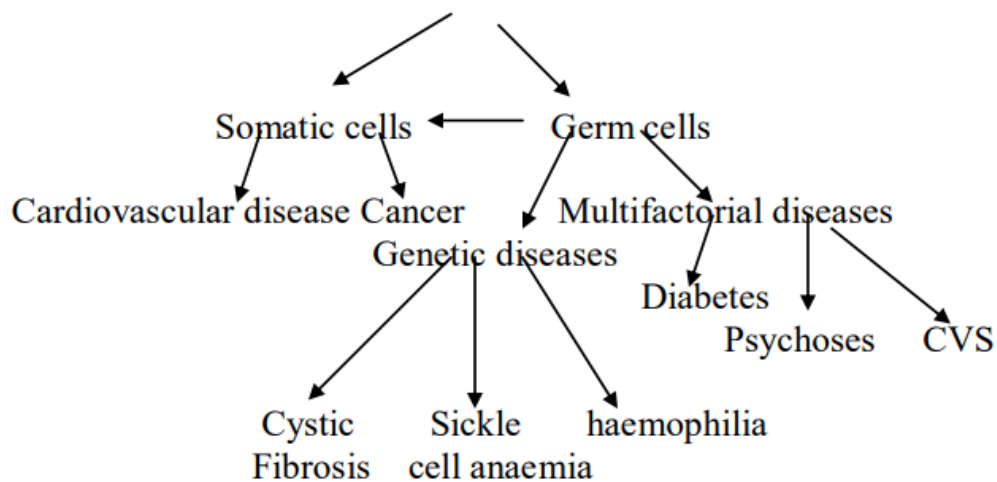
# Chapitre I : Synthèse Bibliographique

## Chapitre I : Synthèse Bibliographique

### I.1. Définition de la génotoxicité :

La génotoxicité est définie comme la capacité des produits chimiques à endommager l'information génétique d'une cellule entraînant des mutations pouvant conduire à des tumeurs malignes. Le plus souvent, la génotoxicité est confondue avec mutagénicité car tous les produits chimiques mutagènes sont génotoxiques; cependant, pas tous les composés génotoxiques sont mutagènes (**Seukep et al, 2014**). Plusieurs études ont été réalisées pour analyser et comprendre l'effet génotoxique sur le matériel génétique en raison de leur importance, car le génome des cellules germinales détermine les caractéristiques héréditaires des organismes et le génome des cellules somatiques fournit les informations de synthèse de la plupart des composants cellulaires, et donc le maintien de l'intégrité cellulaire (**Williams, 1989**).

La génotoxicité est généralement évaluée par une batterie des systèmes, qui combine plusieurs tests qui devraient être compatibles les uns avec les autres pour tirer une seule conclusion (**Horibe et al, 2018**), leur effet cytotoxique est indiqué par des changements significatifs dans les activités fonctionnelles cellulaires (**Liu et al, 2017**) d'une personne saine et peut être détecté directement par cette batterie des tests de cytotoxicité et génotoxicité in vivo et in vitro.



**Figure 1** : Schéma représentant les risques génotoxiques (**Shah, 2012**).

## I.2. Notion de base des xénobiotiques :

### I.2.1. Définition des xénobiotiques :

Un xénobiotique est défini comme composé étranger au système biologique, qui n'est pas utilisé par l'organisme en tant que substance nutritive, et pas essentiel pour le maintien de la fonction physiologique normale et de l'homéostasie, notamment les médicaments, composés bioactifs alimentaires, additifs alimentaires et toxines environnementales (**Spanogiannopoulos et al, 2016; Handbook of Developmental Neurotoxicology, 1998**).

Certains produits chimiques naturels « endobiotiques » deviennent des xénobiotiques lorsqu'ils sont présents dans l'environnement à des concentrations excessives, le « xeno » dans « xénobiotiques » vient du Mot grec « xenos » signifiant inviter, ami ou étranger (**Schwab, 2011**).

### I.2.2. Les caractéristiques des xénobiotiques:

#### I.2.2.1. Origine des xénobiotiques:

Les xénobiotiques sont omniprésents et l'exposition humaine à ces derniers est inévitable, ceci est le cas de certains médicaments (antibiotiques, compléments alimentaires comme les antioxydants ect, ingrédients alimentaires (colorants, stabilisants, émulsifiants, composés salins, conservateurs, etc.). les cosmétiques (maquillage, teintures capillaires, savons, parfums) et les produits ménagers (eau de Javel au chlore, sprays anti-insectes, nettoyeurs), etc...

À l'heure actuelle, il n'est pas possible de catégoriser les xénobiotiques, par exemple en fonction de leur nocivité, et d'éliminer ces derniers du milieu de vie. (**Schwab, 2011**).

#### I.2.2.2. Métabolisme des xénobiotiques :

Le métabolisme, ou en d'autres termes la biotransformation des xénobiotiques est réalisée principalement dans le foie. En effet, les hépatocytes contiennent la majorité des enzymes spécifiques de la biotransformation qui peuvent être divisées en trois catégories : enzymes de phase I « activation », de phase II « conjugaison » et de phase III « transport » (**Tableau 1**).

Les xénobiotiques lipophiles sont d'abord métabolisés par des enzymes de phase I, qui ont pour fonction de rendre les xénobiotiques plus polaires et de fournir des sites pour les réactions de conjugaison.

Les cytochromes P450 « P450s » représentent un acteur majeur dans le domaine de la biotransformation de phase I. P450 et autres enzymes de phase I, comme NAD « P » H: quinone oxydoréductases « NQO », jouent un rôle important généralement dans les réactions d'activation menant à la formation d'intermédiaires réactifs.

Les enzymes de phase II sont des enzymes de conjugaison et peuvent interagir directement avec les xénobiotiques, mais interagissent plus communément avec les métabolites produits par les enzymes de phase I. Beaucoup d'intermédiaires électrophiles se conjuguent efficacement avec des nucléophiles, par exemple le glutathion, dans des réactions catalysées par des enzymes de phase II comme glutathion S-transférases (TPS).

Grâce au transport passif et actif, ces métabolites plus polaires sont éliminés hors de la cellule par des pompes d'efflux contrôlées par une cassette de transporteurs membranaires liés à l'ATP « ABC », par exemple, P-glycoprotéine, les principales voies d'élimination des conjugués hydrophiles sont l'urine, les matières fécales, la sueur ou souffle.

Les xénobiotiques sont souvent très lipophiles et donc peuvent s'accumuler dans les tissus adipeux et rester longtemps dans la circulation sanguine.

Divers facteurs physiologiques, par exemple l'âge, le sexe et l'état nutritionnel (faim), ou des facteurs pathologiques, par exemple, l'hypertension, le diabète, cirrhose du foie, insuffisance rénale, etc,... affectent le métabolisme de manière significative. (Croom, 2012) , (Schwab ,2011)

**Tableau 1:** Les enzymes principales dans le métabolisme des xénobiotiques (Schwab, 2011).

	Protein	EC number	Gene	Reactions
<b>Phase I</b>				
Cytochrome P450 monooxygenases	P450	1.14.14.1	CYP	Oxidation, reduction, peroxidation
Flavin-containing monooxygenases	FMO	1.14.13.8	FMO	Oxidation
Alcohol dehydrogenases	ADH	1.1.1.2	ADH	Alcohol oxidation
Aldehyde dehydrogenases	ALDH	1.2.1.5	ALDH	Aldehyde oxidation
Monoamine oxidase	MAO	1.4.3.4	MAO	Oxidative deamination
NADPH-cytochrome P450 reductase	CPR	1.6.2.4	POR	Reduction
Carbonyl reductases	CR	1.1.1.184	CBR	Reduction
Aldo-keto reductases	ALR	1.1.1.21	AKR	Reduction
NAD(P)H-quinone oxidoreductase	NQO	1.6.5.2	NQO	Quinone reduction
Epoxide hydrolases	EPHX	3.3.2.9	EPHX	Epoxide hydrolysis
Carboxylesterases	CE	3.1.1.2	PON	Hydrolysis of ester-containing xenobiotics
Deaminases	CD	3.5.4.1	CDA	Hydrolytic deamination
<b>Phase II</b>				
Glutathione S-transferases	GST	2.5.1.18	GST	Conjugation with glutathione
UDP-glucuronosyltransferases	UGT	2.4.1.17	UGT	Conjugation with glucuronic acid
N-acetyltransferases	NAT	2.3.1.5	NAT	Acetylation
Sulfotransferases	SULT	2.8.2.3	SULT	Conjugation with sulfate
<b>Phase III</b>				
ATP-binding cassette transporter	MDR	3.6.3.44	ABCB	Xenobiotic transport across cell membranes
	MRP/MOAT	3.6.3.44	ABCC	
	BCRP	3.6.3.44	ABCG	
Lung resistance-related protein	LRP/VAULT1	3.6.3.44	MVP	Nucleocytoplasmic transport

### I.2.2.3. Variabilité individuelle:

Les enzymes du métabolisme des xénobiotiques des trois phases, sont génétiquement variables et contiennent un certain nombre de polymorphisme différents d'un individu à un autre, cette variabilité donne un mécanisme d'action et niveau d'activité différent.

Une modification d'enzyme peut donner comme résultat une enzyme déficiente et/ou une surproduction d'enzyme et sur-activation de celle-ci, impliquant l'excès de xénobiotiques ou bien le contraire. Ainsi, la variabilité génétique peut expliquer pourquoi certains individus sont plus sensibles aux effets toxiques des xénobiotiques que d'autres.

Les fréquences de polymorphismes diffèrent d'une population à l'autre, par exemple le polymorphisme GSTT1 exprimé sous une forme d'enzyme qui est active de 10 à 20% chez des populations caucasiennes mais de 30 à 60% chez des orientaux. Les polymorphismes dans l'alcool déshydrogénase « ADH » et l'aldéhyde déshydrogénase « ALDH » convertissant l'éthanol en acétaldéhyde ont un grand effet nocif et indésirable et sont impliqués dans la carcinogénèse induite par l'acétaldéhyde chez les orientaux.

Les polymorphismes de l'enzyme P450 2D6 sont les plus importants pharmacologiquement et les plus étudiés, car ils sont impliqués dans les différents métabolismes, de faibles, lents

jusqu'à rapides et élevés, dont l'intérêt est d'individualiser et de préciser les médicaments les plus efficaces et avec le moins d'effets indésirables. Cependant, la variabilité interindividuelle complique encore considérablement l'évaluation des interactions médicamenteuses et présente un défi pour la pharmacologie des médicaments. (Schwab, 2011)

### I.3. Méthodes de détermination de la génotoxicité

Actuellement, le nombre de tests de la génotoxicité in vivo et in vitro les plus connus et les plus utilisés sont approximativement de 20 tests (Sommer et al, 2020).

Les tests in vitro sont utilisés (sur des lignées cellulaires) afin d'investiguer, étudier, comprendre le potentiel et l'effet génotoxique des nouveaux médicaments et produits pharmaceutiques et médicales, d'usages quotidiens, facteurs chimiques/physiques, poisons etc... les tests les plus utilisés sont : le test de mutation bactérienne inverse « test d'Ames », tests de modifications du génome par des méthodes cytogénétiques, telles que le test d'échange de chromatides sœurs, l'analyse de fréquence des aberrations chromosomiques, test du micronoyau et test des comètes (Sommer et al, 2020).

Les tests in vivo (sur des animaux), permettent l'investigation et l'étude de l'impact des facteurs environnementaux sur le biote et surtout sur la santé humaine ou les modifications génétiques associés au développement de diverses maladies. Les tests in vivo les plus importants comprennent trois méthodes cytogénétiques, à savoir test de comète, test d'aberration chromosomique et différents types de tests de micronoyaux (Sommer et al, 2020).

#### I.3.1. Le test de micronoyau

Dans les analyses des aberrations chromosomiques pendant l'interphase, le test de micronoyau est le plus noté. C'est un biomarqueur de la génotoxicité qui détecte le micronoyau, il est moins spécifique mais simple, plus facile à réaliser.

Le micronoyau, c'est un petit corps de forme ronde de chromatines, il est généralement formé par des fragments de chromosomes, ou de chromatides/chromosomes entiers. Ce phénomène de formation de micronoyau est dû à l'altération d'ADN, et donc instabilité génomique, mais aussi à partir de processus naturels tel que le vieillissement, les facteurs environnementaux ou de certaines maladies.

Plusieurs facteurs sont à l'origine de formation de micronoyau et sont bien décrit dans la littérature, (Tableau 1) (Sommer et al, 2020).



Dans le noyau il existe plusieurs micronoyaux, et leur détection se fait par coloration de l'ADN et observé sous microscope.

Il y a 4 types de test de micronoyau en se basant sur le type de cellule utilisée et trois principes de test l'un in vitro et l'autre in vivo et ex vivo :

- Le test de micronoyau avec blocage de cytokinèse in vitro.
- Le test de micronoyau des érythrocytes de mammifères in vivo.
- Le Dosages du cytome du micronoyau dans les lymphocytes humains et les cellules buccales ex vivo (**Bolognesi et al, 2019**),
- Le test de micronoyau sur d'autres types de cellules.

### **I.3.1.1. Le test de micronoyau érythrocytes de mammifères**

Le test du micronoyau érythrocytaire est un test in vivo largement utilisé, il s'effectue initialement sur des cellules hématopoïétiques érythrocytaires immatures en division de la moelle osseuse de rongeurs qui se trouve dans le sang périphérique.

Ces érythrocytes immatures sont facilement identifiables par rapport aux cellules matures en raison de la présence de l'ARN dans leur cytoplasme (**Sommer et al, 2020**). Le test est plus fiable, largement utilisé, plus simple pour l'évaluation de la clastogénicité ou de l'aneugénicité des produits chimiques, avec différents modes d'action (**Kumar et al, 2019**).

### **I.3.1.2. Origine possible de micronoyau**

#### **I.3.1.2.1 Fragments chromosomiques acentriques**

Les fragments chromosomiques acentriques résultent de cassures de brins d'ADN non réparés ou mal réparés, cross-links de brins d'ADN ou formation d'adduits d'ADN conduisant à des aberrations de chromosome ou de chromatide, par exemple des chromosomes polycentriques généralement accompagnés de fragments acentriques.

#### **I.3.1.2.2 Mal ségrégation des chromosomes**

Un chromosome entier en retard pendant la mitose ou les aberrations chromosomiques numériques, comme un résultat d'un dysfonctionnement du centromère; dysfonctionnement du kinétochore, dysfonctionnement de fuseau.

#### **I.3.1.2.3 Rupture chromosomique dicentrique**

Les chromosomes polycentriques, lorsqu'ils sont répartis entre deux cellules, peuvent se briser et se casser en plusieurs morceaux, donnant un micronoyau ou / et extrémités de chromatides brisées non protégées. Les extrémités de chromatides non protégées sont sensibles à différents processus de réorganisation et peuvent déclencher des cycles de rupture – fusion – ligature, qui donnent lieu à la formation de micronoyau et sont considérés comme l'un des mécanismes de l'instabilité des chromosomes dans les cellules cancéreuses.

#### I.3.1.2.4 Instabilité chromosomique

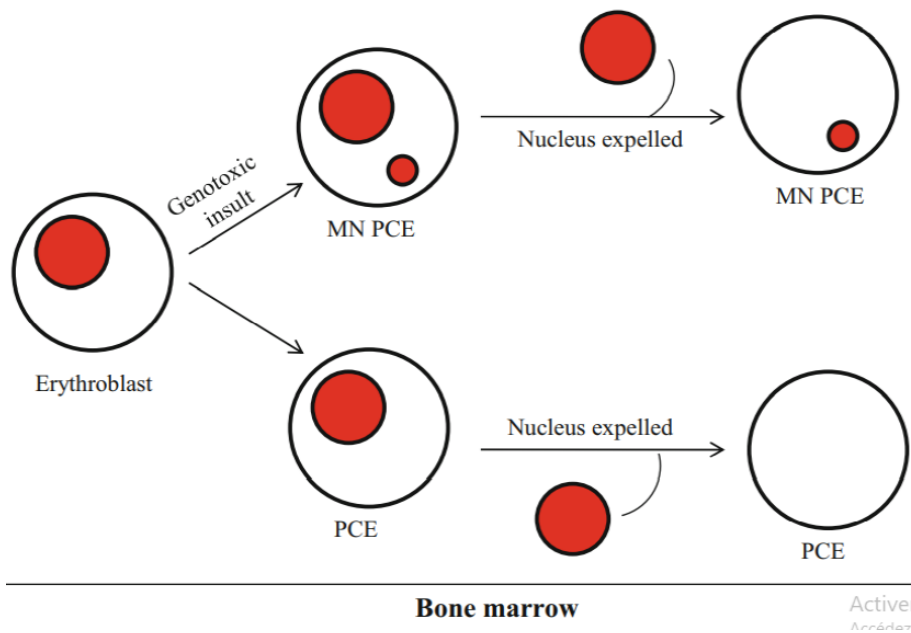
L'instabilité chromosomique est une condition dans laquelle les cellules subissent des changements dans leur génome à un rythme élevé. L'instabilité chromosomique se manifeste souvent par des cellules pré-néoplasiques et cancéreuses, qui montrent une fréquence élevée de micronoyau.

#### I.3.1.2.5 Agrégation de doubles minutes (DM)

Les doubles minutes sont des petits corps extra chromosomiques acentriques sans télomère, sous forme d'ADN circulaire. Ils ont été observés dans de nombreux types de tumeurs, y compris le sein, le poumon, l'ovaire, le côlon et neuroblastome. Les doubles minutes sont la manifestation de l'instabilité génomique et récemment ils ont été liés au phénomène de chromothripsie. Ils portent plusieurs copies des gènes, généralement des oncogènes ou des gènes impliqués dans la résistance aux médicaments. De nombreuses copies de DM peuvent se trouver dans une seule cellule souvent liée aux chromosomes. DM, lorsqu'ils sont détachés des chromosomes, peuvent former des agrégats de micronoyau (**Sommer et al, 2020**).

Ce test est le mieux établi dans les études de cytogénétique in vivo, et dans le domaine de toxicologie génétique, grâce à ces caractéristiques des cellules du système hématopoïétique: (1) la facilité de la notation des micronoyaux dans les réticulocytes anucléés nouvellement formés, dérivant de la moelle osseuse et (2) l'identification des érythrocytes nouvellement formés, ayant terminé leur dernière division pendant ou après l'exposition à l'agent d'essai (**Kumar et al, 2019**).

En **1977**, **Heddle** a noté que les rayons gamma induisaient la formation de micronoyaux dans la moelle osseuse de souris, et il a suggéré l'hypothèse suivante: « la teneur en ADN dans les micronoyaux a été formé à partir de fragments chromosomiques acentriques qui ont été produit par rupture aléatoire du génome de la souris» (**Kumar et al, 2019**).



