

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
جامعة 8 ماي 1945 قالمة  
Université 8 Mai 1945 Guelma  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Sciences de la terre et de l'Univers



## Mémoire En Vue de l'Obtention du Diplôme de Master

Domaine: Sciences Biologiques

Spécialité/Option : Biologie- Santé et Hygiène Hospitalière

Département: Biologie

### Thème

## Etude toxicogénétique du xylène (Test Allium Cepa)

Présenté par :

- Bougherara Marwa
- Hamlaoui Manal
- Hamlaoui Wided

Devant la commission composée de :

Mme Braik A.	Président	Université de Guelma
Dr. Boumaza A.	Encadreur	Université de Guelma
Mme Amri S.	Examineur	Université de Guelma
Dr. Benhalima L.	Membre	Université de Guelma
Dr. Boussadia M. I.	Membre	Université de Guelma
Mme Abdaoui W.	Membre	Université de Guelma
Mme Merabet R.	Membre	Université de Guelma

Juin 2017

---

## **Remerciements**

*Avant toute chose, nous remercions Allah, le tout puissant, de nous avoir donné la force et la patience.*

*Nous tenons premièrement à remercier sincèrement notre encadreur Dr. Boumaza Awatif, pour sa disponibilité tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi pour son aide et le temps qu'elle a bien voulu nous consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Notre sincère gratitude va à Madame Braïk A, pour nous avoir fait l'honneur de présider le jury.*

*Nos remerciements vont à Madame Amri S, pour avoir accepté d'examiner ce modeste travail.*

*Nos remerciements vont aussi à Dr Benhalima L, Dr Boussadia M, Mme Abdaoui W et Mme Merabet R pour avoir accepté être membres dans le jury de ce modeste travail*

*Nous remercions l'ensemble de l'équipe des laboratoires pédagogiques pour leur aide et disponibilité.*

*Nous remercions, du fond du cœur, nos parents pour leur soutien et leur patience durant nos études et pour leur aide et encouragement*

*Un merci spécial pour nos collègues et amis.*

*Nous souhaitons aussi adresser nos remerciements les plus sincères aux personnes qui nous ont aidé et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de cette formidable année universitaire.*

# Sommaire

## Liste des tableaux

## Liste des figures

## Liste des abréviations

## Introduction.....1

## Chapitre 1: synthèse bibliographique

### 1. Généralité sur le xylène

#### 1.1. Définition.....2

#### 1.2. Propriétés physicochimiques.....2

#### 1.3. Utilisations médicales du xylène.....3

### 2. Toxicité du xylène.....3

#### 2.1. Facteurs influençant la toxicité du xylène.....3

#### 2.2. Mécanismes de toxicité.....4

### 3. Effets du xylène sur la santé.....5

#### 3.1. Effets sur la respiration.....5

#### 3.2. Effets oculaires..... ;.....5

#### 3.3. Effets neurologiques... ;.....5

#### 3.4. Effets hématologiques.....6

#### 3.5. Effets sur la reproduction.....6

#### 3.6. Effets sur le développement.....6

#### 3.7. Effets gastro-intestinaux.....6

#### 3.8. Effets cutanés.....7

#### 3.9. Cancer.....7

### 4. Génotoxicité du xylène.....7

#### 4.1. Définition de génotoxicité.....7

#### 4.2. Tests de génotoxicité.....8

##### 4.2.1. Aberrations chromosomiques (AC).....9

##### 4.2.2. Echanges entre chromatides sœurs (SCE).....10

##### 4.2.3. Test des micronoyaux (MN).....10

##### 4.2.4. Test d'Ames.....11

##### 4.2.5. Test des comètes.....12

##### 4.2.6. Détection des adduits chimiques ou des dommages oxydatifs à l'ADN.....14

##### 4.2.7. Test d'Allium cepa.....15

## Chapitre 2 : Matériel et méthodes

### 1. Organisme d'essai et conditions de croissance.....17

2. Préparation du xylène testé.....	17
3. Détermination de la CE50.....	17
4. Index mitotique et test d'aberrations chromosomiques.....	17
5. Observation microscopique.....	18
6. Analyse statistique.....	18
<b>Chapitre 3 : Résultats et discussion</b>	
1. Test d'inhibition de l'élongation racinaire.....	19
2. Index mitotique (IM).....	20
3. Test d'aberrations chromosomiques.....	23
<b>Conclusion et perspectives</b> .....	26
<b>Références bibliographiques</b> .....	27
<b>Résumés</b> .....	32
<b>Annexes</b> .....	35

