



SARL TOXEM
UFR-ST
25, rue Philippe Lebon
BP540
76058 Le Havre cedex
Tél : 02 32 74 43 89
Portable : 06 19 35 73 11
jerome.couteau@toxem.com

Etude HBN-1 Bis v2

Evaluation du potentiel anti-génotoxique du produit

ADN téloméractives®

DEMANDEUR:

HBN

Échantillons:

ADN Téloméractives®

Adresse du demandeur:

HBN

1 rue des Pénitents Blancs
31000 Toulouse

Étude réalisée par:

TOXEM

UFR-ST

Université du Havre

25, rue Philippe Lebon

BP540

Le Havre 76058 cedex

Date de réception des Échantillons:

6 octobre 2014

Début d'expérimentation:

23 octobre 2014

Fin d'expérimentation:

4 novembre 2014

INTRODUCTION

Le but de cette expérimentation est de déterminer le potentiel éventuel anti-génotoxique du produit *ADN Téloméactives*® à l'aide du SOS-Chromotest.

Le **SOS-Chromotest** est un test colorimétrique qui met en œuvre une souche génétiquement modifiée d'***E. Coli*** (PQ37), chez laquelle a été réalisée une délétion partielle de la région portant le gène *lacZ* de la β -galactosidase ainsi qu'une fusion entre les gènes *sfiA* et *lacZ*. Chez *E. coli*, le système dit « **SOS** » est mis en action lors de dommages à l'ADN. Si un défaut sur l'ADN entraîne un blocage de la fourche de réplication, la protéine RecA se lie à la zone monocaténaire bloquée et passe à l'état activé. A l'état activé, RecA déclenche l'hydrolyse sur un site particulier de la protéine LexA qui est une protéine se comportant comme le propre répresseur de synthèse du gène *RecA* et comme le répresseur de toute une batterie de gènes intervenant dans la réparation d'ADN dont le gène *sfiA*. De ce fait, le principe du SOS-Chromotest est le suivant : plus un composé est génotoxique, plus le taux d'altérations de l'ADN de la souche sera élevé, plus le système de réparation « SOS » sera induit et plus l'activité enzymatique β -galactosidase de la bactérie sera importante. Ainsi, à l'aide d'un réactif spécifique nous mesurons l'induction de cette activité : **le SOS Induction Factor (SIF)**.

Dans le cadre de cette étude d'induction de la réponse SOS dans les bactéries, la souche **PQ37 d'*E. coli*** a été exposée en même temps à une concentration fixe d'un génotoxique de référence ainsi qu'à différentes concentrations du produit dont on souhaite évaluer le potentiel anti-génotoxique. Le potentiel anti-génotoxique du produit ***ADN Téloméactives*®** a été mesuré vis-à-vis d'un génotoxique direct (-S9, 4-NQO) mais également d'un pro-génotoxique (+S9, B[a]P).

Parallèlement, l'analyse du produit seul a été réalisée en présence et en l'absence d'activation métabolique (S9) afin d'évaluer l'impact du produit ***ADN Téloméactives*®** sur la viabilité de l'organisme d'essai.

Les témoins positifs et négatifs de cette étude ont induit les réactions appropriées sur la souche PQ37.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.	Échantillons	
	Nom	<ul style="list-style-type: none">• ADN Téloméactives®
	Description	<ul style="list-style-type: none">• Comprimé brun
	Concentrations testées (mg/mL)	0,1 / 1 / 2,5 / 5 / 10 / 20 (3 réplicats par quantité testée)

2.	Substances témoins	
	Témoins négatifs	Milieu LB DMSO (N° CAS : 67-68-5)
	Témoins positifs	Sans Bioactivation : 4NQO (N° CAS : 56-57-5) Avec Bioactivation : B(a)P (N° CAS : 50-32-8)

3.	Mélange d'activation S9	
	Mix S9 à 30% AROCLOR induced Rat liver S9, lot N°3250 (TRINOVA, Biochem M11-101.5)	

RÉFÉRENCES

P. Quillardet & M. Hofnung, The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins : procedures, Mutation Research 147 (1985), 65-78.