- PCE; Érythrocyte polychromatique
- MN PCE; Érythrocyte polychromatique micronucléé

**Figure 2 :** Une représentation simple de la formation de micronoyaux dans les érythrocytes de la moelle osseuse (**Kumar et al, 2019**)

**Tableau 2:** Exemples d'applications du test du micronoyau par bloc de cytokinèse pour détecter et étudier des maladies génétiques (**Sommer et al, 2020**)

Diagnostiquer des troubles génétiques comme l'anémie de Fanconi, l'ataxie télangiectasie ou diverses maladies auto-immunes.
Évaluation de la sensibilité individuelle aux effets d'agents génotoxiques exogènes ou endogènes.
Évaluation du risque de développer un cancer et d'autres maladies chroniques.
Test de prédiction d'un effet secondaire aux radiations (réaction tissulaire normale) de patients atteints de différents cancers soumis à la RT et au suivi après RT.
Quantification de la génotoxicité in vitro de différents schémas de RT.

**Tableau 3 : Types de test de micronoyau (Sommer et al, 2020)**

Types de cellules	Cellules utilisées	Intérêt	Caractéristiques
Test de micronoyau par blocage de cytokinèse (CBMN)	Humain, rongeurs, lapin, poisson, chiens, Primates, etc.  Lymphocytes ou lignées cellulaires.	Biosurveillance; Dosimétrie biologique; Génotoxicité in vitro ou in vivo Expériences biologiques où les dommages cytogénétiques sont évalués.	Le Mn est noté dans les cellules binucléées, où la cytokinèse est arrêtée par l'ajout de cytochalasine B. Le plus populaire in vitro et in vivo MN.
MN Érythrocytaire	Humain, rongeurs, lapin, poisson, chiens, les primates, érythrocytes immatures.	Génotoxicité in vivo des produits chimiques, des médicaments ou des conditions nocives.  Biosurveillance.	Test réalisé généralement sur de jeunes rongeurs, mais une biosurveillance de la population humaine basée sur le sang périphérique est possible.  Lorsqu'il est réalisé dans les érythrocytes du sang périphérique, la sélection splénique doit être envisagée.
Buccale MN.	Cellules buccales épithéliales humaines.	Impact de la nutrition; les habitudes de vie, comme fumer et boire de l'alcool;  Exposition génotoxique;  Exposition cytotoxique;  Risque de vieillissement accéléré, de certains types de cancer et de maladies neurodégénératives.	Test in vivo peu invasif. Convient pour la biosurveillance.
MN dans les autres cellules	Cellules de la muqueuse nasale, cellules dérivées de l'urine.	Biosurveillance;  Génotoxicité;  Pronostic de certains cancers.	Pas très populaire, bien qu'il y a de nouvelles publications

### I.3.3. Test des comètes :

C'est une méthode de détection et de détermination quantitative de l'ADN endommagé, plus précisément les cassures doubles et simples brins d'ADN par une électrophorèse sur gel d'agarose, la migration des extrémités libres d'ADN relâchées, chargées négativement vers l'anode dont l'augmentation indique l'augmentation des cassures d'ADN, et la visualisation se fait par fluorescence. Cette méthode est sensible, pratique, rapide, flexible et facile, elle a trouvé une large application *in vitro* et *in vivo* car elle nécessite une petite quantité d'échantillon et peut être effectuée dans n'importe quelle population cellulaire proliférante ou non, et permet la mesure de milliers de cellules à la fois et la variation de réponse aux agents toxiques et génotoxiques entre les cellules de la même population.

En 1990, une modification de la méthode originale d'Ostling et Johanson a été présentée et nommé le «test de comète» (Olive, 2006).

La tête de comète contenant l'ADN de haut poids moléculaire, et la queue de comète contenant les extrémités d'ADN. Les fragments en migration sont mesurés en temps réel à partir d'images numérisées à l'aide d'un logiciel développé à cet effet.

Tout d'abord et en réponse à des agents endommageant l'ADN, des mesures de l'hétérogénéité ont été testées sur des cellules exposées au médicament chimiothérapeutique anticancéreux, la bléomycine (Olive, 2006).

L'importance de l'hétérogénéité dans la révélation des cellules endommagées est de préciser et d'évaluer la résistance des cellules au traitement de cancer, d'autres intérêts de cette méthode viennent de son potentiel d'application en biosurveillance humaine et en évaluation écologique des organismes exposés à des contaminants environnementaux, détection de différents types de dommages d'ADN; Les variations des composants du test lui ont permis d'être utilisé sur les bactéries, les cellules de différents organes d'animaux comme les cellules de foie, de sang ; cellules germinales (spermatozoïdes).

Les nouvelles applications incluent l'identification par billes magnétiques des marqueurs de surface cellulaire et l'hybridation *in situ* par fluorescence pour détecter l'effet des séquences spécifiques sur l'ADN endommagé.

Le principe de ce test est basé sur : une lyse des cellules d'un tissu unique seul, disposées sur des lames, le test commence avec un traitement alcalin/neutre (le cas de teste de comète alcalin/neutre) après il ya une migration cellulaire par électrophorèse, puis coloration d'ADN et neutralisation, à la fin la visualisation des résultats, et les traitements statistiques en utilisant les

paramètres du logiciel d'analyse d'image tels que le pourcentage d'ADN dans la queue (pourcentage d'ADN migré), la longueur de la queue et le moment de la queue (fraction d'ADN migré multipliée par une certaine mesure de la longueur de la queue) tout ces résultats peuvent être déterminée comme une mesure de l'ADN endommagé, deux variants de protocole sont décrits, le premier est effectué dans des conditions neutres et ne détecte que les cassures double brin d'ADN, pour le deuxième dans les conditions alcalines détecte les cassures simples brins, doubles brins et les sites labiles.

Des informations plus précises sur la nature des lésions détectées peuvent être obtenues par l'utilisation d'endonucléases spécifiques dans le protocole de test, qui convertissent certains types des dommages d'ADN aux ruptures de brins. Formamidopyrimidine-ADN-glycosylase (FPG) a été utilisé pour détecter des dommages à l'ADN oxydé, principalement le 7,8-dihydro-8-oxo-2'-désoxyguanosine (8-oxo-dGuo), à haute sensibilité.

Plus récemment, il a été rapporté que le FPG détecte également certains types de dommages d'alkylation, et que l'homologue humain du FPG, hOGG1, est une endonucléase plus spécifique pour les produits d'oxydation. Une autre enzyme, l'endonucléase III, convertit les pyrimidines oxydées aux cassures de brins d'ADN (**Phillip et al, 2009**).

Il y a deux types de test de comète : in vivo pour l'évaluation de l'ADN endommagé, in vitro réalisé sur diverses lignées cellulaires cultivées, les plus fréquemment utilisées sont des cellules ovariennes / pulmonaires de hamster chinois (CHO,CHL, V79) et lignée cellulaire de cancer du sein humain (MCF7), cellules de lymphome de souris (L5178Y) et lymphoblaste humain (TK6).

Dans le domaine de la génotoxicologie, le test in vivo des comètes a été considéré comme un outil puissant pour distinguer entre un carcinogène génotoxique et carcinogène non génotoxique et ainsi pour identifier les cancérogènes et les mutagènes.

Par conséquent, le test des comètes est un biomarqueur pour la détection à la fois de la susceptibilité génétique et les dommages à l'ADN liés à carcinogénèse.

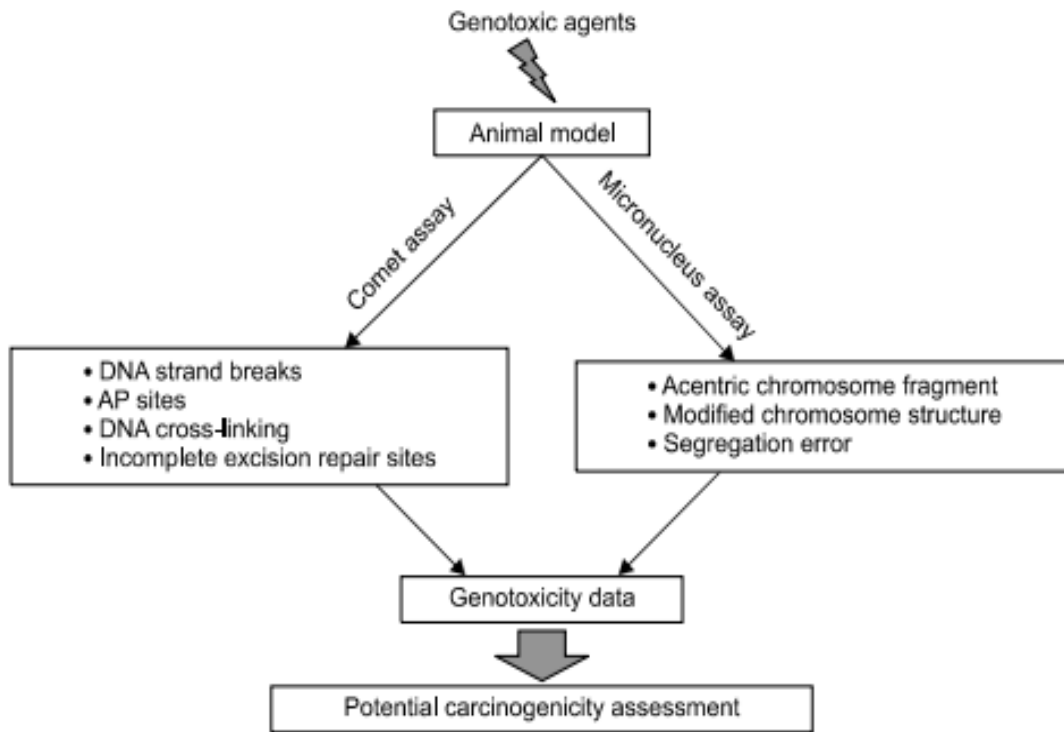


Figure 3 : Schéma représentant le test de micronoyau in vivo et le test de comète pour l'étude de cancérogénicité (Kang, et al, 2013)

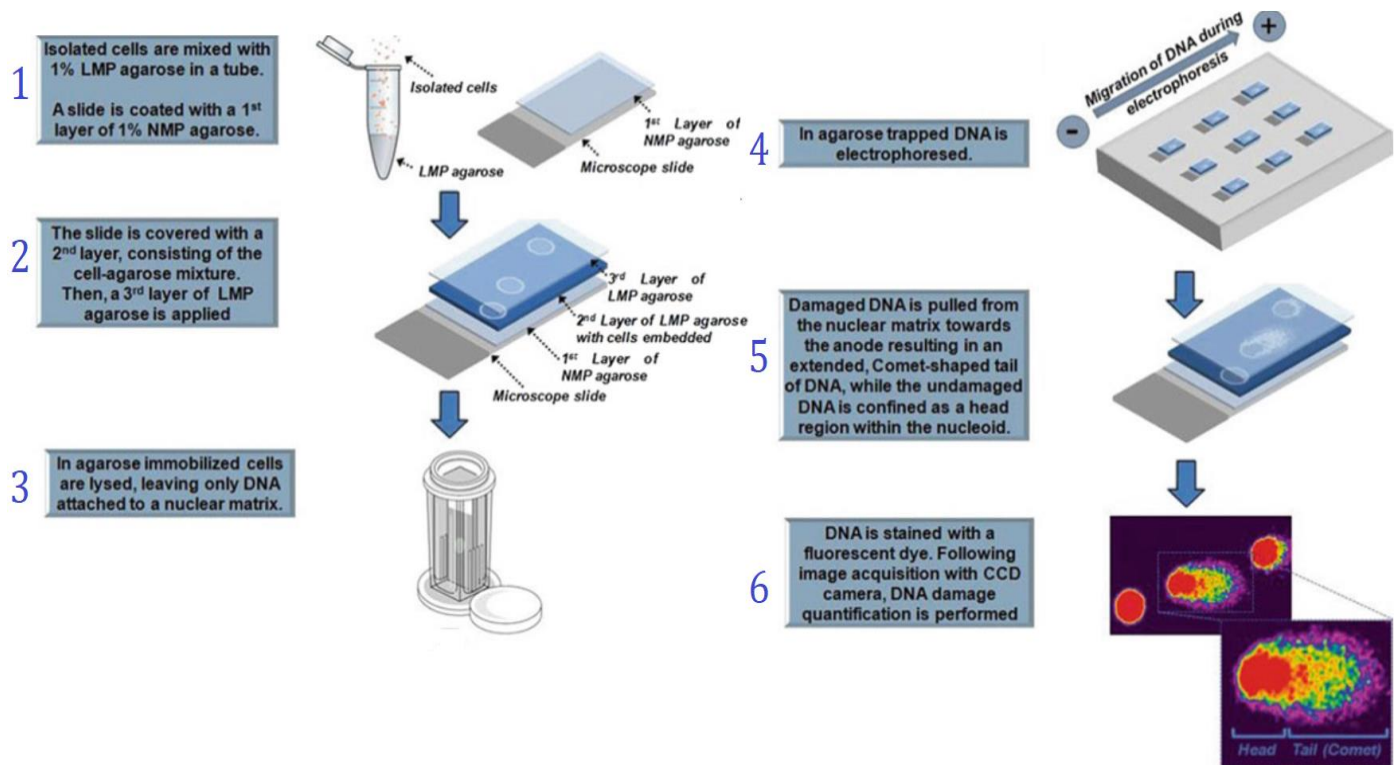


Figure 4: Illustration d'un test de comète (Anderson et al, 2019).

### I.3.4. Le test de mutation bactérienne inverse « test d'Ames »

Le test de mutation bactérienne inverse in vitro sur les souches de *Salmonella typhimurium* a été développé pour la première fois par le scientifique Bruce Ames en 1973, dans le laboratoire de Bruce Ames à Berkeley, Californie (**Zeiger, 2019**), dont le principe est basé sur l'utilisation des bactéries, elle est rapide (multiplication et croissance rapide des bactéries) donnant des résultats en 48 h (**Zeiger, 2019**), avec une manipulation simple grâce au phénomène de sélection des mutants dans la détection de potentiels toxiques et ne nécessite que du matériel de laboratoire standard.

C'est le test de sélection le plus important lors de développement des produits chimiques agricoles, pharmaceutiques, additifs alimentaires et d'autres produits chimiques commerciaux.

Ce test est un moyen de détection de potentiel mutagénique des produits chimiques et prédiction de cette dernière dans les composés non mutagéniques par les formes réactives d'ADN et donc la distinction entre cancérigène et non cancérigène ; par le moyen d'induction d'une mutation inverse dans le gène qui code pour un acide aminé dans les souches modifiées de *Salmonella*.

Plusieurs versions ont été introduit au test d'Ames, comme la version mini test de mutagénicité (MMT) pour minimiser ce dernier, autres versions sur milieux solide et liquide ont été développé (**Flamand et al, 2001**).

L'activité mutagénique est déterminée par le calcul de ration de toxicité qui est comme suit : nombre des colonies révertantes testées/ nombre des colonies revertantes de contrôle.

Le test utilise en principe 2 souches bactériennes (*Salmonella* et / ou *E. coli*), dont le plus utilisées TA1535, TA1537, TA98 et TA100 de *Salmonella* (**VERHAGE et al, 1994**), étalées sur des plaques d'agarose/ou de gélose avec la présence et non de l'activateur métabolique le S9, les cellules sont exposées à un produit chimique à étudier, ces cellules mutantes avec une substitution de base ou bien décalage de cadre de lecture d'un acide aminé, ne peuvent pas croître dans un milieu pauvre en cet acide aminé, l'ajout d'un produit chimique à étudier au centre des plaques induit la réversion de mutation et la croissance cellulaire dans ce milieu et migration et formation d'un gradient de concentration (**Zeiger,2019**), cet augmentation est considérée comme un signe de mutagénicité de ce produit (**VERHAGE et al, 1994**).



### I.3.5. Test d'aberration chromosomique :

C'est un biomarqueur cytogénétique utilisé pour la détection de la mutagénicité et les anomalies cytogénétiques chez l'homme et aussi chez les animaux.

C'est une méthode de surveillance de l'ADN et les chromosomes. Les aberrations chromosomiques peuvent apparaître au niveau des chromosomes et/ou des chromatides, pendant la phase G1, G2 ou S. Les mutations chromosomiques se divisent en deux catégories liées aux changements dans: la structure chromosomique (aberrations chromosomiques) et le nombre de chromosomes (aberrations numériques).

Dans les cellules germinales, les mutations chromosomiques contribuent à la mortalité du fœtus pouvant atteindre 50% des avortements spontanés. La fréquence totale des mutations chromosomiques à la naissance a été estimée à environ 0,6%, dont 0,2% sont causés par des anomalies du nombre de chromosomes sexuels, 0,14% en raison de chromosomes autosomiques et 0,25% en raison d'anomalies dans la structure des chromosomes. Dans les cellules somatiques, les mutations chromosomiques jouent un rôle clé dans le processus de formation des tumeurs malignes si ces mutations touchent les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et / ou les gènes de réparation d'ADN (**Mosesso et al, 2019**).

Il existe deux types de test, in vivo et in vitro sur différents tissus et cellules comme les cellules lymphocytaires sanguines humaines, les cellules d'hamster chinois et d'autres.

**I.3.5.1. Les types d'aberrations chromosomiques :** présentés sur l'annexe 1.

### I.3.6. Test de lymphome de souris (MLA) :

C'est un test in vitro largement utilisé dans la détermination de potentiel génotoxique des produits chimiques et la détection d'un large spectre d'événement génétique nocif sur l'ADN y compris : les mutations ponctuelles, les délétions, les aberrations chromosomiques, réarrangement chromosomique des loci, recombinaison mitotique. Il se base sur l'utilisation des cellules de lymphome de souris L517 Y (Tk +/- 3.7.2C), désignées comme le test du lymphome de souris (MLA), développé par Donald Clive et ses collègues (**Schisler et al, 2013**). La version de micropuits du MLA in vitro est une autre méthode de sélection de cellules mutantes de Tk, elle est réalisée sur un fond de puits (**Guo et al, 2018**).

En **2017**, **Liu et al**, ont étudié et développé une nouvelle méthode quantitative de contact directe sur les cellules de lymphome de souris TK en suspension, qui est une méthode

prometteuse car elle évite le choc mécanique des cellules avec le matériel de laboratoire et donc permet l'adhésion cellulaire adéquate.

Les cellules de lymphome de souris sont hétérozygotes au locus de la thymidine kinase « Tk1 » sur le chromosome 11, pour l'allèle *Tkb1* (allèle fonctionnel) (Clements, 2000), cet enzyme est utilisé par la cellule dans le mécanisme de récupération de la thymidine ou bien son analogue du milieu extérieur par un mécanisme de phosphorylation en thymidine monophosphate « TMP ». Les cellules *Tk<sup>-/-</sup>* possèdent une résistance aux analogues toxiques de thymidine tel que la trifluorothymidine « TFT » (par l'inactivation de l'allèle) mais les cellules mutantes *Tk<sup>-/+</sup>* ne disposent pas de cette résistance.

L'analogue qui est un agent cytotoxique, interfère dans la synthèse d'ADN et entraîne une mutation directe au niveau de ce gène par conséquent la perte de l'enzyme contribue à l'apparition d'anomalies génétiques. Dans la MLA, deux classes distinctes de phénotypes de mutant *Tk*:

1 - les mutants de grandes colonies (LC) qui se développent au même rythme que les cellules de type sauvage, elles portent moins de mutations génétiques et elles sont semblables au type sauvage.

2 - les mutants de petite colonie (SC) qui se développent avec un rythme long, elles portent des anomalies plus graves avec de grosses modifications chromosomiques (Schisler et al, 2013).