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1:</b> Classification systématique de l'oignon ( <i>Allium cepa</i> ).....	15
<b>Tableau 2:</b> Elongation racinaire et pourcentage d'inhibition.....	19
<b>Tableau 3:</b> Effets du xylène sur les phases mitotiques (PM) et l'index mitotique (IM) des cellules méristématiques racinaires d' <i>Allium cepa</i> .....	21
<b>Tableau 4:</b> Effet génotoxique du xylène sur le méristème racinaire d' <i>Allium cepa</i> .....	23

## Liste des figures

<b>Figure 1:</b> La structure chimique des trois isomères du xylène.....	2
<b>Figure 2:</b> Les différents types de lésions primaires de l'ADN.....	8
<b>Figure 3:</b> Schématisation de la formation des micronoyaux.....	11
<b>Figure 4:</b> Principe d'application du test d'Ames.....	12
<b>Figure 5:</b> Photographie du noyau dans le test de comète.....	14
<b>Figure 6:</b> Effet inhibiteur des différentes concentrations de xylène sur l'élongation racinaire d' <i>Allium cepa</i> .....	20
<b>Figure 7:</b> Cellules méristématiques racinaires d' <i>Allium cepa</i> en division régulière et normale.....	22
<b>Figure 8:</b> Les types d'aberrations chromosomiques dans le méristème racinaire d' <i>Allium cepa</i> exposé au xylène.....	25

## Liste des abréviations

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**AC** : Aberration chromosomique

**MN** : Micronoyaux

**IM** : Index mitotique

**EC50** : Concentration Efficace médiane

**KPa**: kilo pascal

**Koe**: Coefficient de partage

**GIT**: Tractus gastro-intestinal

**GABA**: Acide  $\gamma$ -aminobutyrique

**CYP2E1**: Cytochrome P450 2E1

**LH**: Hormone lutéinisante

**LDH**: Hormone lactate déshydrogénase

**SCE**: Echanges entre Chromatides Sœurs

**His**: Histidine

**pd3G** : prégnandiol 3-Glucuronide

**LDH-C4** : Lactate déshydrogénase C4

**N** : Normalité

**ER** : Elongation Racinaire

# **INTRODUCTION**

## Introduction

Dans le milieu de la santé, le risque biologique focalise, en générale, toute l'attention des intervenants et motive la prise des mesures de prévention, parce que de nombreux produits chimiques dangereux sont couramment utilisés dans ce secteur d'activité, et principalement dans les laboratoires d'anatomie et cytologie pathologiques.

Le xylène, largement utilisé dans les laboratoires d'anatomie et cytologie pathologiques, est une substance à laquelle le personnel est potentiellement exposé, ce qui peut conduire à des problèmes de santé à long terme.

La plus part des problèmes de santé liés au xylène sont dus à l'inhalation des gaz à partir du liquide volatil, mais les études concernant l'effet exacte du xylène restent non concluants.

Dans le présent travail, l'effet génotoxique du xylène est étudié en utilisant le test *Allium cepa*. Trois paramètres sont pris en considération :

- Effet inhibiteur de l'élongation racinaire sur *Allium cepa*
- Effet sur l'index mitotique de la division cellulaire des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa*
- Test des aberrations chromosomiques sur *Allium cepa*