P. White, J. Rasmussen & C. Blaise, A semi-automated, microplate version of the SOS Chromotest for the analysis of complex environmental extracts, Mutation Research 360 (1996), 51-74.

RÉSULTATS

Le graphique 1 page 8 représente les **SIF** obtenus en fonction des concentrations de l'échantillon en présence d'un génotoxique de référence avec ou sans activation métabolique (S9).

Un test statistique (test de *STUDENT*) a été réalisé pour déterminer les différences significatives des SIF obtenus pour chaque concentration du produit testé par rapport au témoin négatif (LB ou DMSO) que ce soit avec ou sans la présence d'un génotoxique de référence. Les valeurs significativement différentes au risque 0,05% sont annotées d'un astérisque.

Les graphiques 2 et 3 pages 8 et 9 représentent les pourcentages de viabilité obtenus en fonction de la concentration de l'échantillon testée dans les différentes conditions de l'étude.

CONCLUSION

Une première expérimentation dans une gamme de concentrations allant de **0,1 à 20 mg/mL** (graphique 2 page 8) a permis de mettre en évidence une action cytotoxique sur l'organisme d'essai du produit **ADN t lom ractiv s®** sans activation métabolique (-S9) et en absence de NQO. Au vu de ces premiers résultats, l'évaluation du potentiel génotoxique du produit **ADN T lom ractiv s®** a été déterminée sur une gamme de concentrations plus restreinte : **0,1 / 1 / 2,5 et 5 mg/mL** que ce soit avec et sans activation métabolique.

En présence de 4-NQO, le produit ADN T lom ractiv s® induit de façon dose dépendante une diminution significative des SIF obtenus pour cette molécule génotoxique de référence (graphique 1 page 8).

En présence de B(a)P, le produit ADN T lom ractiv s® induit de façon dose dépendante une diminution significative des SIF obtenus pour cette molécule génotoxique de référence (graphique 1 page 8).

Données brutes : SOS Induction Factor (SIF)

Sans activation métabolique (-S9)

	Concentration	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	M	SD
Avec NQO à 2,5 μ M	NQO	4,743	5,071	4,849	4,887	0,167
	0,1 mg/mL	4,649	4,461	4,576	4,562	0,095
	1 mg.mL	3,529	3,623	3,793	3,649	0,133
	2,5 mg/mL	2,645	2,996	2,703	2,781	0,207
	5 mg/mL	2,308	2,135	2,350	2,264	0,114
	10 mg/mL	1,628	1,789	2,066	1,828	0,222
	20 mg/mL	1,497	1,542	1,826	1,621	0,178

	Concentration	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	M	SD
Avec NQO à 2,5 μ M	NQO	5,372	5,046	5,625	5,348	0,290
	0,1 mg/mL	4,925	5,217	5,099	5,080	0,147
	1 mg.mL	4,330	4,451	4,262	4,348	0,096
	2,5 mg/mL	3,533	3,889	2,015	3,711	0,252
	5 mg/mL	3,438	2,888	2,902	3,076	0,314