Les mutants qui ont perdu l'allèle *Tk1b* par différents mécanismes moléculaires y compris ; délétion, non-disjonction des chromosomes, recombinaison, conversion génique dépendent du mutagène et cela contribue à leur capacité de la détection de plusieurs types de mutations dans le cadre d'utilisation de différents produits mutagènes (Clements, 2000).

## I.4. Synthèse des travaux réalisés dans le domaine de la génotoxicité

### I.4.1. Transformation cellulaire in vitro avec un carcinogène chimique.

Berwald et al, (1963) ont travaillé sur l'induction de la carcinogenèse in vitro sur culture cellulaire par l'utilisation des produits chimiques carcinogènes. La question qui se pose : « est-ce-que ces altérations cellulaires sont liées aux produits carcinogènes ? ». Une des premières étapes de l'examen chimique in vitro semble donc être de déterminer si les modifications héréditaires peuvent être directement induites par ces produits. Trois molécules sont utilisées : le 3-4 Benzopyrène et le 3-methylcholanthrene; le ethyl-carbomate (Uréthane) aussi le virus Polyoma sur des cellules d'hamster et de souris sur culture cellulaire à court terme et leurs effets sur des cellules clonées.

Les résultats montrent qu'après l'ajout de molécule carcinogène, il y a toujours un pourcentage des cellules transformées, ce qui indique que le Benzopyrène et le methylcholanthène induisent directement la transformation des cellules *in vitro* et la formation de tumeurs et ne pas la sélection des cellules transformées spontanément. Il y a une résistance au traitement chimique qui diffère d'une population (culture cellulaire) à une autre. Le mécanisme de résistance est mal connu mais peut-être dû à une inhibition de contact et de pénétration de carcinogène.

#### **I.4.2. Classification génotoxique des médicaments anticancéreux.**

**Thomas et al, (1985)** ont testé la génotoxicité des médicaments sur des souches bactériennes par l'induction de prophage et des mutations géniques létales.

Le travail réalisé pour déterminer l'effet de médicaments anticancéreux qui provoquent des mutations géniques sur 3 types de souches : présentes de système de réparation par excision ; déficientes en système de réparation par excision et élimination des lésions prématurées d'ADN.

Comme résultat : le système de réparations par excision est le principal système de réparation d'ADN de la plupart des êtres vivants, y compris les bactéries et l'homme. Bien que l'extrapolation directe sur l'homme soit impossible, un médicament dont les lésions pré-mutationnelles sont facilement réparées par le système d'excision bactérien, la réparation devrait, du moins théoriquement, constituer une menace moindre pour l'homme qu'un médicament dont l'activité mutagène peut avoir lieu dans ce système de réparation bactérien.

En comparaison entre les 2 systèmes : bactéries compétentes et déficientes, chez les bactéries compétentes, les mutations apparaissent à un niveau de concentration de médicament très élevé. Ils ont conclu de cette analyse, d'un point de vue théorique, ne présente aucun seuil de sécurité prévu pour protéger le personnel médical qui mélange et travaille avec des antinéoplasiques de classe I ou II à partir de faibles expositions, Par contre, l'analyse prédit qu'il serait difficile, sinon impossible, d'obtenir des preuves épidémiologiques positives d'une faible exposition aux médicaments de classe.

#### **I.4.3. Prolifération cellulaire dans la carcinogénèse.**

**Samuel et al, (1990)** ont classé les produits chimiques en agent qui interagit avec l'ADN (génotoxique) et ce qui ne l'est pas (non génotoxique) avec leurs différents modes de fonctionnements : agent complet, initiateur, promoteur de la cancérogénicité; en altérant directement l'ADN ou augmentant la prolifération cellulaire, ou bien les deux ensembles.

Les cellules dans l'organisme vivant se trouvent dans 3 états : normal, intermédiaire, ou bien transformé en cellules malignes. Pour déterminer le seuil de la transition entre ces états et le changement génétique qui l'accompagne induit par les molécules toxiques, des études sont faites sur 2 molécules : le 2-acétylamino-fluorène (2-AAF), un composant génotoxique, et le sodium saccharin. D'autres composants non génotoxiques ont été utilisés pour illustrer le rôle important de la prolifération cellulaire dans la cancérogénicité des produits chimiques non toxiques et pour estimer le risque d'exposition humaine, testés sur le foie et la vessie des rats.

Les produits génotoxiques comme 2-AAF ont un double effet ; à une dose élevée entraînent la mort cellulaire ou la prolifération cellulaire, à une dose faible, la toxicité cellulaire. La réponse d'un produit chimique et en relation si le composé a un effet génotoxique ou un effet prolifératif, ou les deux ; les produits non génotoxiques peuvent être classés en fonction de leurs mécanismes d'action : -soit ils jouent un rôle dans l'augmentation directe/indirecte de la prolifération cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur cellulaire spécifique/ non spécifique ; -une stimulation mitogénique directe, - bien une interruption des processus physiologiques.

#### **I.4.4. Étude comparative de structure-génotoxicité de trois médicaments à base d'aminanthraquinone et de doxorubicine.**

1,4-bis {2 - [(2-hydroxyéthyl) amino] éthylamino} -9,10-anthracènedione (**HAQ**) , 1,4-dihydroxy-5,8-bis {2 - [(2-hydroxyéthyle) amino] éthylamino] 9,10-anthracènedione (**DHAQ**), et le 1,4-dihydroxy-5,8-bis {2 - [(2-hydroxyéthyl) amino] éthylamino] -9,10-anthracènedione diacétate (**DHAQ diacétate**) sont des analogues de l'aminanthraquinone ayant des propriétés thérapeutiques anticancéreuses mais au même temps toxiques pour les animaux de laboratoire. Le mécanisme d'action de ces aminanthraquinones semble être similaire d'un composé chimique ADR qui est utilisé aussi dans ces études. **William et al, (1981)** ont fait des expériences sur ces composés en étudiant la relation structure-activité et leur toxicité génique. En passant par les tests suivants avec l'addition ou non de la fraction S9 et Le ADR. Test de ruptures chromosomiques : sur cultures cellulaires, d'ovaire d'hamster chinois Mycoplasma-irée : pour chaque dose ils ont utilisé 1000 cellules pour déterminer l'index mitotique MI et 50 métaphases pour les aberrations chromosomiques telles que : les lésions, les ruptures et les échanges. A différentes concentrations de médicaments, il y a diminution de MI qui varie en fonction du traitement, les aberrations chromosomiques spontanées ou induites ont augmenté significativement. L'effet de chaque médicament est différent, aussi le milieu S9 l'a diminué.

Le test SCE : échange des chromatides. Effectué sur cellule d'ovaire d'hamster chinois. Le SCE été noté sur 20 métaphase-dose dépendante. Tous les médicaments ont induit une

augmentation de la SCE. Mais en général la présence de S9 a réduit la toxicité. Test de mutagenèse : le test Salmonella typhimurium-microsome sur différentes souches bactériennes (TA98, TA100, TA1535 et TA1537) : Quatre doses 6,5, 32,5, 65 et 130 PIM ont été testé en deux fois avec un control positif (2-aminoanthracène, 9-aminoacridine, 2-nitrofluorène et Nméthyl-A / '- nitro-A / -nitrosoguanidine). Tous les médicaments sont toxiques pour les différentes souches bactériennes (avec des mutations : décalage de cadre de lecture ; substitution de base). Le HAQ nécessite une activation métabolique seulement in vitro tandis que le DHAQ et le diacétate DHAQ ont une activité maximale sans activation.

Dans cette étude limitée de la relation structure-activité des 3 médicaments à base d'aminoanthraquinone, parmi eux, thérapeutiquement le DHAQ est le plus actif comme agent antitumoral et le moins toxique avec le DHAQ diacétate comparant avec le HAQ. Ils induisent les cassures et les aberrations chromosomiques beaucoup plus chez les mammifères que chez les bactéries, tandis que le HAQ sa toxicité est observée dans la réduction de l'index mitotique. Ils ont conclu que la sensibilité de test cytogénique et mutagénique n'est pas la même, car il ya une différence dans l'activité de chaque agent ou leur métabolite, leur fraction.

#### **I.4.5. Un test de signal pour la détection de composés génotoxiques: application sur les urines de patients cancéreux en chimiothérapie et d'infirmières manipulant des médicaments cytotoxiques.**

**Burgaz et al, (1988)** ont travaillé sur la détection des composés génotoxiques dans les urines des patients cancéreux sous traitement chimio-thérapeutique et des personnels de santé qui manipulent ces produits. A partir d'une méthode de surveillance biologique, le test de la détermination des thioéthers excrétés qui sont des conjugués de glutathion qui est prouvé d'être utile dans la surveillance de contaminations internes des sujets aussi leurs capacités de désintoxication.

Les tests sont réalisés sur 32 patients cancéreux (hommes et femmes) et 10 infirmières et 28 personnes \*témoin\*. Les médicaments utilisés sont : le cyclophosphamide, la vincristine, la doxorubicine, le méthotrexate et le 5-fluorouracil. Parfois, des combinaisons de cisplatine, tamoxifène, bléomycine et D-actinomycine. Les excrétions moyennes de thioéther chez les témoins était d'environ  $3,38 \pm 0,48$  mmol SH- / mol de créatinine, et  $5,17 \pm 1,25$  mmol SH- / mol de créatinine chez les infirmières, chez les patients une valeur moyenne de  $16,83 \pm 2,92$  mmol SH- / mol créatinine.

Dans cette étude ils ont conclu que les infirmières qui manipulent les produits chimiques génotoxiques ne présentent pas des quantités significatives de ces médicaments donc pas de toxicité. Par contre les patients sous traitement anticancéreux présentent des valeurs différentes varient entre celles qui sont normales et d'autres anormales. L'état élevé de thioéther chez certains patients est dû à une combinaison de médicament : cyclophosphamide, vincristine et doxorubicine. L'effet d'un seul médicament sur l'excrétion de thioéther est difficile à évaluer. Dans certains cas où le taux est normal, il faut vérifier l'activité de glutathion-S-transférase. Un test périodique d'évaluation de thioéther urinaire des patients et des personnels de santé est nécessaire afin de minimiser les risques des médicaments cytotoxiques.

#### **I.4.6. Génotoxicité des déchets et effluents industriels.**

Plusieurs composés chimiques toxiques ont été rejetés dans la nature et l'environnement quotidiennement depuis des années, en polluant l'air, l'eau et la terre. **Claxton et al, (1998)** ont travaillé sur la caractérisation de ces produits toxiques et leurs effets néfastes sur la santé humaine par l'intermédiaire des essais biologiques. Multiples tests de génotoxicités sont utilisés pour l'évaluation de produits toxiques et mélanges complexes, parmi eux, il y a : le test chromosomique, le test de mutation génique, le test sur animaux in vivo mais le plus utilisé c'est le test de Salmonella dû à leur manipulation facile et grande rentabilité.

Le couplage de ce test avec les analyses chimiques a permis l'identification et l'isolement des fractions chimiques. Par la suite d'autres tests sont utilisés pour identifier chaque composé de cette fraction. Ces tests ont été utilisés dans plusieurs études pour identifier la toxicité des effluents et les déchets industriels, comme des raffineries de pétrole et métaux, des industries de composés organiques et les fabrications biologiques, des fabricants de résine et des fabricants de colorants, des usines de pâtes et papiers.

Par conséquent, Ils ont classé le pouvoir génotoxique de chaque effluents et déchets et le danger posé sur le milieu. Cependant il y a des procédés pour réduire ou éliminer cette toxicité, y compris l'augmentation du pH des effluents, le remplacement du dioxyde de chlore par le chlore, le traitement des effluents avec du dioxyde de soufre et l'utilisation de méthodes d'échange d'ions. Mais ils restent parfois inefficaces et inadéquats, car il y a l'interaction environnementale, et des composés complexes, qui sont non identifiés, non réglementés. Les bio-essais sont un outil puissant pour évaluer et surveiller la génotoxicité des effluents industriels en fournissant des données pour éliminer ou diminuer les risques sur l'humain et l'environnement.

### **I.4.7. Thérapie oxydative: l'utilisation d'un système enzymatique génératif d'espèces réactives d'oxygènes pour le traitement des tumeurs.**

**Ben-Yoseph et al (1994)** ont utilisé l'enzyme PEG-GO polyéthylène glycol-glucose oxydase qui génère des espèces réactives d'oxygène comme agent anti-tumoral dans le traitement de tumeurs solides chez le rat sur des cellules de gliomes L9 cultivées. La glucose oxydase a été choisie parce qu'elle a une activité spécifique aussi une disponibilité élevée, et la substance glucose et oxygène sont abondantes dans les tissus. La stabilisation d'enzyme glucose oxydase GO est effectuée par une liaison à une autre enzyme le polyéthylène glycol PEG et a augmenté la demi-vie d'enzyme in vivo à 30-40h.

Les paramètres sont mesurés par la spectrométrie de masse, spectrophotométrie standard et la spectroscopie par résonance magnétique aussi pour évaluer l'effet métabolique in vivo de la thérapie d'oxydation. L'étude est divisée en deux parties : en commençant in vitro par la culture des cellules de gliome de rat L9, traitées par des concentrations différentes de l'enzyme PEG-GO et le peroxyde d'hydrogène, ils ont quantifié la toxicité cellulaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> préexistant et généré en terme de survie des cellules et inhibé le glutathion intracellulaire (GSH) par le composé buthionine sulphoximine (BSO), pour étudier l'effet de leur réduction sur la sensibilité des cellules tumorales qui est entre autre la fourniture d'une excellente méthode pour la sensibilisation des cellules à la thérapie oxydative.

Après la culture in vitro, vient l'étape in vivo et les mesures ont pris avant et après l'injection de des cellules dans des rats Fisher-344 mâles, et de PEG-GO, pour les rats témoins le PEG-GO est dénaturé, ils ont analysé l'état de l'ATP, le Pi et le PH des cellules tumorales. Dans ces tumeurs, la croissance est diminuée aussi le taux d'ATP et PH, les chercheurs ont remarqué qu'il y a un changement métabolique après une mort cellulaire, dans leur point de vue l'ATP est consommée par la cellule dans plusieurs cas comme le mécanisme de correction de la poly ADP-ribose polymérase qui intervient dans le cas des cassures de brin d'ADN causée par le peroxyde d'hydrogène ou il ya une consommation d'ATP dans d'autre cas le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intervient dans la glycolyse par l'inhibition de la a glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase entraînant un épuisement d'ATP.

Ils sont conclus que la surveillance de niveau d'ATP est un moyen pour étudier l'évolution de la tumeur, et cette étude prometteuse fournit la preuve que la thérapie d'oxydation est un candidat fort pour le traitement des tumeurs.



#### **I.4.8. la cytotoxicité et aberrations chromosomiques in vitro: l'expérience de l'industrie et les arguments en faveur d'une limite supérieure de toxicité dans le test d'aberration.**

**Galloway (2000)** de laboratoire de recherches Merck, en Pennsylvanie a travaillé sur la cytotoxicité et le test d'aberration chromosomique in vitro. Dans le but de la détection des agents mutagènes, clastogènes qui ne sont pas toxiques in vivo, et la toxicité est un événement qui suit l'aberration chromosomique par conséquent l'étude de la limite supérieure de celle-ci par le test cité avant.

Les composés pharmaceutiques et d'autres avec différentes fonctions et structures sont distribués selon la toxicité connue dans la catégorie 1 et dont la toxicité est indirecte, catégorie 2 et n'endommage pas l'ADN par les mécanismes connus comme : les analogues de nucléosides, les inhibiteurs de topoisomérase, la production des radicaux libres.

L'étude est faite sur les cellules d'ovaire d'hamster chinois (CHO) avec 144 composants et sur les cellules lymphocytaires humaines primaire avec 106 composants, ils ont mesuré l'index mitotique MI et la croissance, la survie cellulaire pour la plus basse concentration. En comparant les résultats avec ceux des autres tests, in vitro : le test de salmonella, MLA : test de mutation tk des cellules L5178Y, Hprt / TK6: mutation génique au locus hprt dans les cellules V79 ou CHO, SHE transformation: transformation morphologique de cellules d'embryons de hamster syrien, in vivo : le test de micronoyau, le test d'aberration structurale chromosomique en métaphase et UDS: synthèse d'ADN non programmée, SB: rupture de brin d'ADN in vitro et vivo. Et l'activation métabolique, l'endoréduplication ou polyploïdie signalée, la solubilité ; les données de cette enquête, indique qu'une proportion de résultats positifs dans le test d'aberration chromosomique in vitro n'est pas pertinente pour le risque humain, et cette proportion a tendance à augmenter selon la toxicité si elle dépasse 50%, pour la catégorie 1 ce pourcentage est suffisant pour des résultat positif, même pour réduire les résultat non pertinent pour la catégorie 2, qui permet la détection de la majorité des composés qui endommagent l'ADN.

#### **I.4.9. Génotoxicité et cytotoxicité des médicaments anticancéreux Gemcitabine et Cisplatine, séparément et en association: études in vivo.**

Le gemcitabine 2',2'-difluorodeoxycytidine, (dFdC) et le cisplatine (cis-diammine-dichloroplatinum CDDP) sont des médicaments anticancéreux largement utilisés dans le traitement des tumeurs solides comme le cancer des poumons et des ovaires. Cependant des études faites sur le CDDP montrent leur potentiel toxique et leur action en interagissant avec



l'ADN et la formation des adduits de Pt-ADN. Le dFdC est un agent intercalant qui bloque la synthèse d'ADN et qui inhibe les enzymes de réparation d'ADN. Pour mieux comprendre l'effet génotoxique de ceux-ci, **Magdy et al, (2003)** ont fait des études *in vivo* en surveillant la fluctuation des paramètres cytogénétiques : l'index mitotique, l'index de réplication, les aberrations chromosomiques en nombre et en structure, aussi les échanges des chromatides sœurs SCE, sur des souris mâles. Différentes doses ont été administrées, Pour chaque médicament celles-ci ont été séparées et regroupées.

Les résultats obtenus sur le CDDP étaient les mêmes que les autres études, et leur effet toxique était prouvé *in vivo*, les aberrations sont doses-dépendantes et elles sont manifestées comme suit : l'inhibition de l'activité mitotique, augmentation de phénomène CSE (échange des chromatides sœurs) en augmentant la dose, et la diminution de l'index de réplication.

Pour le dFdC, l'effet génotoxique *in vivo* est démontré pour la première fois, ce médicament induit les aberrations chromosomiques et diminue l'index mitotique et l'inhibition de la croissance cellulaire, la fréquence de SCE a augmenté et de RI a diminué significativement en augmentant la dose.

Cependant les résultats pour la combinaison de deux médicaments, dFdC et CDDP ont été contradictoires, le risque et l'effet toxique sont toujours présents et des études ultérieures sont nécessaires pour mieux comprendre leurs mécanismes d'action et leurs interactions avec l'ADN.

#### **I.4.10. Un système végétal transgénique sensible pour détecter les composés inorganiques toxiques dans l'environnement.**

La pollution et la contamination de l'environnement avec les différents métaux lourds est devenue de plus en plus marquante, la concentration des métaux lourds dans l'air, le sol, et l'eau se diffère avec la génotoxicité de ceux-ci.