**CHAPITRE I**  
**SYNTHESE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. Généralité sur le xylène

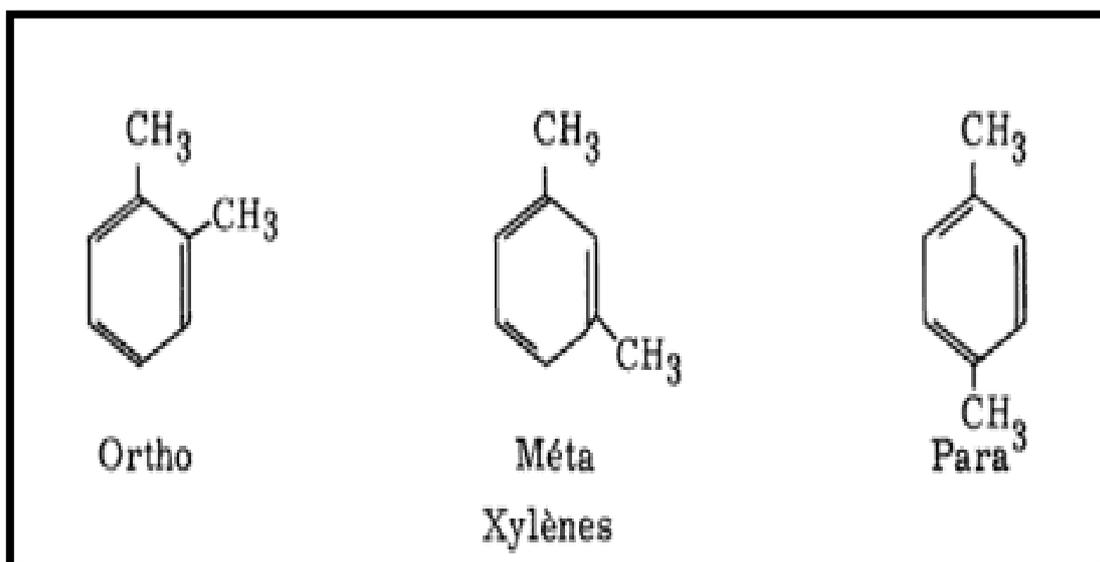
### 1.1. Définition

Le xylène est un hydrocarbure aromatique organique connu sous le nom de xylol ou de diméthyle-benzène  $C_6H_4(CH_3)_2$ , c'est un produit chimique synthétique, liquide incolore et inflammable avec une odeur douce ; s'évapore et brûle facilement, ne se mélange pas bien avec l'eau ; cependant, il se mélange avec l'alcool et beaucoup d'autres produits chimiques. (Roney *et al.*, 1994)

Le xylène est produit à partir des matières premières brutes issues du pétrole par reformage catalytique ou par craquage pyrolytique (Negraia et G, 2010) ; utilisé largement dans l'industrie et la technologie médicale comme solvant. (Kandyala *et al.*, 2010)

### 1.2. Propriétés physicochimiques

Il existe trois formes de xylène dans lesquelles les groupes méthyle varient sur le noyau benzénique : (Niaz *et al.*, 2015), à savoir : l'ortho- ou o-xylène (1,2-diméthylbenzène) ; le méta- ou m-xylène (1,3-diméthylbenzène) ; le para- ou p-xylène (1,4-diméthylbenzène). (Negraia et G, 2010)



**Figure 1:** structure chimique des trois isomères du xylène. (Lefebvre G, 1978)

Les xylènes possèdent une pression de vapeur relativement élevée (8,8 à 11,6 KPa à 25 °C), une solubilité modérée dans l'eau (122 à 223 mg/L à 25 °C) et un coefficient de partage octanol- eau assez faible (log K<sub>ow</sub> de 3,08 à 3,29), ils sont très inflammables et les propriétés chimiques diffèrent peu d'un isomère à l'autre. Les xylènes sont hydrophobes et soluble dans les solvants non polaires comme l'acétone et l'éthylène. Ils se bio-concentrent, car ils ont tendance à s'adsorber aux sols, aux matières en suspension et aux sédiments. (Mackay *et al.*, 1992)

### **1.3. Utilisations médicales du xylène**

Le xylène est utilisé dans les laboratoires histologiques pour le traitement des tissus, la coloration et le retraitement endodontique comme solvant de Gutta percha. Son facteur de solvabilité élevé permet un déplacement maximal de l'alcool et rend le tissu transparent, améliorant l'infiltration de paraffine. Dans les procédures de coloration, ses excellentes capacités de déparaffinage et de compensation contribuent à glisser les coupes brillamment. (Kandyala *et al.*, 2010)

En microscopie, il est adopté pour les examens en immersion et comme agent de nettoyage. Il est aussi la matière pour la fabrication de l'acide benzoïque. Les isomères sont employés en synthèse organique pour la fabrication de l'acide phtalique (o-xylène), l'acide isophtalique (m-xylène) et l'acide téréphtalique servant à fabriquer des résines et fibres polyester (p-xylène). (Negraia et G, 2010)

## **2. Toxicité du xylène**

L'exposition au xylène peut se produire par inhalation, contact avec les yeux ou la peau. Il est principalement métabolisé dans le foie par oxydation d'un groupe méthyle et conjugaison avec la glycine pour donner l'acide méthyl-hippurique, qui est excrété dans l'urine. De petites quantités sont éliminées inchangées dans l'air expiré. Il existe un faible potentiel d'accumulation. (Ogata *et al.*, 1970). Le xylène est à l'origine d'effets à la fois aigus (<14 jours) et chroniques (> 365 jours). (Kandyala *et al.*, 2010)