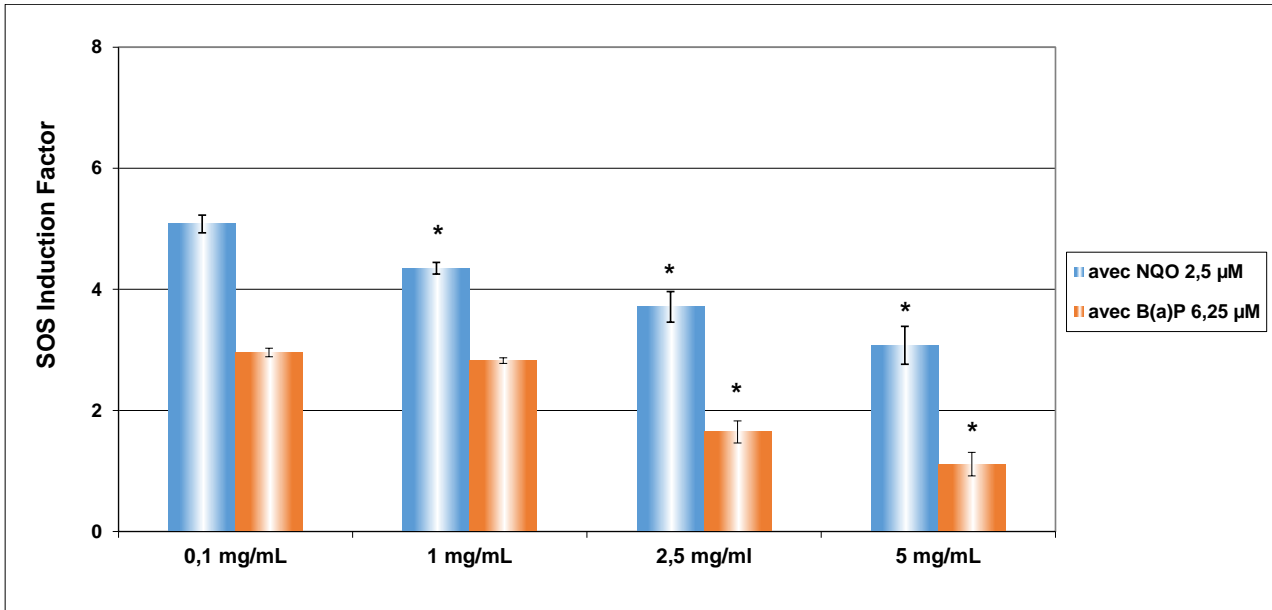
Les valeurs en rouge sont exclues du calcul de la moyenne et de l'écart type

Avec activation métabolique (+S9)

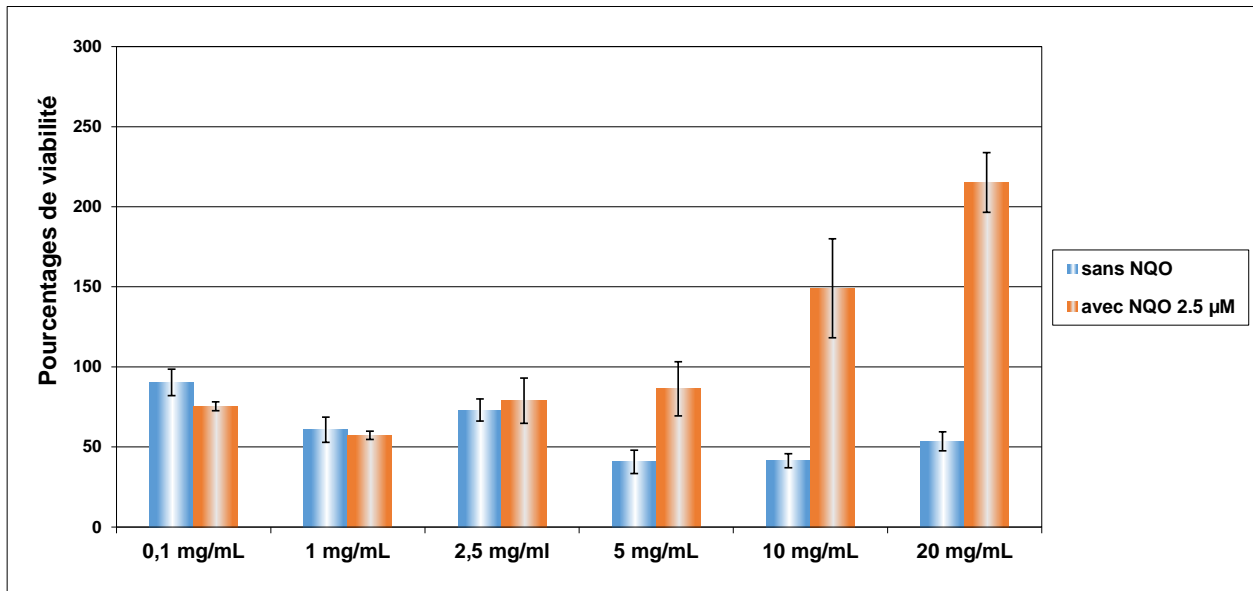
	Concentration	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	M	SD
Avec B(a)P à 6,25 µM	B(a)P	1,807	1,938	2,032	1,985	0,067
	0,1 mg/mL	2,282	2,047	2,029	2,120	0,141
	1 mg.mL	2,285	2,101	2,196	2,194	0,092
	2,5 mg/mL	0,777	0,702	0,794	0,758	0,049
	5 mg/mL	0,745	0,721	0,944	0,803	0,123
	10 mg/mL	1,006	0,846	1,075	0,975	0,118
	20 mg/mL	1,106	0,969	1,095	1,057	0,076