Pour cela différents tests ont été utilisés comme le test d'Ames, test d'échange de chromatides sœurs et d'autres comme des systèmes transgéniques des animaux, ceux-ci n'ont pas été efficaces dans les mesures de toxicité et la révélation des aberrations moléculaires. Le chercheur **Kovalchuk et al, (2001)** s'ont été dirigés vers les plantes et précisément celles qui sont transgéniques.

Leur étude est faite sur la plante *A.thaliana* transgénique qui porte le transgène GUS (B-glucoronidase) ou le gène rapporteur désactivé de recombinaison homologue ou/et mutation ponctuelle non essentielle pour les fonctions vitales de la cellule. Permettent une évaluation directe des dommages de l'ADN (cassures de brins pour le rapporteur de recombinaison et

mutations ponctuelles pour le rapporteur de mutation). Des expériences quantitatives sur la plante transgénique cultivée dans des sols contaminés par des concentrations différentes des métaux lourds suivants : le zinc, le nickel, cadmium, plomb, cuivre.

Les résultats montrent une toxicité dose-dépendante selon le métal non toxique comme le zinc qui est toxique à très élevée concentration, cytotoxique comme le plomb et cadmium à des basses concentrations. Ce test était plus sensible, rapide, et facile en le comparant avec d'autres tests, ils ont pu étudier et évaluer le niveau de toxicité dans l'environnement.

#### **I.4.11. Prédiction in silico de la génotoxicité.**

Les études de la génotoxicité (selon la directive ICH M3 (R2), ICH S2 (R1) dans la production pharmaceutique sont une étape cruciale et déterminante. En testant le médicament/ingrédient actif et déterminant leurs impuretés. Parmi les tests utilisés : le test d'Ames. Lorsque les informations sont très limitées l'application des outils in silico d'évaluation de la génotoxicité entre en jeu selon l'auteur **Wichard (2017)**, Le principal moteur dans ce domaine est la récente directive ICH M7 «Évaluation et le contrôle des impuretés de l'ADN (mutagènes) dans les produits pharmaceutiques pour limiter le risque cancérigène potentiel ». Ces outils in silico pourraient être divisés en systèmes statistiques basés sur le système de prédiction QSAR.

Deux méthodologies de prédiction (Q) SAR qui se complètent doivent être appliquées : Une méthodologie devrait être basée sur des règles d'experts, et la deuxième méthodologie devrait être basée sur des statistiques. Il existe plusieurs systèmes experts pour la prédiction in silico de la génotoxicité. L'un des premiers et des plus célèbres est le logiciel commercial DEREK, pour les modèles statistiques QSAR qui identifient les relations entre la structure chimique et l'activité biologique, les exemples pour les systèmes commerciaux sont Leadscape Genetic Toxicity Suite, Multicase.

La première étape de l'évaluation des produits chimiques en ce qui concerne leur potentiel génotoxique est une base de données et une recherche documentaire sur la cancérigénicité et la mutagénicité bactérienne l'un de celle-ci : base de données NTP, TOXNET, IARC CPDB.

La directive ICH M7 requiert deux méthodologies complémentaires deux systèmes pour les évaluations de la génotoxicité. Dont l'application repose sur l'hypothèse qu'une plus grande sensibilité dans la détection des mutagènes potentiels sera obtenue si une prédiction positive de l'une ou l'autre méthodologie conduit à une conclusion positive. En conclusion dans le cadre d'évaluation de Potentiel réactif de l'ADN et ses impuretés, l'utilisation des modèles in silico comme approche alternative aux tests expérimentaux, et des prédictions informatisées, Ceci est

d'une grande pertinence dans le processus de développement de médicaments et il est en développement des solutions intégrées pour mieux aider l'utilisateur et combiner les résultats dans une soumission réglementaire.

#### **I.4.12. Vecteurs viraux: la voie vers la réduction de la génotoxicité.**

**David et al, (2016)** ont traité dans leur article le sujet des vecteurs viraux, dans la thérapie génique. Les virus le plus utilisés sont : adénovirus (AV), virus adéno-associé (AAV), rétrovirus ( $\gamma$ -RV) et lentivirus (LV). Cependant les traitements à base de ceux-ci, manifestent des problèmes de sécurité, et des phénomènes génotoxiques appelant génotoxicité à médiation vectorielle.

Pour les approches *ex vivo* ou bien *in vivo*. Cette mutagénèse insertionnelle est observée selon plusieurs niveaux par exemple : au niveau 5' de promoteur, au niveau des unités LTR, au niveau des séquences régulatrices d'épissages, 3' UTR, et peut affecter plusieurs gènes. Elle se manifeste par le gain/perte de fonction, activation d'un proto-oncogène, insertion d'un promoteur, activation d'un promoteur, inhibition de la transcription d'un gène (inactivation d'un gène), ou bien l'inhibition épigénétique d'un gène (par la méthylation d'ADN ou d'histone), ARNm tronqué.

Plusieurs facteurs influencent la génotoxicité, ils se divisent en facteur viral, et facteur non viral, parmi les facteurs viraux il y'en a : Conception de vecteur, Site d'intégration / Profil d'insertion. Pour les facteurs non viraux : Transgène ou le produit de l'insertion, la cellule cible, l'épigénétique de l'environnement cellulaire, l'âge de récepteur, l'état de le degré de la maladie.

Selon les auteurs, il ya des stratégies de préventions de cette toxicité. Comme :

Indications de problématiques et résultats des essais cliniques par vecteurs viraux, apprentissage et développement des vecteurs avec moins de risque de mutagenèse. Pour la conception de vecteur, il ya les vecteurs SIN (LV et  $\gamma$ -RV) manque d'activité de promoteur et d'amplificateur viral dans leur 3' LTR, limitant les effets du promoteur viral LTR sur les gènes, et réduisant la génération de transcrits de variant d'épissage de gènes autour des sites d'intégration de ceux-ci. Isolateurs de chromatine : Il y en a deux

Classes d'isolateurs de chromatine, d'isolateurs bloquant les amplificateurs et d'isolateurs barrières, en général ils bloquent l'interaction entre un vecteur d'intégration et le génome de la cellule cible indépendamment du transgène (vecteur), des éléments régulateurs ou du virus. Et les signaux de polyadénylation, promoteur spécifique au tissu, contrôle des microARN des vecteurs, la dose vectorielle, Intégration de vecteurs sans promoteur.

Des stratégies actuelles de test de génotoxicité reposent en grande partie sur la détection des effets sur l'ADN (dommages ou mutation) après exposition aux vecteurs viraux, en prenant en considération la période d'incubation de chaque vecteur viral. L'un de ces stratégies est l'application de la technologie CRISPR-Cas9.

# **Chapitre II : Matériel et Méthodes**

## Chapitre II : Matériel et Méthodes

Dans notre étude pour l'évaluation de l'exposition et l'effet génotoxique des xénobiotiques, nous allons entamer des tests *in vivo* de micronoyau et *in vitro* sur culture cellulaire le test de comètes dans le but de criblage d'agents clastogènes plus précisément des médicaments de traitement de cancer, les anticancéreux et évaluation de leurs effets et risques sur les tissus et les organes, notre étude était composée de 2 tests l'un des deux et le test de micronoyau *in vivo* sur des souris c'est le test de micronoyau érythrocytaire de mammifères/ de la moelle osseuses.

Nous allons étudier l'impact de cette stratégie sur la fréquence de micronoyaux induits par le traitement anticancéreux.

Dans cette étude, nous avons choisi de travailler sur les deux tests les plus fréquents dans l'évaluation des xénobiotiques, il s'agit du test de micronoyau *in vivo* et son complémentaire le test *in vitro* de comète.

Ces deux tests sont réalisés au niveau du laboratoire de LNCPP à l'institut Pasteur, en raison de la pandémie COVID19, nous n'avons pas pu réaliser cette étude mais nous avons discuté les résultats des articles scientifiques similaires à notre problématique.

### II.1. Matériel

#### II.1.1 Matériel biologique

L'étude est réalisée selon deux parties; *in vivo* sur des souris de laboratoire adultes et saines, *in vitro* sur des cultures cellulaires hématopoïétiques érythrocytaires.

#### II.1.2. Matériel non biologique

Le test de micronoyau nécessite le matériel présenté dans le tableau suivant :

**Tableau 4:** matériel non-biologique nécessaire pour la réalisation de test de micronoyau

Étapes	Équipement	Réactifs	Consommables
<b>Collection et traitement de la moelle osseuse</b>	- Centrifugeuse - Tube Eppendorf	- FBS(Sérum foetal bovin) ou HBSS (Solution saline équilibrée de Hanks (pH 7,4))	- Ciseaux pointus - Seringue de 5 mL. - Boîte de pétri
<b>Préparation des lames et fixation</b>	- Lames	- FBS - Méthanol aqueux à 70%	
<b>Coloration au Giemsa mai – Grunwald– (MGG)</b>	- Lames - Microscope optique	- Solution mère à 1% de May – Grunwald - May – Grunwald et du tampon phosphate (1: 1 v / v)	

	- Lamelle	- Colorant Giemsa et PBS - Acétone et du xylène - Support de montage DPX	
<b>Notation des lames et analyses des images</b>	- Microscope optique		

Le test de comète nécessite le matériel présenté dans le tableau suivant :

**Tableau 5** : matériel non-biologique nécessaire pour la réalisation de test de comète

Étapes	Équipement	Réactifs	Consommables
Préparation d'agarose	- Bain-marie	- Agarose à basse température de gélification - DMSO et solution de lyse alcaline	- Bécher ou une bouteille en verre
Pré-préparation des lames	- Stylo à pointe en diamant Lames de microscope à extrémité givrée	Agarose	
Préparation des échantillons	- Hémocytomètre ou compteur des particules électroniques pour l'ajustement des numéros de cellule.	- Solution saline tamponnée au phosphate (sans $Ca^{2+}$ et $Mg^{2+}$ ) - Agarose à basse température	- Crayon - Tubes jetables en plastique
Lyse et électrophorèse Alcaline	- Récipient en verre couverts pour la lyse, la coloration et la conservation des lames. - Chambre d'électrophorèse horizontale sur gel avec alimentation - Dispositif bubble leveling	- Solution de lyse A1 - Solution de rinçage A2 - Agarose	
Lyse et électrophorèse en condition neutre	- Incubateur - Chambre d'électrophorèse	- Solution de lyse N1 - Tampon de rinçage N2 - Agarose	
Coloration des lames		- Colorant ADN fluorescent: 10 $\mu g / ml$ d'iodure de propidium - Solution mère 5 M de NaOH. - Solution antifade - Ethanol	- Gants de protection
Analyses des lames	- Microscope à épifluorescence avec objectif 25 $\times$ Filtres ; ampoule de mercure de 100 watts; réflecteur de 580 nm ; un filtre passe-bande 590 - Caméra à dispositif à couplage de charge - Logiciel d'analyse d'ordinateurs et de comètes		

## II.2 Méthodes

### II.2.1 Le test de micronoyau

#### II.2.1.1. Les conditions de logement et d'alimentation des animaux :

1. Les souris doivent être hébergées dans des cages au sol solide et en petits groupes de même sexe, avec conditions environnementales appropriées.

2. La température dans la salle doit être 22 C° ( $\pm 3$  C°) et l'humidité relative devrait être de 50 à 60%, elle devrait être d'au moins 40% et de préférence ne dépasse pas 70% que pendant le nettoyage de la chambre.

3. L'éclairage doit être artificiel, de 12 h de lumière et 12 h d'obscurité.

4. Les rations alimentaires des animaux de laboratoire doivent être utilisées avec un approvisionnement optimal d'eau.

#### II.2.1.2 Répartition des groupes et numérotation

Souris adultes jeunes, âgées de 6 à 10 semaines, sont distribués en groupes de contrôle et de traitement :

- **Groupe I** - Contrôle (traité au solvant).
- **Groupe II** - Faible dose (composé d'essai).
- **Groupe III** - Dose moyenne (composé d'essai).
- **Groupe IV** - Dose élevée (composé d'essai).
- **Groupe V** - Contrôle positif (traité au cyclophosphamide).

La variation du poids chez les souris doit être minimale et ne dépasse pas 20% du poids moyen.

Les cages sont disposées de manière à ce que les effets du placement de la cage soient minimisés (par ex. par le contrôle positif et la substance d'essai).

Les cages sont correctement étiquetées.

Les souris doivent être acclimatées aux conditions de laboratoire pour au moins 5 jours avant l'expérience, pour laisser le temps aux animaux pour se stabiliser dans un nouvel environnement et minimiser le stress causé pendant le transport. (Kumar et al, 2019).

#### II.2.1.3. Sélection de solvant (véhicule) et préparation d'échantillon de test

1. Le solvant doit être compatible avec le produit chimique à étudier. Habituellement, eau, solution saline physiologique, carboxyméthylcellulose, une solution de sel de sodium peut être utilisée.

Les produits chimiques solides doivent être dissous ou mis en suspension dans un solvant approprié avant de les utiliser.

Les produits chimiques liquides peuvent être utilisés directement ou dilués dans des solvants appropriés avant le dosage.

Les différentes doses du produit chimique à étudier doivent être sélectionnées simultanément avec un solvant de contrôle et une dose de contrôle positif.

Le produit chimique à étudier, et le témoin positif est dissous dans un solvant approprié à un moment et à une concentration de dosage prédéterminé. (Kumar et al, 2019).

#### II.2.1.4. Le volume d'échantillon et le mode d'administration

1. Administrer la dose correcte du produit d'essai à chaque groupe d'animaux par une voie prédéterminée



La voie d'administration comprend la voie orale ou l'injection intrapéritonéale, mais d'autres voies sont autorisées pour des raisons pratiques. Pour l'exposition par inhalation, les produits chimiques d'essai peuvent être administrés sous forme de gaz, vapeur ou aérosol solide / liquide.

Le volume maximal qui peut être administré par la voie orale à la fois ne doit pas dépasser 2% du poids corporel (pc).

Pendant l'administration de la dose, la solution d'essai doit être constamment agitée.

Une dose unique de contrôle positif (cyclophosphamide)

20 mg / kg pc doit être administré par voie intrapéritonéale (IP) aux souris.

#### II.2.1.5. Durée de traitement et le temps d'échantillonnage

Le test peut être effectué de trois manières comme indiqué dans OCDE TG-474. **(Kumar et al, 2019).**

1. Si l'animal est exposé une fois au produit chimique d'essai, les échantillons de la moelle osseuse doivent être prélevés 24 h après le traitement, mais pas au-delà de 48 h après le traitement.

Si deux traitements sont utilisés à 24 h d'intervalle, les échantillons de la moelle osseuse doivent être prélevés une fois entre 18 et 24 h après le dernier traitement.

Si trois traitements ou plus sont utilisés à intervalles de 24 h, les échantillons de la moelle osseuse doivent être prélevés 24 h après le traitement final. **(Kumar et al, 2019).**

#### II.2.1.6. Collection et traitement de la moelle

1. La moelle osseuse (MO) est le tissu mou dans le noyau central de nombreux os. Pour l'isolement de MO, il faut d'abord sacrifier les souris par dislocation cervicale et disséquer les deux fémurs.

2. Nettoyer les fémurs puis couper les deux extrémités distales de l'os avec des ciseaux pointus pour débusquer la moelle osseuse.

3. Prélever 500 µL de FBS ou HBSS (pH 7,4) par une seringue de 5 mL.

4. Insérer l'aiguille dans la cavité osseuse et rincer la moelle dans un micro tube Eppendorf.

**(Kumar et al, 2019).**

5. Rincer les cavités osseuses deux fois avec 1,5 ml de FBS, jusqu'à ce que les os deviennent blancs.

6. Centrifuger la suspension cellulaire résultante de 250 g pendant 5 min.

7. Après centrifugation, jeter le surnageant et laver le culot deux fois avec 2 ml de FBS ou HBSS.

8. Ajouter à la suspension cellulaire finale environ 50 à 100 µL de FBS frais ou HBSS.

### II.2.1.7. Préparation et fixation des lames

1. Mélangez soigneusement le mélange de la moelle osseuse avec du FBS.
  2. Mettez 20  $\mu$ L de suspension de la moelle osseuse sur une lame sèche et propre.
  3. Étalez uniformément la goutte sur la lame pour former un mince frottis de cellules.
  4. Après avoir préparé un frottis uniforme, séchez les lames à l'air environ 2–3 h.
  5. Les cellules sont ensuite fixées dans du méthanol aqueux à 70% (v / v) pendant 3 à 5 min, ensuite les lames sont laissées à température ambiante pendant une nuit, de façon que les composants cellulaires sont conservés et fixés en une position bien définie.
- Le méthanol agit comme un fixateur et aussi comme solvant. Le fixateur permet aux cellules d'adhérer à la lame. (Kumar et al, 2019).

### II.2.1.8. Coloration au Giemsa-mai-Grunwald (MGG)

Les colorants May – Grunwald et Giemsa sont des colorants acides et basiques qui induisent différentes colorations lorsqu'ils sont appliqués sur les cellules.

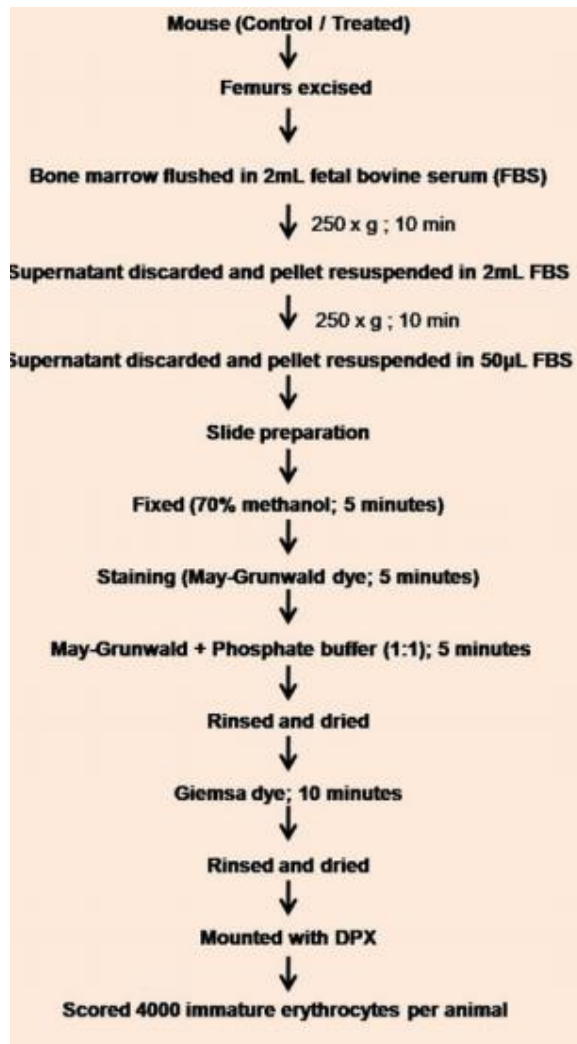
Le composant basique (c'est-à-dire le cytoplasme) est coloré par le colorant acide, et il est décrit comme éosinophile ou acidophile. Les composants acides (par exemple, noyau avec acide nucléique) prennent des nuances bleues à violettes, et ils sont appelés basophiles.