### **2.1. Facteurs influençant la toxicité du xylène**

Si vous êtes exposé à une substance comme le xylène, de nombreux facteurs détermineront si des effets nocifs sur la santé se produiront et quel sera le type et la gravité de ces effets sur la santé. Ces facteurs incluent la dose, la durée, l'itinéraire ou la voie par laquelle vous êtes exposé (respiration, alimentation, consommation d'alcool ou contact avec

la peau), les autres produits chimiques auxquels vous êtes exposés et vos caractéristiques individuelles tels que l'âge, le sexe, l'état nutritionnel, les traits familiaux, le mode de vie et l'état de santé. (Roney *et al.*, 1994)

## **2.2. Mécanismes de toxicité**

La propriété lipidique du xylène a facilité la dissolution de la membrane lipidique, ce qui a pour effet d'irriter le derme et la muqueuse des voies respiratoires, des yeux et du système tractus gastro-intestinal (GIT). Cette propriété lipophile du xylène lui permet d'induire des propriétés anesthésiques et narcotiques, ce qui est le même pour les isomères individuels. (Fang *et al.*, 1996)

Le mécanisme approprié n'est pas entièrement compris, cependant l'interaction chimique avec la membrane cellulaire, qui modifie la perméabilité et la signalisation d'impulsion nerveuse entre les cellules voisines. (Hood et Ottley, 1985). Cependant, le m-xylène a des effets nocifs sur la coordination en raison de l'augmentation des effets inhibiteurs du L'acide  $\gamma$ -aminobutyrique (GABA) dans le cerveau. Chez l'homme, le Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) est l'enzyme la plus importante et la plus riche du foie, qui décomposent le xylène en métabolites correspondants et forment finalement de l'acide méthyl-hippurique. (Tassaneeyakul *et al.*, 1996)

Tandis que d'autres enzymes conduisent à une hydroxylation de l'isomère xylène formant le 2,4-diméthylphénol, le xylène est très toxique pour le foie et il conduira à une apoptose due à la production élevée de caspase-3 et de caspase-9 menant à l'apoptose ; l'exposition aigue de haut niveau au xylène conduit à l'activation de CYP2E1, ce qui provoque l'assemblage de substances oxydantes intermédiaires et la nécrose subséquente. Ce mécanisme serait lié à une exposition de haut niveau aigu. L'exposition par inhalation au m-xylène pendant 6 heures entraîne une diminution des cytochromes tels que CYP 2B1, 2E1 et 4B1 dans le poumon et 2B1 et 2E1 dans la muqueuse nasale. (Niaz *et al.*, 2015)

Dans les essais biologiques à court terme, portant sur l'exposition au xylène par voie dermique, il n'a pas été démontré que le xylène provoque des effets mutagènes, mais la fragmentation et la désintégration de l'ADN ont été observées au niveau dermique (Rogers *et al.*, 2001)

La dissémination du xylène en cellule modifie également la membrane cellulaire, ce qui entraîne la destruction de l'ADN et la formation de nucléases de la membrane, ce qui conduit finalement à la mort des cellules due à exposition directe et élevée au xylène.

### 3. Effets du xylène sur la santé

#### 3.1. Effets sur la respiration

L'exposition des volontaires au xylène pendant une courte période dans des conditions de contrôle a provoqué un dysfonctionnement du système pulmonaire et une irritation de la muqueuse respiratoire.

Une exposition excessive au xylène peut entraîner un œdème des poumons, ce qui constitue une menace pour la vie en raison de l'accumulation de liquide dans le poumon. Les travailleurs soumis à cette occasion révèlent parfois une opacité diffuse dans les radiogrammes et un bruit. (Niaz *et al.*, 2015)

#### 3.2. Effets oculaires

Le contact direct de l'œil au xylène chauffé peut mener à l'œil hémorragique, à la conjonctive, et à l'intolérance à la lumière, à l'irritation et à la perte incomplète de l'épithélium. Il est donc conclu que les dommages chimiques conduisent à augmenter les effets oculaires avec des dommages thermiques et physiques, ce qui conduit finalement à une vision altérée ou la cécité. (Niaz *et al.*, 2015)

#### 3.3. Effets neurologiques

Le xylène peut provoquer une anomalie du système nerveux chez l'humain. Le xylène et leurs isomères individuels conduisent à une réponse lente aux stimuli externes, à une altération de la mémoire, à un déséquilibre de la démarche corporelle et à une incoordination. (Savolainen *et al.*, 1984).