	Concentration	Réplicat 1	Réplicat 2	Réplicat 3	M	SD
Avec B(a)P à 6,25 µM	B(a)P	2,438	2,831	1,861	2,634	0,277
	0,1 mg/mL	3,036	2,905	2,926	2,956	0,070
	1 mg.mL	2,860	2,841	2,770	2,824	0,047
	2,5 mg/mL	1,681	1,448	1,805	1,645	0,181
	5 mg/mL	1,303	0,916	1,121	1,113	0,194

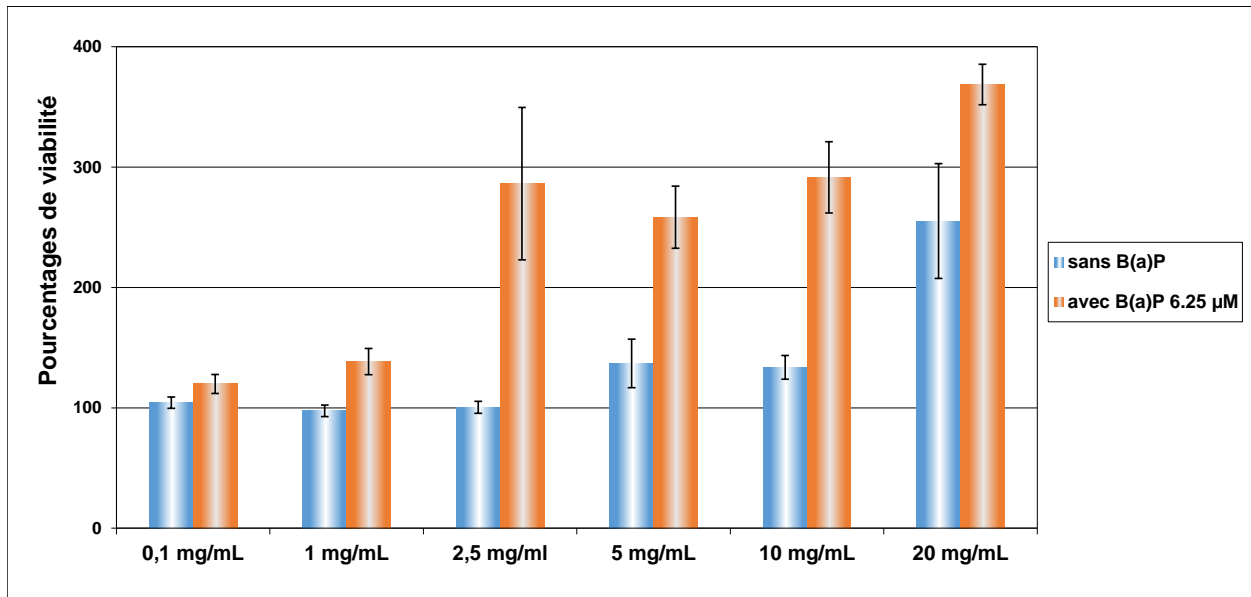
Les valeurs en rouge sont exclues du calcul de la moyenne et de l'écart type



Graphique 1 : SOS Induction Factors obtenus pour l'échantillon en fonction des concentrations testées en présence des témoins positifs avec et sans activation métabolique. Les valeurs statistiquement différentes du contrôle positif sont marquées d'une * ($p < 0,05$).



Graphique 2 : Pourcentages de viabilité obtenus pour l'échantillon en fonction des concentrations testées avec et sans NQO sans activation métabolique.



Graphique 3 : Pourcentages de viabilité obtenus pour l'échantillon en fonction des concentrations testées avec et sans B(a)P avec activation métabolique.