1. Colorez la lame avec une solution mère à 1% de May – Grunwald pour 5 min.
2. Colorez la lame avec du May – Grunwald et du tampon phosphate (v / v) pendant 5 min.
3. Rincez la lame avec de l'eau distillée et sécher à l'air.
4. Puis colorez la lame avec 5% de Giemsa dans du PBS pendant 10 min.
5. Rincez la lame à l'eau distillée et sécher.
6. Traitez les lames avec de l'acétone et du xylène (v/v) pendant 2 min.
7. montez la lamelle directement sur la lame en utilisant le support de montage DPX. (Kumar et al, 2019).
8. Laisser les lames pendant une nuit avant leur analyse.
9. Observez les lames et analysez sous le microscope optique.

Une représentation schématique du test micronoyau in vivo chez les cellules de la moelle osseuses de souris (Figure 5). (Kumar et al, 2019).

### II.2.1.9. Notation des lames et analyse des images

1. Les érythrocytes immatures ou polychromatiques (PCE) se colorent en bleu-gris, tandis que les érythrocytes matures ou normochromatiques (NCE) sont colorées en orange, par le composant éosine de Giemsa (**figure 7**). **Kumar et al, 2019**).
2. Les noyaux et les micronoyaux se colorent en rouge-violet.

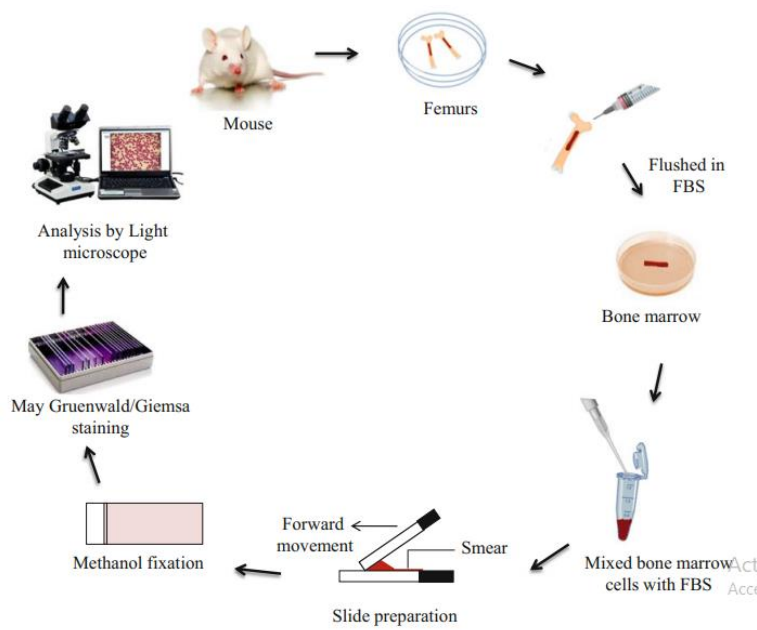


**Figure 5** : un schéma présentatif de MN test sur les cellules de la moelle osseuses des souris. **Kumar et al, 2019**).

3. La notation est effectuée avec un minimum de 4000 érythrocytes immatures (PCE) par animal, sous le microscope optique, pour le calcul de la fréquence des micronoyaux (MNI) (**Figure 6**).
4. En outre, un total d'environ 500 érythrocytes des deux types PCE et NCE doivent être comptés pour chaque animal afin de déterminer le rapport PCE-NCE. **Kumar et al, 2019**).

### II.2.1.10. Une analyse statistique

Toutes les valeurs obtenues à partir des expériences sont effectuées par les analyses statistiques unidirectionnelles de la variance (ANOVA) avec les tests de comparaison multiples post hoc pour déterminer la signification par rapport au groupe témoin. Et  $p < 0,05$  doit être considéré comme significatif. (**Kumar et al, 2019**).



**Figure 6** : Présentation du test micronoyau dans les érythrocytes de la moelle osseuse de souris. **Kumar et al, 2019).**

## II.2.2. Le test de comète :

### II.2.2.1. Préparation d'agarose :

- Préparer 1% d'agarose à basse température de gélification en mélangeant de l'agarose en poudre avec de l'eau distillée dans un bécher ou une bouteille en verre.
- Placer le bécher dans le bain-marie à 100 °C pendant plusieurs minutes. Alternativement et soigneusement placer la bouteille à faible puissance dans un four à micro-onde pendant des intervalles de temps très court (éviter l'ébullition vigoureuse de l'agarose et assurer que tout l'agarose est dissoute)
- Placer le bécher d'agarose dans un bain-marie à 40 °C. Si l'échantillon de cellules contient des globules rouges, ajouter 2% de DMSO à la solution d'agarose (et /ou de lyse alcaline) pour éviter les dommages causés par les espèces réactives de l'oxygène catalysées par le fer, qui peuvent détruire l'échantillon. **(Olive, 2006)**

### II.2.2.2. La pré-préparation des lames :

- Pour améliorer l'adhérence de l'agarose, marquez les extrémités des lames de microscope (sans poussière) à l'aide d'un stylo à pointe de diamant.
- Préparer des lames pré-enduites d'agarose en plongeant les lames dans l'agarose fondu à 1% et garder un côté propre. Il vaut mieux travailler dans un environnement à faible humidité pour assurer l'adhérence de l'agarose.
- Laisser l'agarose sécher à l'air en une couche mince. Les lames peuvent être préparées à l'avance et stockées dans un milieu déshydraté. **(Olive, 2006)**

### II.2.2.3. La préparation des échantillons :

- Préparer une suspension unicellulaire en utilisant la désagrégation enzymatique ou la dissociation mécanique. N'utiliser jamais de cellules fixes car l'ADN ne migrera pas. Conserver

les cellules dans un milieu glacé ou une solution saline tamponnée au phosphate pour minimiser l'agrégation cellulaire et inhiber la réparation de l'ADN. Inclure toujours un échantillon de cellules non traitées pour confirmer que les dommages de fond sont faibles. Un contrôle positif (par exemple, des cellules exposées à 20  $\mu$ M de peroxyde d'hydrogène fraîchement préparé ou 8 rayons X Gray (Gy) sur glace pour la version alcaline, et 75 Gy pour la version neutre) est utile lors de la première configuration de la méthode.

- À l'aide d'un hémocytomètre ou d'un compteur de particules, ajuster la densité cellulaire à environ  $2 \times 10^4$  cellules / ml dans une solution saline tamponnée au phosphate (sans les cations divalents).
- Étiqueter les lames sur l'extrémité givrée à l'aide d'un crayon et non d'un stylo.
- Mettre 0,4 ml de cellules dans un tube jetable en plastique de 5 ml.
- Ajouter 1,2 ml d'agarose à 1% à basse température de gélification à 40 °C.
- Mélanger et mettre rapidement 1,2 ml de suspension cellulaire sur la surface recouverte d'agarose d'une lame; éviter de produire des bulles d'air.
- Laisser l'agarose se gélifier pendant environ 2 min. Soyer exacte avec le temps et la température utilisés pour la gélification et assurer que l'agarose soit complètement prêt avant d'être immergé dans une solution de lyse. (Olive, 2006)

#### II.2.2.4. Lyse et électrophorèse

La lyse et l'électrophorèse peuvent être effectuées dans des conditions alcalines (option A) ou neutres (option B). Utiliser l'option A pour détecter la combinaison de cassures ADN simple brin, de cassures doubles brins et les sites labiles, et l'option B pour détecter seulement les cassures l'ADN double brin. (Olive, 2006)

##### II.2.2.4.1. Lyse alcaline et électrophorèse

Une fois l'agarose gélifié, immerger les lames dans un récipient couvert contenant une solution de lyse A

1. Manipuler les lames doucement.

**Note :** 1. Solution de lyse A1 : solution de lyse alcaline pour rupture d'ADN simple brin ; détection: NaCl 1,2 M, Na<sub>2</sub>EDTA 100 mM, lauryl sarcosinate de sodium 0,1%, 0,26 M NaOH (pH > 13); équilibrer à 4 °C. Préparation de solution doit être dans le jour de l'expérience.

Na<sub>2</sub>EDTA 0,5 M (pH 8,0): ajoutez 55,8 g Na<sub>2</sub>EDTA et 6,4 g NaOH à 270 ml de l'eau distillée (agiter pendant environ 2 h et ajuster le pH à 8,0 avec NaOH)

Lyse des échantillons pendant une nuit (18 à 20 h) à 4 °C dans l'obscurité. Si le temps est limité, une procédure de lyse d'une heure peut également être utilisée, mais il donne une certaine diminution de la sensibilité (jusqu'à deux fois) et de la reproductibilité.

Après 1 h ou une nuit de lyse, retirer soigneusement les lames et les plonger dans la solution de rinçage A2 à température ambiante (18 à 25 °C) pour 20 min. Répétez deux fois cet opération pour assurer l'élimination du sel et du détergent. Veiller à ne pas permettre à l'ADN de se rénaturer même brièvement (c'est-à-dire en abaissant le pH en dessous de 12,3) jusqu'après l'électrophorèse, car cela entraîne un enchevêtrement d'ADN et réduire la migration.

**Note :** solution de rinçage A2 : solution de rinçage et d'électrophorèse alcaline: 0,03 M NaOH, 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA (pH ~12,3)

Après ces trois rinçages, immerger les lames dans une solution A2 au niveau d'une chambre d'électrophorèse. La chambre doit être remplie avec un volume constant de tampon qui est d'environ 1 à 2 mm au-dessus du sommet de l'agarose. Assurer que la chambre soit à un niveau précis à l'aide d'un dispositif bubble leveling. Ou bien effectuer une électrophorèse dans la solution A2 pendant 25 min à une tension de 0,6 V / cm. Le courant doit être d'environ 40 mA si vous utilisez 20 V. La distance en centimètres est mesurée entre les électrodes négative et positive dans la chambre d'électrophorèse. (**Olive, 2006**)

#### II.2.2.4.2. Lyse neutre et électrophorèse

Une fois l'agarose gélifié, immerger doucement les lames dans une boîte couverte contenant la solution de lyse N1 à 4 °C et éviter de bouger le plat contenant les lames.

**Note : solution de lyse N1** : solution de lyse neutre pour rupture double brin ; détection: 2% de sarkosyl, 0,5 M Na2EDTA, 0,5 mg / ml de protéinase K (pH 8,0); équilibrer à 4 °C.

Placer le plat dans un incubateur à 37 °C pendant une nuit (18 à 20 h) dans l'obscurité. Bien qu'une plus grande sensibilité soit obtenue en utilisant une température de lyse de 50 °C, la température plus basse réduit les dommages thermolabiles.

Après une nuit de lyse, retirer les lames et les plonger dans un tampon de rinçage N2 à température ambiante pendant 30 min (répéter le rinçage deux fois).

**Note : tampon de rinçage N2** : rinçage neutre et électrophorèse: Tampon Tris 90 mM, acide borique 90 mM, Na2EDTA 2 mM (pH 8,5)

Immerger les lames dans une solution fraîche de N2 au niveau d'une chambre d'électrophorèse qui a été nivelée et remplie d'un volume de tampon environ 1 à 2 mm au-dessus de la surface supérieure de l'agarose. Ou bien effectuer une électrophorèse dans la solution N2 pendant 25 min à 0,6 V / cm. Le courant est généralement de 7 mA lors de l'utilisation de 20 V. (**Olive, 2006**)

#### II.2.2.5. Coloration des lames

Retirer les lames de la chambre d'électrophorèse et rincer et neutraliser dans 400 ml d'eau distillée.

Placer les lames dans une solution de coloration contenant 2,5 µg/ml d'iodure de propidium dans de l'eau distillée pendant 20 min. Alternativement, ajouter 100 µl de la solution mère de 10 µg/ml d'iodure de propidium directement sur la lame et incubé pendant 20 min.

Rincer les lames avec 400 ml d'eau distillée pour éliminer l'excès de colorant.

**Note** : Les lames peuvent être stockées dans des boîtes humides et hermétiques dans la chambre froide (à 4 °C). En cas de stockage pendant plus de 2–3 jours, immerger les lames dans l'éthanol et les sécher. Les lames séchées peuvent être conservées pendant plusieurs mois, mais avant analyse, réhydrater en ajoutant une fine couche d'agarose pour réduire la fluorescence de fond et recouvrir avec de l'iodure de propidium. Si l'intensité de l'image de comète semble diminuer lors de la visualisation avec le microscope à fluorescence, essayer d'utiliser une solution antifade.

### II.2.2.6. Analyse des lames

Analyser les cellules en examinant au moins 50 images de comètes de chaque diapositive. En évitant d'analyser les doublets ou les comètes sur des bords des lames.

Si deux populations ou plus sont présentes ou si l'hétérogénéité de l'ADN est élevée, de préférence plusieurs images doivent être notées (jusqu'à 1000 marquée à partir d'une lame). Lorsque des informations sur la teneur en ADN sont requises, assurer que l'image ne soit pas «saturée», c'est-à-dire que l'intensité de fluorescence dans n'importe quelle partie de l'image de comète numérisée ne dépasse pas le maximum de l'intensité numérique (par exemple, si 256 canaux sont disponibles, les données doivent être collectées entre 0 et 254). Cela peut être accompli facilement par un code d'image de comète colorée pour définir des plages d'intensité spécifiques, puis ajuster l'intensité lumineuse pour éviter l'intensité des couleurs attribuée aux canaux au-dessus de 254. Des méthodes techniques pour augmenter la dynamique de l'intensité ont également été développées par certaines sociétés éditeurs des logiciels d'essais de comètes.

À l'aide d'un logiciel d'analyse d'images, analysez les images des comètes individuelles pour plusieurs caractéristiques, y compris l'intensité totale (contenu en ADN), longueur de la queue, pourcentage d'ADN dans la queue et moment de la queue. Alternativement, la notation visuelle peut être utilisée en particulier lorsque la population est homogène et non cyclable, de grandes différences sont attendues et des contrôles adéquats ont été inclus (exemple ; des lames codées et des intensités de réponse clairement définies). L'utilisation de cinq classes de dommages introduites par Collins a été largement adoptée. Des expériences répétées en triple sont recommandées.

Appliquer une analyse statistique appropriée en utilisant des moyennes ou des médianes en fonction de la répartition de la population. Seuils d'erreur généralement représentent la variabilité entre les expériences, et non la variabilité intra-lame pour un paramètre spécifique.

**Note :** Microscope à épifluorescence avec objectif 25 × (objectif avec une longue distance de travail est le meilleur) et ensemble de filtres pour l'excitation de la lumière verte si on utilise de l'iodure de propidium pour colorer l'ADN (excitation de 546 nm à partir d'une ampoule de mercure de 100 watts; émission surveillée à l'aide d'un réflecteur de 580 nm et d'un filtre passe-bande 590) (**Olive, 2006**)

#### **Remarque :**

- Préparation des lames, préparation des échantillons cellulaires, inclusion d'agarose pour 10 échantillons: 1 h.
- Lyse alcaline ou neutre: généralement de 18 à 20 h, mais aussi courte que 1 h.
- Rinçage après lyse: 1 h.
- Electrophorèse en conditions alcalines ou neutres: 25 min.
- Coloration ADN: 20 min.
- Capture et analyse d'images de comètes: 1 h pour environ 600 images

# **Chapitre III :**

# **Résultats et Discussion**



## Chapitre III : Résultats et Discussion

### III.1. Résultats :

#### II.1.1. Résultat du test de micronoyau :

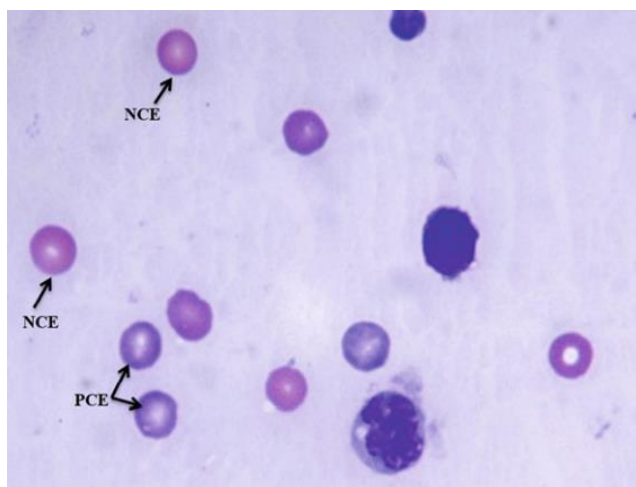
##### II.1.1.1. Les résultats de test de micronoyau des érythrocytes des souris :

Une augmentation de la fréquence des PCE micronucléés (MN PCEs), est une mesure des dommages chromosomiques structuraux, ou bien le cas des chromosomes en retard dans les cellules érythrocytes de la moelle osseuse.

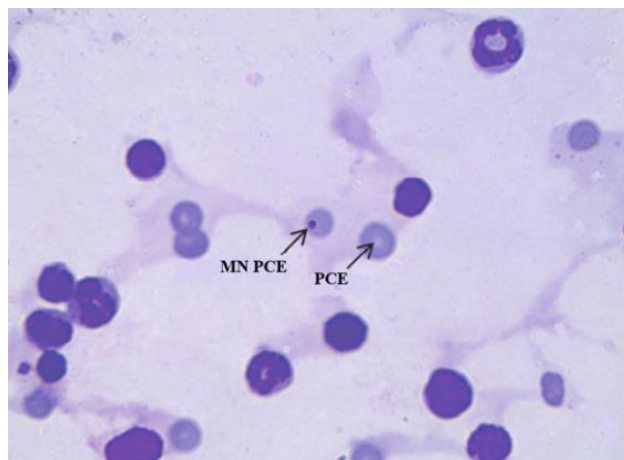
L'augmentation de l'incidence de la formation de micronoyau, sert de bon biomarqueur de dommages génotoxiques soit par des lésions directs d'ADN (mécanisme clastogène) ou suite à une interaction secondaire avec l'appareil de réplication de l'ADN (mécanisme aneugénique indirect).

La mesure du rapport PCE / NCE peut également fournir des informations utiles sur la cytotoxicité des agents/molécules testés.

La diminution du rapport PCE / NCE dans ce test indique que l'agent possède un effet cytotoxique sur le cycle mitotique ou bien un effet destructif sur des cellules en division dans le système érythropoïétine (**Kumar et al, 2019**).



**Figure 7 :** Frottis de moelle osseuse de souris pour l'analyse du micronoyau coloré avec Mai – Grunwald et Giemsa (1000: grossissement). NCE Normochromatique érythrocyte, PCE érythrocyte polychromatique. (**Kumar et al, 2019**).



**Figure 8 :** Frottis de moelle osseuse de souris pour l'analyse du micronoyau coloré avec Mai – Grunwald et Giemsa (1000: grossissement). MNPCE micronucléé érythrocyte polychromatique. (Kumar et al, 2019).