L'excitation et l'anesthésie ont été les effets neurologiques bien définis résultant de l'exposition au xylène. Un coma induit par le xylène qui persistait pendant 26 heures chez des individus exposés à une forte concentration de xylène. (Niaz *et al.*, 2015).

Les travailleurs exposés à des solvants mélangés contenant du xylène pendant longtemps ont développé le ralentissement de la signalisation du nerf spécialement dans le radius et le tibia, tandis que d'autres symptômes ont également été observés comme les crampes, l'engourdissement et la faiblesse. (Jovica *et al.*, 2004).

Les effets neurotoxiques observés concernaient l'impulsivité, le cancer, la vision altérée, les changements de comportement, l'incoordination, la saisie, la respiration élevée, l'hyperactivité aux stimuli, les spasmes et la réduction de l'acétylcholine. (Niaz *et al.*, 2015)

### 3.4. Effets hématologiques

L'exposition prolongée au xylène a entraîné une diminution de l'hémoglobine corpusculaire moyenne, une chute des leucocytes totaux en raison de la diminution du nombre de cellules par augmentation des monocytes et des réticulocytes.

Le xylène induit une leucocytose par une augmentation absolue du nombre de neutrophiles, alors qu'il entraîne une réduction de l'hémoglobine et des numérations érythrocytaires, mais le nombre de plaquettes reste élevé ; l'exposition chronique à l'o-xylène a été associée à une thrombocytopenie, une leucopénie et une anémie. (Niaz *et al.*, 2015)

### 3.5. Effets sur la reproduction

L'exposition à ces solvants a provoqué des effets indésirables sur les hormones de reproduction comme la réduction du prégnandiol 3-glucuronide (pd3G) dans la phase du corps jaune, l'hormone lutéinisante pré-ovulatoire (LH) et l'œstrone 3-glucuronide et la phase folliculaire plus élevée pd3G.

En ce qui concerne l'infertilité masculine, une diminution de la viabilité des spermatozoïdes et une diminution de la motilité ainsi qu'une diminution de l'acrosine libérée par les spermatozoïdes qui favorisent la pénétration du zona pellucida, la diminution de l'activité  $\gamma$ -Glutamyl transférase, le lactate déshydrogénase C4 (LDH-C4) le taux de fructose résultant de l'exposition au xylène. (Niaz *et al.*, 2015)

### 3.6. Effets sur le développement

Les isomères individuels du xylène et du xylène mélangé entraînent des effets toxiques sur le système reproducteur et sur les fœtus tels que des déformations du squelette du fœtus ; une interruption accrue de la formation osseuse ; des rougeurs et du sang dans les organes du fœtus ; la réduction du poids du fœtus et l'exposition au xylène à travers la peau pourrait entraîner un changement important dans les enzymes du fœtus. Il y avait des naissances spontanées ou des avortements chez les femmes qui travaillaient dans des laboratoires soumis au xylène. (Niaz *et al.*, 2015)

### 3.7. Effets gastro-intestinaux

Des symptômes tels que des nausées, des vomissements, un manque d'appétit et une gêne gastrique du (GIT) chez des travailleurs exposés à des vapeurs de xylène sont marquées. (Niaz *et al.*, 2015)

### 3.8. Effets cutanés

L'exposition cutanée aiguë de sujets humains au m-xylène non dilué dans des études par immersion manuelle a été associée à un érythème cutané transitoire (irritation), à une vasodilatation de la peau et à une sécheresse et une altération de la peau. (Engstrom et Riihimaki, 1979)

### 3.9. Cancer

Des études portant sur des travailleurs exposés à des solvants ont examiné les risques de cancer et de leucémie et suggèrent une relation possible entre l'exposition au xylène au charbon et la leucémie (Arp *et al.*, 1983).

Elles contiennent toutes deux des limites (par exemple un petit nombre de sujets, aucune concentration d'exposition, une composition inconnue du xylène et une exposition possible au benzène et à d'autres produits chimiques) qui empêchent une conclusion définitive concernant l'exposition cutanée au xylène et au cancer. Le développement de ces études impliquait probablement aussi une exposition par inhalation.

Des informations limitées ont été trouvées concernant la cancérogénicité de l'exposition cutanée au xylène chez les animaux. L'application du xylène (concentration, pureté et quantité non précisée) sur la peau pendant 25 semaines n'a entraîné aucune augmentation des tumeurs cutanées. (Berenblum I, 1941)

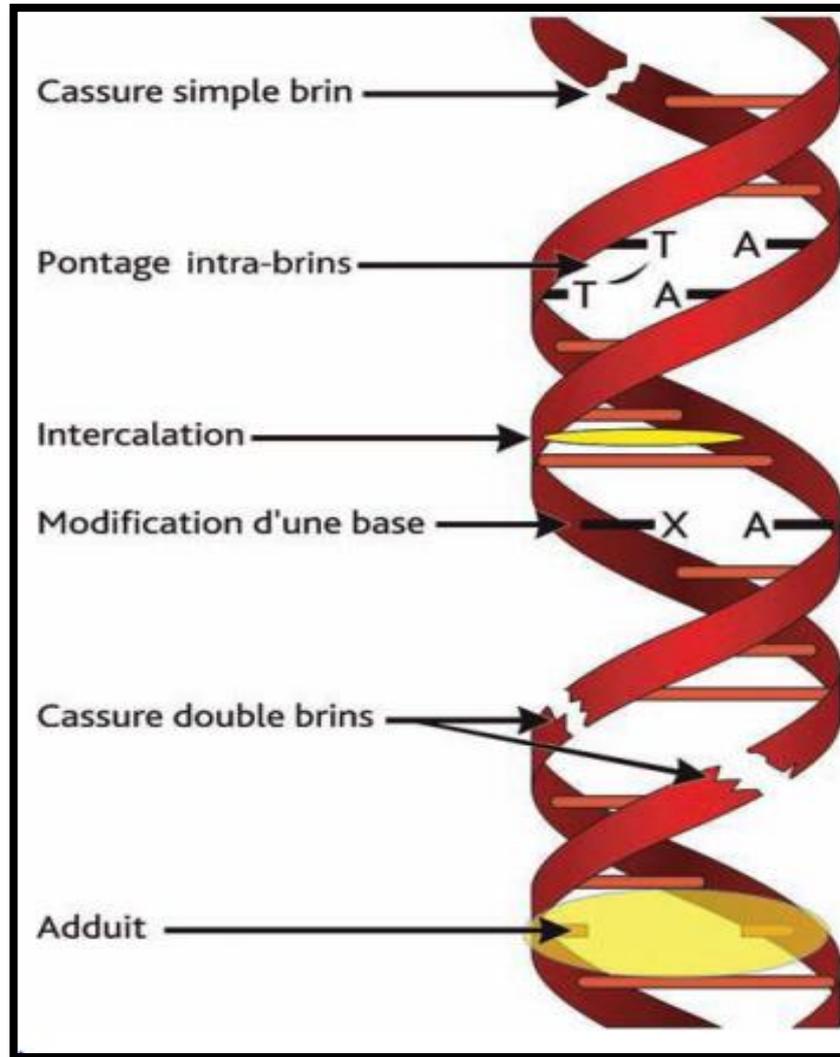
Cependant, deux études ont montré qu'un seul prétraitement au xylène a augmenté le nombre de tumeurs produites par une combinaison d'irradiation par rayons ultraviolets (initiation) et d'huile de croton (promotion) (Pound, 1970) ou d'uréthane (initiation) et d'huile de croton (Withers, 1963). Ces résultats suggèrent que le xylène peut être un promoteur pour le cancer de la peau et pourrait également agir comme initiateur ou cocarcinogène.

## 4. Génotoxicité du xylène

### 4.1. Définition de la génotoxicité

La génotoxicité d'un produit chimique est une caractéristique chimique intrinsèque dérivée du potentiel électrophile du produit, c'est-à-dire de son aptitude à se lier, dans les macromolécules cellulaires, à des sites nucléophiles tels que l'acide désoxyribonucléique (ADN), porteur de l'information génétique. La génotoxicité est donc une toxicité qui s'exerce sur le matériel génétique des cellules. (Jeanne Mager et Stellman, 2004)

Le xylène est considéré comme génotoxique lorsqu'il a la capacité d'altérer le matériel génétique des cellules. Plusieurs tests de génotoxicité ont permis de mettre en évidence le potentiel de certains isomères à induire des dommages au niveau des chromosomes et de l'ADN ou des mutations des gènes (figure 2).