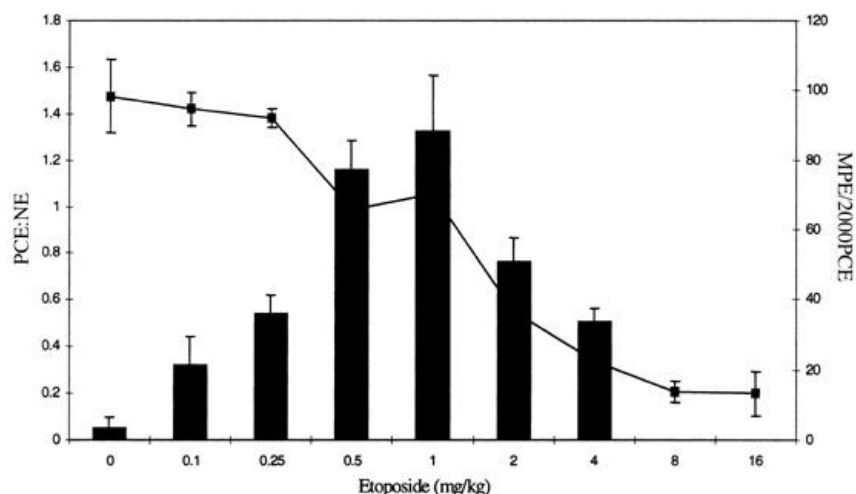
### III.1.1.2. Sensibilité du test du micronoyau de la moelle osseuse à l'étoposide :

L'étoposide est un agent génotoxique utilisé dans le traitement du cancer. En effet, l'étoposide est utilisé lors de la chimiothérapie est provoqué une inhibition dose-dépendante de la fonction de la moelle osseuse. Cela se manifeste dans le compartiment érythrocytaire comme un blocage de la production d'érythrocytes polychromatiques et donc une diminution du rapport PCE: NE (figure 9). (Turner et al, 2000)

A la fin du test BMMN, le rapport PCE: NE > 1 indique qu'un niveau de toxicité supérieur auquel la dépendance à la dose de l'induction du phénomène de micronoyau, est perdue/n'est pas nécessaire en raison de l'impact de la toxicité sur la production d'érythrocytes polychromatiques.

Lors de l'administration de ce médicament par voie intrapéritonéale (i.p), un rapport PCE: NE > 1 a été enregistré à des doses comprises entre 0,5 et 1 mg/kg. Il est relatif avec l'augmentation observée de la fréquence des MPE à des doses d'étoposide allant jusqu'à 1 mg/kg. Il est noté que 1 mg/kg a été sélectionné comme dose de référence pour l'induction du micronoyau dans des études ultérieures impliquant l'administration i.p d'étoposide.

**Figure 9** présente : La fréquence du micronoyau (barres) et le rapport des érythrocytes polychromatiques à normochromatiques (PCE: NE, lignée) dans la moelle osseuse de souris mâles B6D2F1 traitées avec une augmentation i.p. doses d'étoposide (n = 5). Le nombre de MPE parmi 2000 PCE et le rapport PCE: NE parmi 1000 cellules ont été comptés. Les résultats représentent les moyennes et l'erreur standard des données individuelles sur les animaux. Ces données ont été reproduites dans une seconde expérience utilisant le même nombre de souris et le même schéma posologique (données non présentées). (Turner et al, 2000)

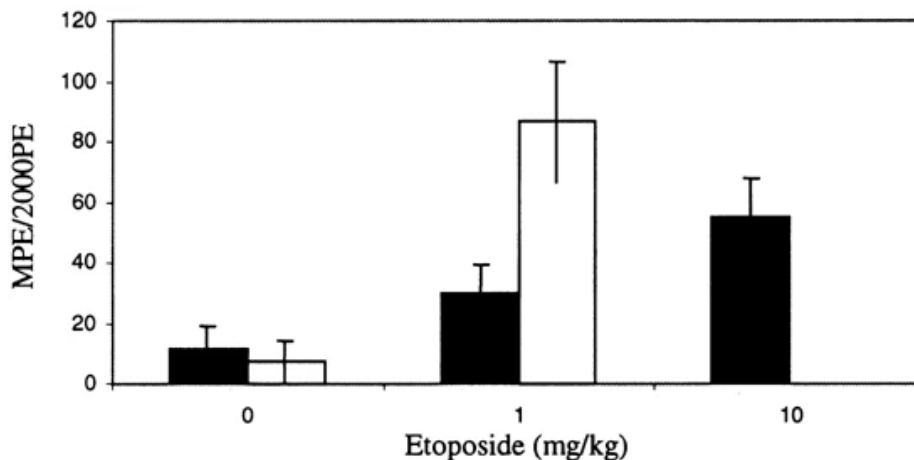


**Figure 9:** Détermination de l'effet de la voie d'administration sur la formation de micronoyaux induite par l'étoposide (Turner et al, 2000).

La voie d'administration de l'étoposide possède un grand effet sur la fréquence d'induction du micronoyau. 1 mg/kg d'étoposide administré par voie i.p. a produit une forte réponse et celle-ci montre un niveau compatible avec ceux décrits précédemment (figure 9). L'administration orale (p.o.) de 1 mg/kg d'étoposide a donné une diminution du nombre de micronoyaux observés ( $P < 0,001$ ) par rapport à la même dose administrée par voie i.p.

Cette différence n'est pas expliquée par la toxicité, car le rapport PCE: NE dans les deux expériences de différentes voies reste supérieur à 1 (tableau 6).

À une dose plus élevée (10 mg/kg), l'administration i.p d'étoposide a entraîné une grande toxicité et qui a empêché l'analyse de la fréquence du MPE. Cependant, suite à l'administration orale de 10 mg/kg d'étoposide, il y a eu une augmentation significative de la fréquence des MPE ( $P < 0,01$ ) par rapport à la dose de 1 mg/kg p.o. dose. (Turner et al, 2000)



**Figure 10:** Fréquence des MPE dans la moelle osseuse des souris 24 h après le traitement (avec les doses indiquées d'étoposide par voie i.p. (barres claires) et p.o. (barres sombres) ). (Turner et al, 2000)

**Tableau 6:** la ration de PCE :NE dans les échantillons des cellules de la moelle osseuse des souris 24h après l'administration des doses indiquées d'étoposide. (Turner et al, 2000)

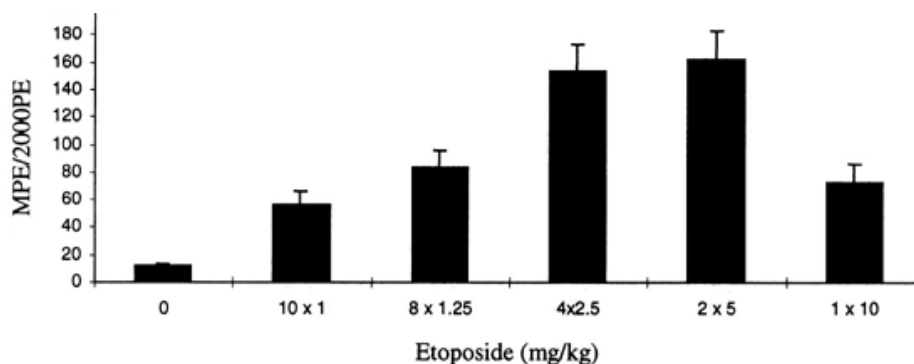
Effect of route of administration (Figure 3)			Effect of fractionated schedule (Figure 4)		Mechanism of the schedule effect (Figure 5)		Influence of MDR 1 overexpression (Figure 6)		
Etoposide (mg/kg)	Route of administration	Average PCE:NE $\pm$ s.d.	Schedule of etoposide (mg/kg)	Average PCE:NE $\pm$ s.d.	Schedule of etoposide (mg/kg)	Average PCE:NE $\pm$ s.d.	Transduced gene	Etoposide (mg/kg)	Average PCE:NE $\pm$ s.d.
0	i.p.	1.41 $\pm$ 0.17	0	1.41 $\pm$ 0.22	0	1.41 $\pm$ 0.23	Mock	0	1.43 $\pm$ 0.21
	p.p.	1.34 $\pm$ 0.25	10 $\times$ 10	1.36 $\pm$ 0.13	1 $\times$ 2.5	1.19 $\pm$ 0.11	MDR1	0	1.45 $\pm$ 0.22
1	i.p.	1.06 $\pm$ 0.17	8 $\times$ 1.25	1.35 $\pm$ 0.11	2 $\times$ 2.5	1.14 $\pm$ 0.09	Mock	1	1.41 $\pm$ 0.14
	p.o.	1.43 $\pm$ 0.12	4 $\times$ 2.5	1.39 $\pm$ 0.14	3 $\times$ 2.5	1.12 $\pm$ 0.14	MDR1	1	1.43 $\pm$ 0.20
10	i.p.	0.21 $\pm$ 0.04	2 $\times$ 5	0.33 $\pm$ 0.13	4 $\times$ 2.5	1.13 $\pm$ 0.11			
	p.o.	1.30 $\pm$ 0.15	1 $\times$ 10	1.05 $\pm$ 0.12					

Détermination de l'effet de différentes fractions sur la formation du micronoyau induite par l'étoposide.

Pour déterminer si le dosage du micronoyau peut faire la distinction entre les différents schémas d'étoposide, les animaux ont reçu le médicament à une dose orale maximale de 10 mg/kg en différentes fractions quotidiennes (**figure 11**). L'administration d'une dose unique de 10 mg/kg dans cette expérience a donné une fréquence de MPE comparable à celle démontrée à la figure précédente. Cependant, le fractionnement de la dose à 2  $\times$  5 mg/kg et 4  $\times$  2,5 mg/kg a conduit à une (>double) augmentation ( $P < 0,01$ ) de la fréquence de MPE mesurée 24 h après l'administration de la dose finale d'étoposide.

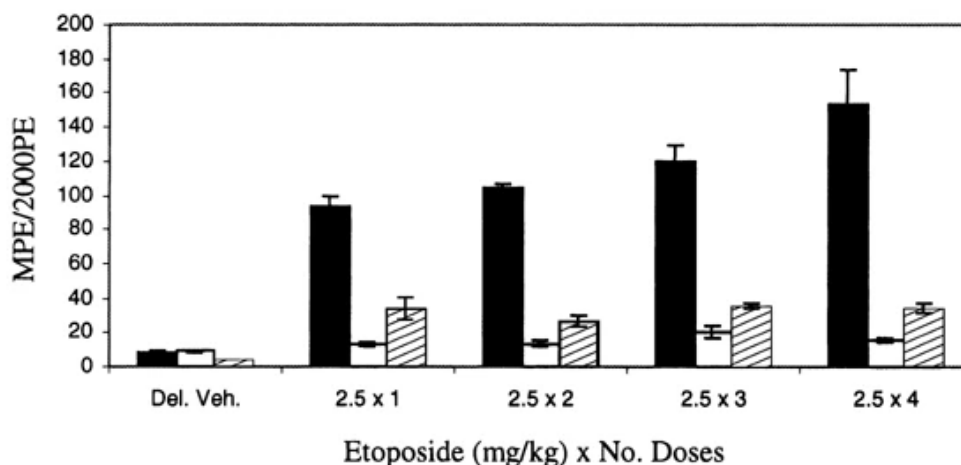
Un fractionnement secondaire de la dose n'a montré aucune augmentation significative du MPE par rapport à une dose unique de 10 mg/kg. Cependant, le nombre de MPE observé 24 h après la dernière administration de 10  $\times$  1 mg/kg d'étoposide était significativement plus élevé ( $P < 0,05$ ) que celui observé après une dose unique de 1 mg/kg (**Figure 10**).

Les explications possibles de ce résultat pourraient inclure la persistance du MPE dans la moelle osseuse au cours du temps de l'expérience ou un événement d'amorçage qui conduit à une sensibilité accrue aux doses ultérieures de médicament. Pour essayer de comprendre ces deux possibilités, ils ont déterminé si le MPE s'accumulait dans la moelle osseuse ou le sang périphérique à des moments en fraction différentes de 4  $\times$  2,5 mg/kg, 48 h après la dernière exposition à l'étoposide. (Turner et al, 2000)

**Figure 11:** La fréquence des MPE dans la moelle osseuse des souris 24 h après l'administration p.o de la dose finale d'étoposide. (Turner et al, 2000)

L'effet du traitement des souris avec 1, 2, 3 ou 4 doses consécutives de 2,5 mg/kg d'étoposide est illustré sur la **figure 12**. Avec chaque exposition en série, il y avait une augmentation de la fréquence MPE 24h après le traitement ( $r=0,79$ ,  $P<0,001$ ) mais les différences entre les traitements consécutifs ne soient pas statistiquement significatives ( $P<0,05$ ). Il n'y avait aucune preuve de persistance du MPE dans la moelle osseuse ni des réticulocytes micronucléés aient migré dans le sang périphérique 48 h après la dernière dose, en indiquant que l'augmentation de la fréquence des MPE observée avec le fractionnement de la dose n'était pas due à l'accumulation de ces cellules.

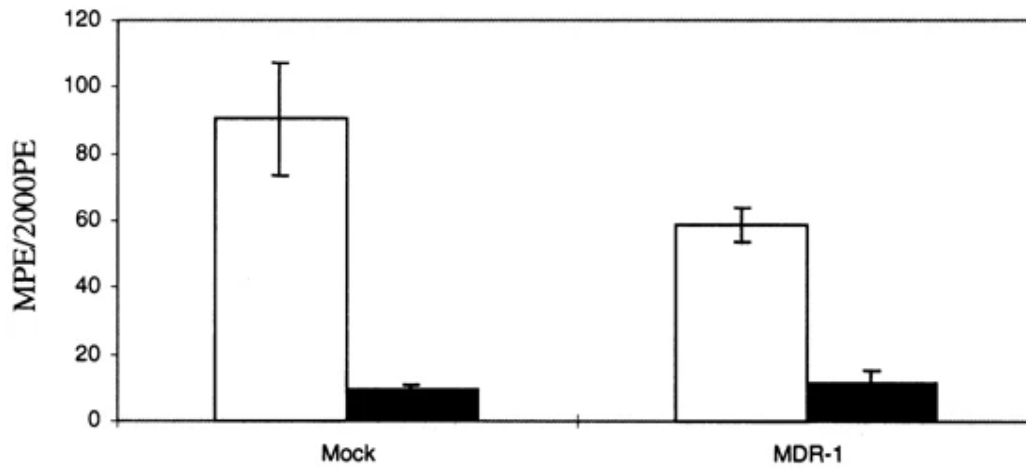
Le calcul du nombre total de MPE observé au cours de l'expérience a indiqué que non seulement le fractionnement de la dose entraînait une augmentation des dommages génotoxiques détectables 24 h après la dose finale d'étoposide administrée, mais aussi les dommages cumulatifs au cours de la période de dosage étaient plus de six fois supérieures, le résultat d'une dose unique de 10 mg / kg.



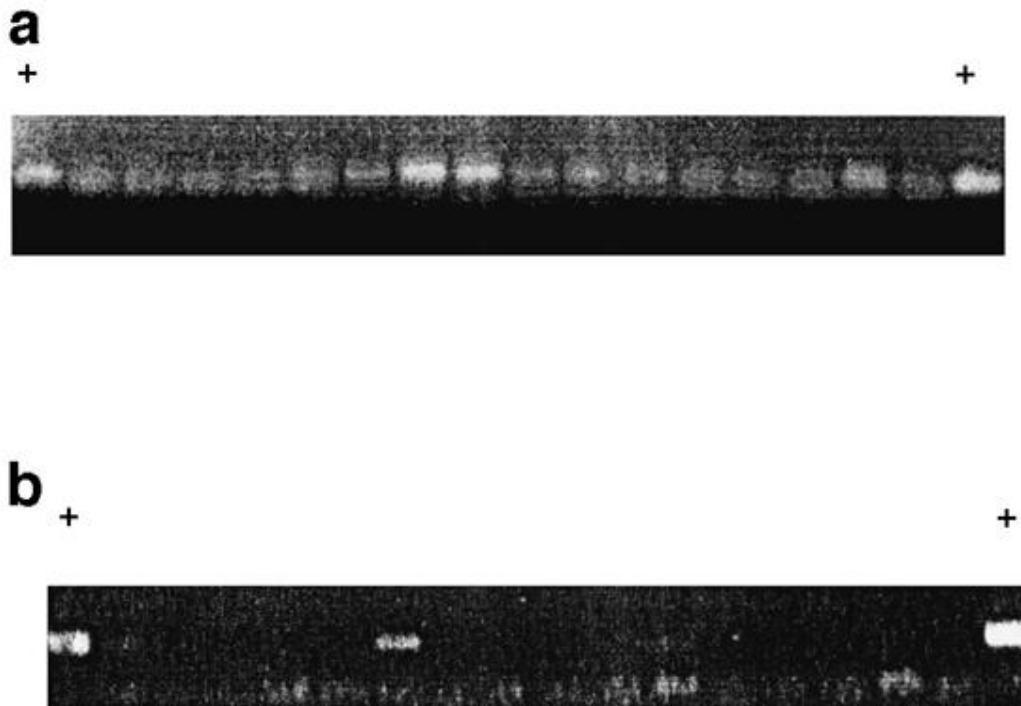
**Figure 12:** La fréquence des MPE dans la moelle osseuse des souris traitées avec les doses indiquées d'étoposide (24 (barres sombres) et 48 h (barres claires) après administration de la dose finale dans la moelle osseuse et 48 h après la dose finale dans le sang périphérique (barres hachurées) ). (Turner et al, 2000)

Influence de la surexpression de MDR1 (un gène porte la fonction de résistance aux médicaments) sur l'induction du micronoyau après une exposition à l'étoposide

Afin d'étudier l'influence de la surexpression de MDR1 sur l'induction du MPE par l'étoposide, la moelle osseuse de souris mâles a été transduite avec un rétrovirus contenant soit l'ADNc de MDR1 humain (expérimental) ou un ADNc témoin non pertinent (transduction simulée). Les cellules ont ensuite été transplantées dans des receveurs myéloablés femelles. L'analyse des cellules receveuses des formant des colonies a indiqué qu'une efficacité de transduction d'environ 18% (9/50 colonies positives pour la PCR) avait été obtenue, et le test du micronoyau ultérieur a démontré que la transduction MDR1 conférait une protection statistiquement significative ( $P<0,05$ ) contre l'induction du micronoyau par l'étoposide (figures 13et 14) (Turner et al, 2000).