**Figure 2:** Les différents types de lésions primaires de l'ADN. (Bickman et Smolen, 1994)

## 4.2. Tests de génotoxicité

À la différence des tests de susceptibilité génétique, qui évaluent l'information génétique d'un sujet afin de savoir, par exemple, si celui-ci pourrait être plus susceptible de développer une maladie suite à une exposition ou s'il va biotransformer d'une façon déterminée une substance (dépistage génétique), les tests de génotoxicité sont des biomarqueurs d'effet précoce (biomonitoring génétique) qui permettent de mettre en évidence

des altérations à niveau des chromosomes suite à l'exposition à des agents mutagènes/cancérogènes génotoxiques.

Dans ce sens, les tests de génotoxicité sont le seul outil qui permet de :

- Faire une évaluation du risque cancérogène chez les travailleurs exposés à des agents génotoxiques, de voir s'il y a un risque accru du fait d'être professionnellement exposés à des agents cancérogènes.
- Ce sont des biomarqueurs d'effet précoce, qui permettent d'évaluer si l'exposition à des agents génotoxiques se traduit par des lésions prédictives du risque de cancer.
- L'utilité des tests de génotoxicité est spécialement importante lorsqu'il y a une exposition multiple à des agents génotoxiques.
- Un autre avantage de ces tests est qu'ils évaluent les effets au niveau de la cible, le matériel génétique. (Ortega Eslava, 2000)

Les tests de génotoxicité évaluent les mutations au niveau du chromosome. Elles peuvent être de deux types :

- **Chromosomiques** : concernent l'ensemble des modifications qualitatives des chromosomes, de la structure des chromosomes ; elles surviennent à la suite d'une exposition à un agent clastogène, qui provoque des cassures des chromosomes.
- **Génomiques** : font référence aux anomalies chromosomiques quantitatives, à une modification du nombre de chromosomes ; elles surviennent à la suite d'un événement aneugène, qui affecte des chromosomes entiers.

Les principaux tests de génotoxicité sont :

#### **4.2.1. Aberrations chromosomiques (AC)**

Les aberrations chromosomiques (AC) sont caractérisés par des changements dans la structure chromosomique ou dans le nombre total de chromosomes, qui peuvent se produire à la fois spontanément et par suite de l'exposition à des agents physiques ou chimiques. Les altérations chromosomiques structurales peuvent être induites par plusieurs facteurs, tels que les ruptures d'ADN, l'inhibition de la synthèse de l'ADN et la réplication de l'ADN altéré. Pour évaluer les anomalies chromosomiques par le test d'*Allium cepa*, plusieurs types d'AC sont pris en compte dans les différentes phases de la division cellulaire (prophase, métaphase, anaphase et télophase). Cependant, cette analyse n'est pas simple à réaliser car elle nécessite une connaissance précise des phases de division cellulaire et de leurs éventuelles anomalies.

D'une manière simple, les AC, comme les ponts et les pauses chromosomiques, sont des indicateurs d'une action clastogénique, alors que les pertes, les retards, l'adhérence, la multipolarité et les métaphases C des chromosomes résultent d'effets aneugéniques. (Leme et Marin-Morales, 2009). Les aberrations chromosomiques peuvent être :

- **Chromatiniennes** (échanges, cassures,...)
- **Chromosomiques** (affectant les deux chromatides du chromosome : fragments acentriques, dicentriques, translocations,...).

Les aberrations chromosomiques indiquent un dommage stable et persistant (mutation) qui représente un événement potentiellement initiateur dans le processus qui mène au néoplasie. Le test est un biomarqueur d'effet précoce. Les AC persistent pendant la durée de vie des lymphocytes, ce qui fait que ce test soit applicable à l'évaluation d'une exposition cumulée. Le grand avantage de ce test est qu'il est le seul pour l'instant à avoir une valeur prédictive de la fréquence des AC pour le risque de cancer.