**Figure 13:** Clastogénicité induite chez les cellules humaines MDR-1 et des cellules de souris simulées transduites après traitement et exposition à l'étoposide ((1 mg/kg, barres claires) ou au véhicule d'administration (barres sombres) administré par voie intrapéritonéale.). (Turner et al, 2000)

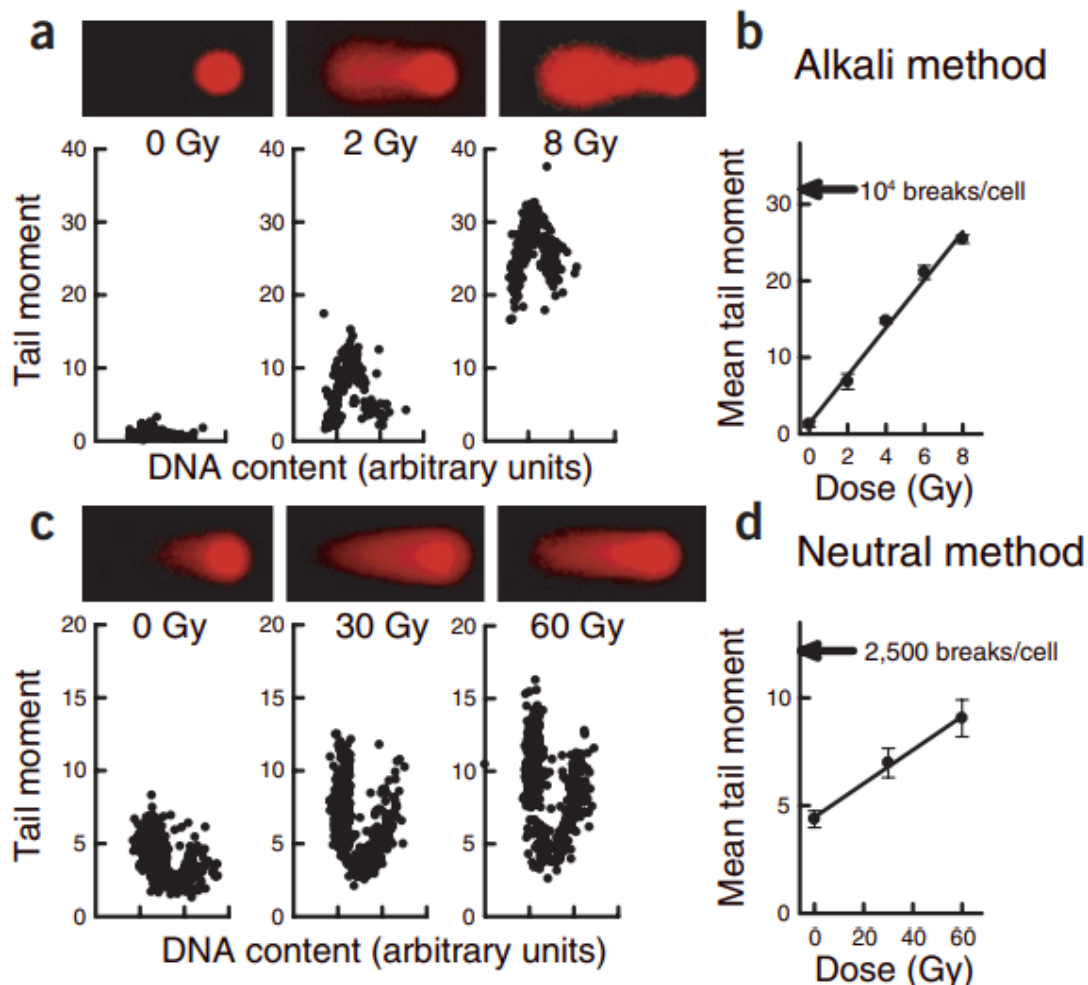


**Figure 14:** (a) PCR du chromosome Y de colonies isolées de GM-CFU obtenues à partir de moelle osseuse fémorale; + : contrôle positif. (b) PCR MDR-1 d'extraits de tampon K de colonies isolées de GM-CFU obtenues à partir de moelle osseuse fémorale; + : contrôle positif. (Turner et al, 2000)

### III.1.2. Les résultats de test des comètes :

#### III.1.2.1. Les résultats attendus :

Des relations dose-réponse linéaires doivent être observées pour les cellules exposées aux rayons X et examinés en utilisant la méthode de lyse alcaline (**Figure 15**). La teneur en ADN (fluorescence totale de l'image) doit rester relativement constante à mesure que le nombre de cassures d'ADN augmente (c'est-à-dire avec l'augmentation de la dose).



**Figure 15:** Relations dose-réponse typiques pour les cellules humaines exposées aux rayonnements ionisants en utilisant les deux méthodes décrites dans ce protocole. (a, b). (Olive et al, 2006)

Les cellules lymphoblastiques humaines WIL2NS ont été examinées en utilisant la méthode alcaline, qui détecte les cassures simple brin d'ADN, les cassures double brin et lésions labiles alcalines. (c, d).

Les cellules de carcinome cervical humain SiHa étaient examinées en utilisant la méthode de lyse neutre qui détecte les cassures double brin.

Des suspensions unicellulaires ont été exposées à des rayons X sur la glace pour empêcher la renaturation des brins d'ADN.



Montré en a et c sont les résultats des contrôles (à gauche), après 2 ou 30 Gy (Gris; milieu), et après 8 ou 60 Gy (à droite). Les graphiques en b et d montrent des courbes dose-réponse (moyenne  $\pm$  s.d. ; n = 3).

Notant la différence de 40 fois de pentes des deux courbes dose-réponse, cohérentes avec la différence dans l'induction de cassures simple brin versus cassures double brin par radiation ionisante.

L'apparition des images microscopiques des comètes représentés pour les trois doses sont présentées et des graphiques bivariés de la teneur en ADN, par rapport au moment de la queue de comète indiquent la réponse de cellules individuelles dans diverses phases du cycle cellulaire (a, c).

Bien que l'ADN en phase S contient le même nombre de cassures simple et double brin induites par rayonnement par Dalton, dans les conditions de dénaturation, les fourches de réplication apparaissent comme des cassures monocaténaïres, et donc l'ADN en phase S migre plus rapidement que l'ADN des cellules en phase G1 ou G2.

Le contraire se produit en utilisant la méthode neutre car la réplication des cellules en phase S retardent la migration de l'ADN pendant l'électrophorèse. Mais des changements dans la structure de la chromatine après la dénaturation alcaline et la renaturation peuvent affecter la liaison du colorant après de faibles dommages. En utilisant un système d'imagerie, il devrait être possible d'identifier des cellules dans différentes phases du cycle cellulaire en fonction de l'intensité de fluorescence des comètes individuelles.

Noter que l'apparition des queues de comètes dans la méthode alcaline pourrait indiquer la présence de fourches de réplication en phase S ainsi que les cellules contenant des cassures monocaténaïres induites par le traitement.

Les cassures doubles brins se produisent beaucoup moins fréquemment que les cassures simple brin, mais ce sont des précurseurs essentiels des aberrations chromosomiques. Les cellules traitées par la méthode de lyse neutre développent un «halo» de boucles d'ADN qui donne aux comètes une légère apparence différente par rapport aux comètes préparées en utilisant la méthode alcaline.

Les comètes des cellules non traitées semblent plus allongées, donc plus d'ADN est attribué à la région «queue» dans les cellules non traitées (notez le moment de queue plus élevé pour les cellules «0 Gy» analysées en utilisant la méthode neutre de la **figure 15**).

Comme indiqué précédemment, l'augmentation de l'ADN mesurée après des faibles doses d'agent endommageant l'ADN peut être le résultat de la relaxation des super-enroulements d'ADN causée par les cassures simples brins, mais pas une indication d'induction de cassures doubles brins.

Une augmentation rapide des dommages à des faibles doses suivie d'une augmentation beaucoup plus lente mais linéaire dans les mesures des doses plus élevées (véritables cassures double brin) est donc anticipée, bien que le temps de lyse nécessaire doit être plus long cela devrait être suffisant pour détendre les super-enroulements d'ADN (**Olive et al, 2006**).



## III.2. Discussion :

### III.2.1. test des comètes

Le test de comète est sensible aux dommages au-dessus de 50 cassures environ par cellule diploïde de mammifère, et perdra sa sensibilité au-dessus environ 10 000 cassures par cellule (**Olive et al, 2006**), dans les résultats présentés sur les images microscopiques a et c, ont été compatibles avec les doses d'agents chimique, car il y avait une augmentation de la teneur en fluorescence correspondant à la migration d'ADN et formation de la queue de comète, qui indique la présence des cassures doubles/simples brins d'ADN.

Dans les deux méthodes traitées, les cassures doubles brins se produisent beaucoup moins fréquemment que les cassures simple brin, mais ce sont des précurseurs essentiels des aberrations chromosomiques, il y a eu une légère différence qui est en rapport avec la phase de cycle cellulaire G1, G2 et S.

Les comètes des cellules non traitées semblent plus allongées, donc plus d'ADN est attribué à la région «queue» dans les cellules non traitées (notez le moment de queue plus élevé pour les cellules «0 Gy» analysées en utilisant la méthode neutre de **la Figure 15**).

### III.2.2. test de micronoyau

Les souris, les rats ou toutes autres espèces de mammifère approprié peuvent être utilisé dans ce test. La souris est préférée car elle est de petite taille et facile à manipuler, et possède moins des muscles et de graisse autour de son fémur par rapport à d'autres rongeurs.

Le tissu adipeux autour de la moelle osseuse a un effet délétère sur les frottis et rend difficile l'obtention de coupes satisfaisantes. Un minimum de cinq animaux par dose est utilisé pour des données fiables avec au moins trois niveaux de dose sont testés, avec la dose la plus élevée qui montrent une toxicité.

Les résultats montrent que le test de micronoyau peut détecter les aberrations chromosomiques dans les cellules érythrocytaires de la moelle osseuse chez les rongeurs (**Kumar et al, 2019**).

### III.2.3. test de micronoyau

L'étoposide est largement reconnu comme un puissant agent génotoxique, mais il reste un médicament important dans le traitement du cancer.

Certains événements augmentent cette génotoxicité, y compris la dose et le temps et la durée d'administration. Un examen récent des modes d'administration d'étoposide dans la pratique pédiatrique au Royaume-Uni (**Turner et al., 2000**) a révélé un schéma différent dans des combinaisons de mode d'administration de médicaments par voie intraveineuse à des doses de 360 à 450 mg/m<sup>2</sup> fractionnées sur 3 jours et répétées toutes les 3 semaines, et des programmes d'administration orale fractionnés et prolongés, par exemple 50 mg/m<sup>2</sup> par jour pendant 21 jours, aient également été largement utilisés.

Ce dernier schéma est un traitement ambulatoire bien toléré, est associé à une faible toxicité hématologique, et le maintien de médicament dans le sang pendant une longue période aussi peut augmenter l'efficacité de ce dernier.

Récemment, des inquiétudes ont été exprimées au sujet de l'étoposide administré par voie orale, bien que dans le rapport de ce travail détaillé dans l'article, il y avait une co-administration d'autres médicaments qui endommagent l'ADN, l'action de l'étoposide seulement est difficile à préciser.

Les objectifs initiaux étaient d'identifier un critère pour les dommages à l'ADN après exposition à l'étoposide (ruptures de brins d'ADN/événements de translocation), qui était également suffisamment sensible pour détecter les dommages sur une plage de doses cliniquement pertinente (1,7 à 6,7 mg/kg/jour).

Suite à l'évaluation initiale de trois tests différents, le test des comètes, le modèle MutaMouse et le test BMMN, ils ont été concentrés sur le test BMMN car il a montré sur différents mesures une très grande fiabilité.

Un certain nombre d'études ont montré que le test BMMN est une mesure robuste de l'activité clastogène de divers composés, y compris l'étoposide.

De plus, il y a eu une formation des micronoyaux qui sont un bon indicateur de dommages chromosomiques. Ils ont démontré que le test est très sensible aux effets de l'exposition à l'étoposide, avec une induction significative de MPE à des doses aussi faibles que 0,1 mg/kg. Une augmentation dose-dépendante de l'induction du MPE a été observée jusqu'à 1 mg/kg. La dépendance à la dose de l'induction du MPE a également été démontrée pour la voie orale d'exposition.

L'explication de cette observation peut reposer en partie sur les différences de biodisponibilité de l'étoposide après administration orale et i.p, car l'absorption de l'étoposide administré par voie orale peut être aussi faible que 17% de la dose administrée. Ainsi, la voie d'administration du médicament est un facteur important dans l'évaluation de la génotoxicité induite par le médicament à l'aide du test BMMN, et pour une voie spécifiée d'exposition, c'est un marqueur relativement sensible et cohérent des dommages à l'ADN.

L'étude est réalisée par le test de BMMN, (**Turner et al, 2000**) les chercheurs ont montré la capacité de ce test à détecter différents niveaux de lésions, dommages d'ADN. Une augmentation du niveau d'induction du MPE a été rapportée après l'administration fractionnée d'autres médicaments tels que la 1-β-D-arabinofuranosyl cytosine (Ara-C) ou le méthotrexate (MTX). Aux fins de cette étude, l'étoposide a été administré par voie orale comme cette voie a trouvé de plus en plus de faveur dans la pratique clinique et est administré selon un programme hautement fractionné (c'est-à-dire deux fois par jour pendant 21 jours consécutifs). (**Turner et al, 2000**).

# Conclusion

## Conclusion

Notre travail consiste à mettre au point des méthodes d'évaluation de la génotoxicité des xénobiotiques. Notre étude repose sur deux tests l'un in vitro, c'est le test de comète sur culture cellulaire et l'autre in vivo le test de micronoyau sur les souris, en étudiant la génotoxicité d'un agent chimique qui correspond aux molécules utilisées lors de traitement anticancéreux.

L'analyse des articles et des différents travaux réalisés dans le domaine de la génotoxicité, quel que soit le type de test in vivo, in vitro, ex vivo par rapport à de multiples mesures ; les résultats ont été cohérents et compatibles montrant la cytotoxicité et la génotoxicité de l'agent étudié.

Dans les tests de génotoxicité, la dose administrée est un facteur crucial, ainsi que la voie d'administration, car la réponse de l'organisme receveur des médicaments est dose-dépendante. Dans plusieurs cas, l'augmentation de la dose donne des résultats néfastes sur l'organisme en général, et le matériel génétique en particulier.

Les résultats obtenus dans ces études étudiées nous permettent de conclure que, les deux tests, de micronoyau et de comètes sont fiables et permettent d'évaluer la génotoxicité des xénobiotiques.

L'objectif, dans un avenir proche, est d'examiner et d'étudier la génotoxicité en utilisant d'autres méthodes pour évaluer les agents toxiques non seulement dans le traitement anticancéreux, mais aussi pour différents médicaments administrés et trouvés dans l'industrie pharmaceutique.

---

# Références Bibliographiques

---

## Références bibliographiques

### A

- Asfar Azmi, Molecular Diagnostics and Treatment of Pancreatic Cancer; page 113; 2013.
- Anderson Diana , Alok Dhawan, and Laubenthal Julian, The Comet Assay in Human Biomonitoring, chapter 13, Alok Dhawan and Mahima Bajpayee (eds.), Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 2031,2019.

### B

- Ben-Yoseph. O & Ross B.D., Oxidation therapy: the use of a reactive oxygen species-generating enzyme system for tumour treatment, Departments of Radiology and Biological Chemistry, University of Michigan, Kresge III Research Building, Room R3315, Ann Arbor, Michigan 48109-0553, USA, 1994, 70-1131-1135.
- Bolognesi Claudia and Fenech Michael, Micronucleus Cytome Assays in Human Lymphocytes and Buccal Cells, chapter 8, Alok Dhawan and Mahima Bajpayee (eds.), Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 2031,2019.
- Berwald Yoheved and prof, Sachs Leo, in vitro cell transformation with chemical carcinogens, nature vol;200, December 21, 1963.
- Burgaz S Y. et Karakaya A. E; Özdamar N, A Signal Assay for the Detection of Genotoxic Compounds: Application on the Urines of Cancer Patients on Chemotherapy and of Nurses Handling Cytotoxic Drugs, Human toxicol. (1988), 7, 557-560.
- 

### C

- Croom Edward, Metabolism of xenobiotics of human environments, progress in molecular biology and translational science, 2012;112:31-88.
- Clements Julie, The Mouse Lymphoma Assay, / Mutation Research 455 (2000) 97–110.
- Claxton Larry D, Houk Virginia S, Hughes Thomas J, Minireview Genotoxicity of industrial wastes and effluents, Mutation Research 410 1998 237–243.

### D

- David Rhiannon M and Doherty Ann T, Viral vectors: The road to reducing genotoxicity, ToxSci Advance Access published November 1, 2016.

### F

- Phillips. David H. Arlt Volker M. and , Genotoxicity: damage to DNA and its consequences, Molecular, Clinical and Environmental Toxicology. Volume 1: Molecular Toxicology Edited by A. Luch ; 2009.
- Flamand N, Meunier J-R., Meunier P-A., C. Agapakis-Caussée, Mini mutagenicity test : a miniaturized version of the Ames test in a prescreening assay for point mutagenesis assessment, Toxicology in vitro 15, L'OREAL advanced research, life science research, investigative toxicologydepartment, Aulnay-Sous-Bois,France ;105-114

---

## G

- Guo Xiaoqing, Heflich Robert H, Mamata De, Nan Mei, Richter Patricia A, Stacey L. Dial, Quantitative Differentiation of Whole Smoke Solution Induced Mutagenicity in the Mouse Lymphoma Assay, Environmental and Molecular Mutagenesis 59:103-113 (2018).

## H

- Horibe Atsuko, Hayash Makoto, Hamasuna Nobuyuki, Morita Takeshi, Shigenori Odashima, Weight of contribution of in vitro chromosomal aberration assay for evaluation of pesticides: Experience of risk assessment at the Food Safety Commission of Japan, Regulatory Toxicology and Pharmacology (2018), doi: 10.1016/j.yrtph.2018.02.013, YRTPH 4070

## K

- Kumar Jain. Abhishek and Pandey Alok Kumar, In Vivo Micronucleus Assay in Mouse Bone Marrow, chapter 7, Alok Dhawan and Mahima Bajpayee (eds.), Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 2031, 2019.
- Kovalchuk Olga, Hohn Barbara, and Kovalchuk Igor Titov Victor, A sensitive transgenic plant system to detect toxic inorganic compounds in the environment, nature biotechnology • VOLUME 19 • JUNE 2001.
- Kang Seung Hun, Kwon Jee Young, Lee Jong Kwon, Seo Young Rok, Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models, JOURNAL OF CANCER PREVENTION Vol. 18, No. 4, December, 2013.

## L

- Liu Xuemei, Denise Rodeheaver, Robert Rose, Zhang Fan, Tolliver Charlon, Walker Jamie, Wright Ann Development of a quantitative cytotoxicity assay using mouse lymphoma TK cells, Toxicology in Vitro 45 (2017) 172-180.
- Larousse, <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/h%C3%A9ritage/39658>

## M

- Mosesso Pasquale and Serena Cinelli, In Vitro Cytogenetic Assays: Chromosomal Aberrations and Micronucleus Tests, chapter 4, Alok Dhawan and Mahima Bajpayee (eds.), Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 2031, 2019.
- Matney Thomas S, Connor Thomas H, Dana William J, Nguyen Tot V, Theiss Jeffrey C., Genotoxic Classification of Anticancer drugs, Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 5319-328 (1985).
- Magdy S. Aly, Nahas and Mona A. F. Abo Zeid, Mohamad B. Ashour, Soheir M., genotoxicity and cytotoxicity of the anti cancer drugs gemcitabine and cisplatin,

---

separately and in combination : in vivo studies . journal of biological sciences 3 (11): 961-972, 2003.

## O

- Olive Peggy L & Judit P Banáth, The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells, NATURE PROTOCOLS | VOL.1 NO.1 | 2006 .

## P

- Spanogiannopoulos peter, Bess Elizabeth N, Carmody Rachel N. and Turnbaugh Peter J, The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism, NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY, Published online 14 Mar 2016
- Pulliero. Alessandra, Jia Cao, luciana dos Reis Vasques and Francesca pacchierotti, Genetic and Epigenetic Effects of Environmental Mutagens and Carcinogens; in BioMed research international; 2015 august 04, volume 2015.
- Pecorino Lauren, Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics, page 24, 2012.

## S

- Shaily Umang Shah, Importance of Genotoxicity & S2A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals, IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSRJPBS) ISSN : 2278-3008 Volume 1, Issue 2 (May-June 2012), PP 43-54.
- Sommer Sylwester , Marcin Kruszewsk and Iwona Buraczewska; Review Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions; Int. J. Mol. Sci. 2020, 21, 1534; doi:10.3390/ijms21041534,
- Schisler Melissa R. , Martha M. Moore, and B. Bhaskar Gollapudi, In Vitro Mouse Lymphoma (L5178Y Tk +/- -3.7.2C) Forward Mutation Assay, Alok Dhawan and Mahima Bajpayee (eds.), Genotoxicity Assessment: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol. 1044, DOI 10.1007/978-1-62703-529-3\_2, © Springer Science+Business Media New York 2013.
- Soucek pavel, xenobiotics, M. Schwab (ed.), Encyclopedia of Cancer, DOI 10.1007/978-3-642-16483-5, 2011.
- SAMUEL M. COHEN AND LEON B. ELLWEIN, Cell Proliferation in Carcinogenesis, SCIENCE, VOL. 249, 31 AUGUST 1990.
- Galloway Sheila M., Cytotoxicity and Chromosome Aberrations In Vitro: Experience in Industry and the Case for an Upper Limit on Toxicity in the Aberration Assay, Environmental and Molecular Mutagenesis 35:191–201 (2000).
- Seukep Armel Jackson, Djeussi Doriane E.; Noumedem Jaures A.K., and Kuete Victor, Genotoxicity and Teratogenicity of African Medicinal Plants, Toxicological Survey of African Medicinal Plants, 2014.

## T

- Turner SD, Ashby A, Baum C, Rafferty JA , Eckert H-G, Fairbairn LJ, Lashford LS, Tinwell H, The effects of dose, route of administration, drug scheduling and MDR-1



---

gene transfer on the genotoxicity of etoposide in bone marrow, *Leukemia* 14, 1796-1802(2000).

## V

- VERHAGEN H, G. C. D. M. BRUIJNTJES-RoZIER, T. M. M. COENXN and J. OOSTEROM, MODIFIED SUSPENSION AMES TEST FOR TESTING PROTEINACEOUS SUBSTANCES: AN INITIAL STEP, TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist and 'Gist-brocades BV, Delft. The Netherlands, *Fd Chem Toxic* , Vol. 32. No. 12. pp 1161-1166. 1994.

## W

- William Slikker, Louis Chang Harcourt Brace, *Handbook of Developmental Neurotoxicology*, *Journal of Clinical Neuroscience* (1999) 6(5). 451-452.
- Gary M. Williams, *METHODS FOR EVALUATING CHEMICAL GENOTOXICITY*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1989. 29:189-211.
- William W. Au, Mary Ann Butler, Thomas S. Matney, and Ti Li Loo, Comparative Structure-Genotoxicity Study of Three Aminoanthraquinone Drugs and Doxorubicin1, *CANCER RESEARCH* Vol 41, 376-379. February 1981
- Jorg D. Wichard, In silico prediction of genotoxicity, *Food and Chemical Toxicology* 106 (2017) 595-599.

## Z

- Zeiger Errol, The test that changed the world: The Ames test and the regulation of chemicals, *Mutat Res Gen Tox En* 841 (2019) 43-48.

---

## Glossaire

**Cytome** : toutes les cellules d'organismes particuliers ainsi que leurs processus cellulaires associés.

**Chromothripsie** : (génétique, pathologie) Un multiple de réarrangements chromosomiques qui est associé à certains cancers.

- Mais pour 2 à 3% des cancers, en particulier le cancer des os (jusqu'à 25%), des preuves récentes suggèrent qu'un seul événement de chromothripsie impliquant un ou quelques chromosomes entraîne de multiples réarrangements de gènes (dans certains cas des dizaines à des centaines) qui peuvent perturber des gènes suppresseurs de tumeur et / ou produisent des gènes de fusion oncogènes.

**Clastogénicité** : c'est l'effet de causer des dommages aux chromosomes.

**l'aneugénicité** : (génétique) qui induit l'aneuploïdie, qui est à son tour l'état de possession d'un nombre chromosomique qui n'est pas un multiple exact du nombre haploïde de l'organisme.

**modification héréditaire** : transmission des caractères génétiques des parents à leurs descendants.

**chromosome double minute** : Les doubles minutes sont des petits corps extra chromosomiques acentriques sans télomère, sous forme d'ADN circulaire.

**S9** : Fraction hépatique post-mitochondriale S9 de rongeurs (généralement des rats), prétraité avec Aroclor 1254 ou une combinaison de phénobarbital et de  $\beta$ -naphthoflavone pour induire des oxydases à fonctions mixtes est combiné avec un mélange de cofacteurs pour former un système NADPH de génération (mix S9) qui est le système d'activation métabolique exogène plus utilisé ayant la capacité de métaboliser des produits chimiques in vitro. Un exemple de mix S9 largement utilisé, la préparation est affichée ci-dessous: Pour préparer 10 ml de mélange S9, ajoutez 3,0 ml de S9, 0,4 ml de NADP, 0,5 mL de G-6-P, 1 mL chacun de KCl et HEPES, 0,4 mL de MgCl<sub>2</sub> et 3,7 mL de HBSS.

**DMSO** : (chimie organique) Initialisme du diméthylsulfoxyde. : Un composé organique, (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>SO, obtenu comme sous-produit de la pâte de bois, et est utilisé comme solvant pour effectuer des réactions chimiques et pour administrer des médicaments à travers la peau; également utilisé comme réactif; sa structure polaire est un hybride de résonance.

# **Annexes**

## Annexes

### **Annexe 1 :**

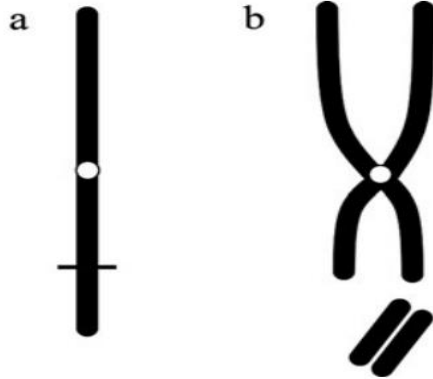
**Note :** Solution saline tamponnée au phosphate (PBS) pour 1: Prendre 800 mL d'eau distillée dans une bouteille fraîche. Pesez et ajoutez 8 g de NaCl, 200 mg de KCl, 1,44 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> et 240 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à l'eau. Mélanger pour dissoudre les sels. Ajustez le pH à 7,4. Ajouter 138 µg de Abhishek Kumar Jain et Alok Kumar Pandey d'eau distillée jusqu'à le volume final 1 L. Maintenir le pH à 7.4.

### **Annexe 2 :**

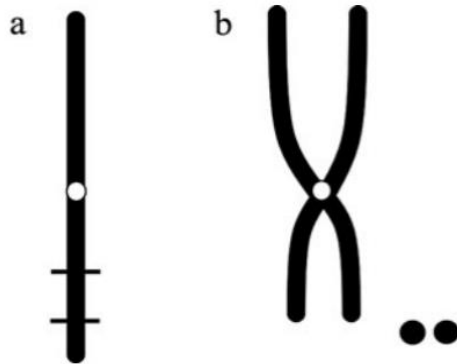
**Note :** Solution mère 5 M de NaOH: ajouter lentement NaOH à l'eau distillée glacée ; colorant ADN fluorescent: 10 µg / ml d'iodure de propidium (Sigma; réf. P-4170); d'autres colorants d'ADN (par exemple, SYBR-green, YO-PRO-1, DAPI) peuvent également être utilisés, mais la photostabilité doit être évaluée en particulier avec des colorants excitables aux UV. ATTENTION L'iodure de propidium est mutagène; porter des gants de protection.

**Annexe 3 :** présentation des types d'aberration chromosomique.

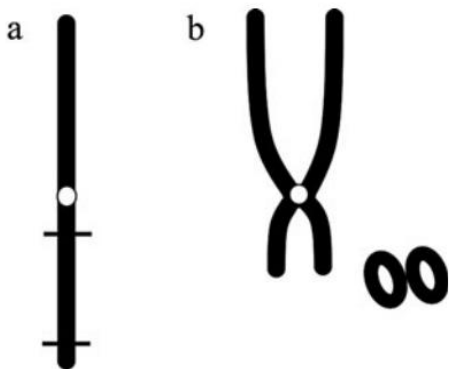
**L'échange intra-chromosomal : Délétion**



(a) Origine de l'aberration dans le chromosome non répliqué; (b) une délétion terminale.

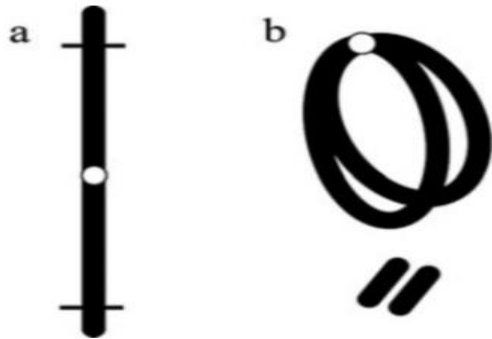


Suppression interstitielle: (a) Origine de l'aberration dans le chromosome non répliqué (b) chromosome minuscule double.

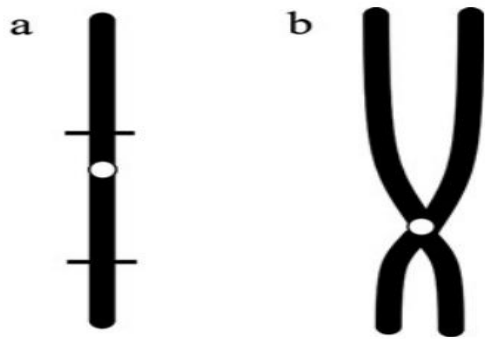


Suppression interstitielle: (a) Origine de l'aberration dans le chromosome non répliqué; (b) Anneau acentrique

**Intra-changements asymétriques :**

**Anneau centré avec fragment :****inversion :**

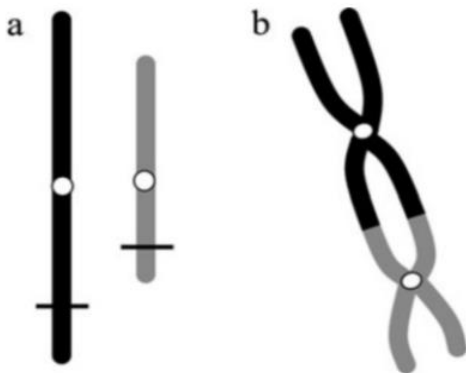
(a) Origine de l'aberration dans le chromosome non répliqué; (b) Anneau central avec fragment.



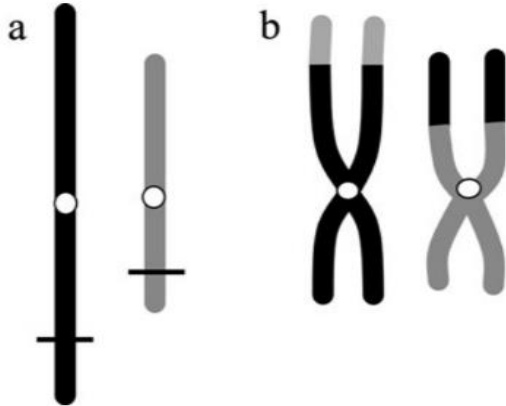
Inter-changements chromosomiques.

(a) Origine de l'aberration dans le chromosome non répliqué; (b) inversion péricentrique.

Echanges asymétriques (généralement dicentriques) :

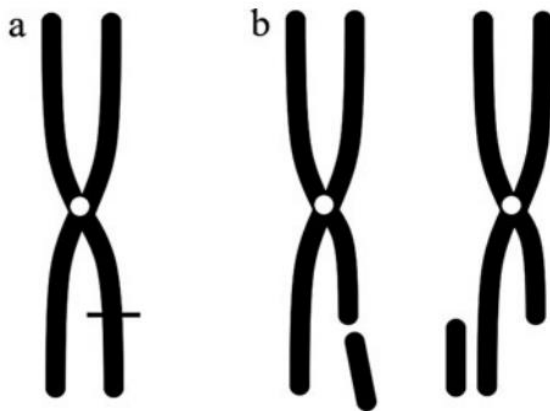


Echanges asymétriques. (a) Origine de l'aberration dans le chromosome non répliqué; (b) Chromosome dicentrique avec fragment.

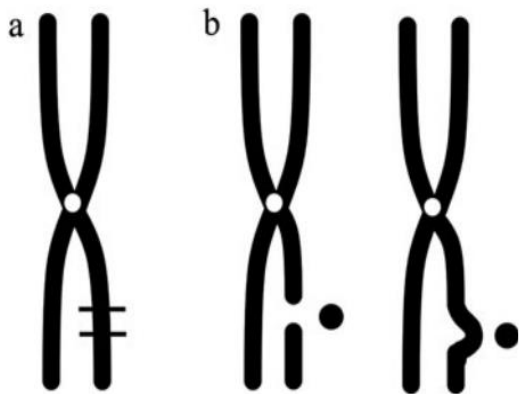


Échanges symétriques. (a).  
Origine de l'aberration dans le  
chromosome non répliqué; (b)  
Translocation réciproque.

Echanges symétriques (translocations réciproques) :



(a) Origine de l'aberration dans  
le chromosome répliqué; (b)  
suppressions terminales alignées et  
déplacées.

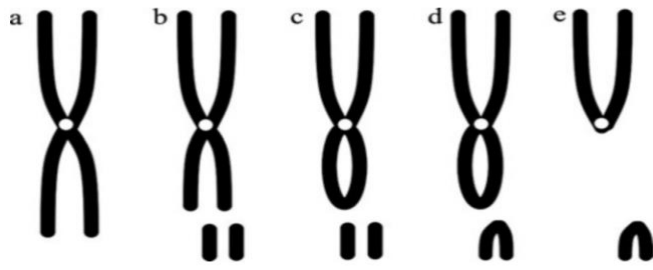


Suppressions interstitielles. (a)  
Origine de l'aberration dans le  
chromosome répliqué; (b)  
chromosome minuscule double.

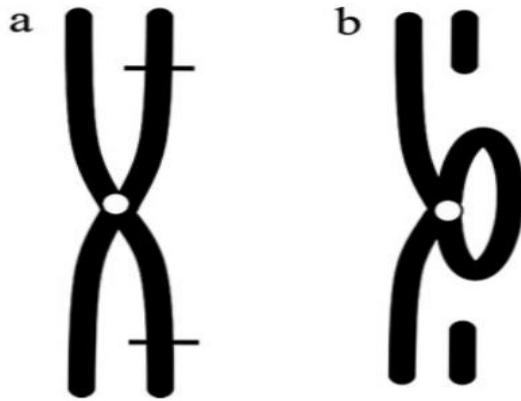
Aberrations de type chromatide.

changements intra-chromatide:

Suppression interstitielle :



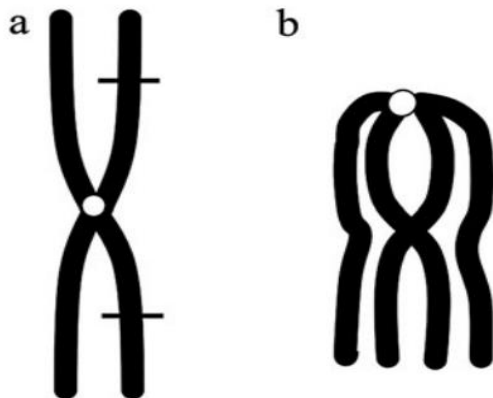
Délétions isochromatides. (a) Origine de l'aberration dans le chromosome; (b) Non-union proximale et distale; (c) pas d'union distal (d) Union soeur; (e) Non-union proximale.



Interarm intra-changes. (a) Origine de l'aberration dans le chromosome; (b) Échange asymétrique.

Délétions isochromatides :

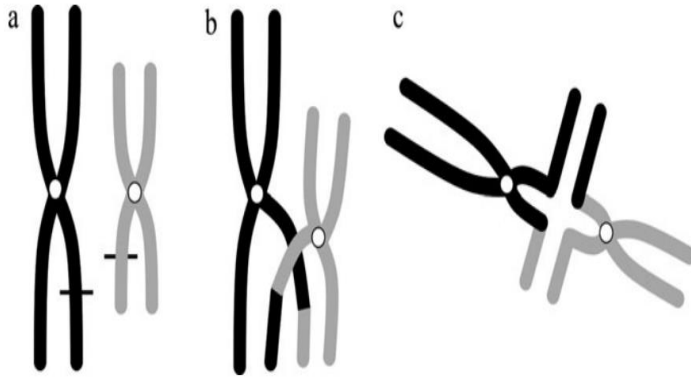
Interarm intra-changes :



Interarm intra-changes. (a) Origine de l'aberration dans le chromosome; (b) Échange symétrique

Inter-changements interarmées. (a) Origine de l'aberration dans le chromosome répliqué; (b) Achèvement de l'échange symétrique; (c) Aspect cytologique en métaphase.

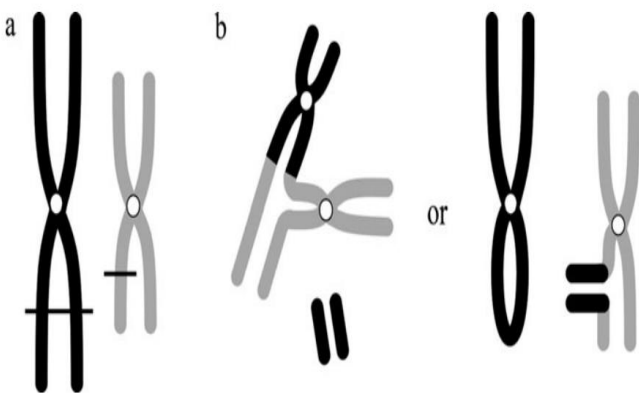
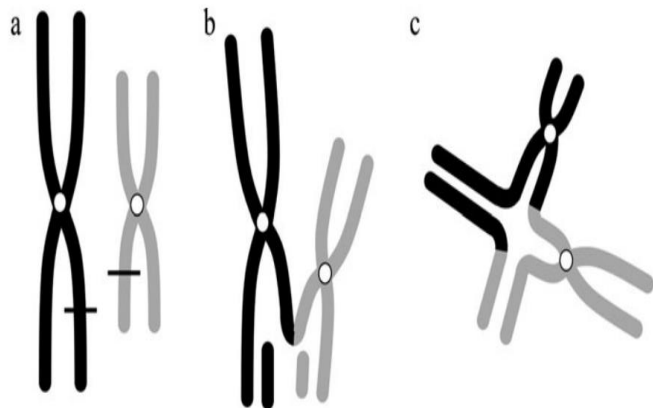




Interchangement des chromatides

Interchangements interarmées (symétriques et asymétrique)

Triradials.



Echanges interarmées. (a) Origine de l'aberration dans le chromosome répliqué; (b) Achèvement de l'échange asymétrique; (c) Aspect cytologique en métaphase

Echanges interarmées. (a) Origine de l'aberration dans le chromosome répliqué; (b) Triradials.