#### **4.2.2. Echanges entre chromatides sœurs (SCE)**

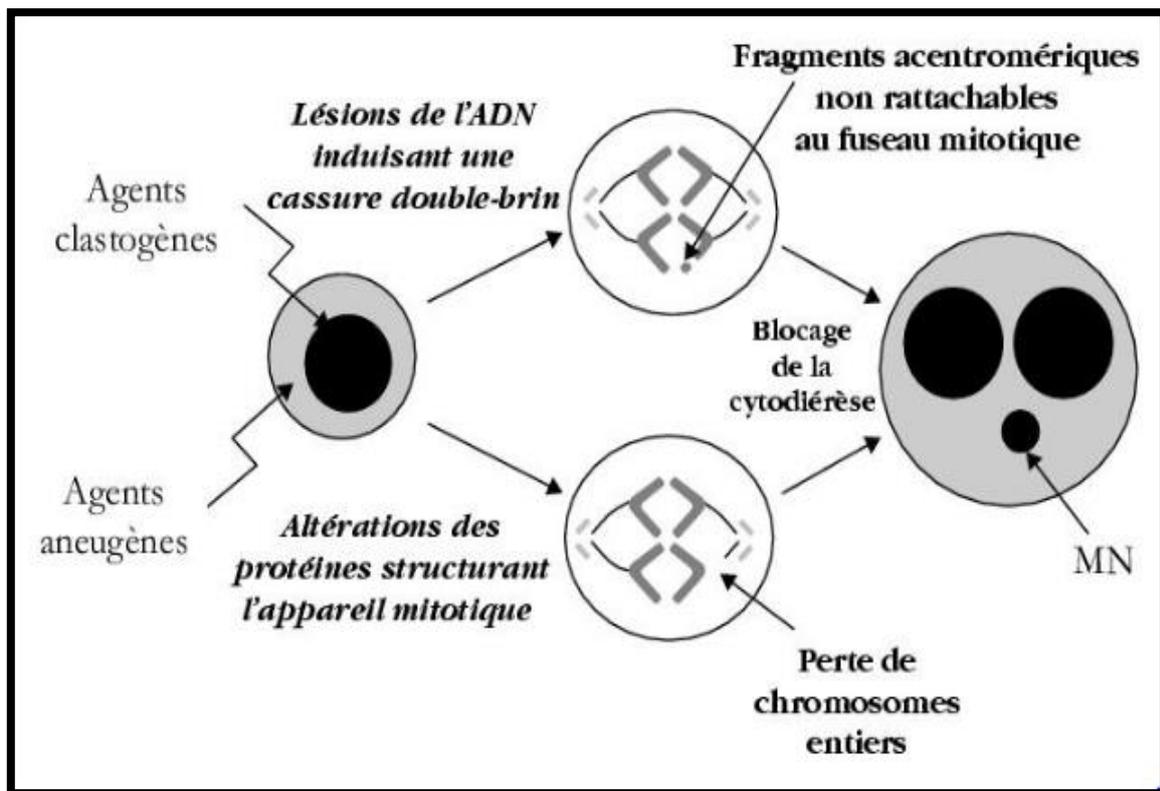
L'échange entre chromatides sœurs reflète des réarrangements de l'ADN à l'intérieur d'un même chromosome ; il s'agit d'un échange complet et réciproque entre les deux chromatides. Le test mesure le taux d'échanges entre chromatides sœurs survenus durant une mitose réalisée in vitro. Il évalue un événement stable, pas nécessairement une lésion fixée, exprimant la conséquence d'une exposition à des agents génotoxiques. Il est plutôt considéré comme un biomarqueur d'exposition. Le processus d'échange implique probablement une cassure et une réunion de l'ADN, cet essai fait appel à un système qui permet de différencier les deux chromatides sœurs et ainsi de visualiser les échanges. Cependant, l'analyse des métaphases est longue et les conséquences des SCE sont mal connues.

#### **4.2.3. Test des Micronoyaux (MN)**

Les micronoyaux sont constitués de chromosomes entiers perdus au cours de la mitose précédente (phénomène aneugène) ou de fragments chromosomiques acentriques exclus du noyau de la cellule fille pendant la division cellulaire (phénomène clastogène). (Ortega eslava., 2000). Les MN ont été considérés le paramètre le plus efficace et le plus simple pour analyser l'effet mutagène induit par les produits chimiques. Ceci est dû au fait que le MN résulte de dommages, non ou mal réparés, dans les cellules parentales, étant facilement observable dans les cellules filles comme une structure similaire au noyau principale, mais

dans une taille réduite. Ainsi, les MN découlent du développement de certaines AC, par exemple, des ruptures et des pertes chromosomiques. L'analyse des MN dans les cellules méristématiques est généralement effectuée avec les AC, ce qui prend plus de temps à être réalisé. Outre l'évaluation des effets mutagènes, l'analyse des MN permet également d'étudier les mécanismes d'action des agents chimiques.

La taille du MN peut être un paramètre efficace pour évaluer les effets clastogéniques et aneugéniques chez *A. Cepa*, car cette espèce présente un caryotype symétrique, homogène par rapport à la taille chromosomique, avec de grands et peu de chromosomes ( $2n = 16$ ). (Leme et Marin-Morales, 2009)



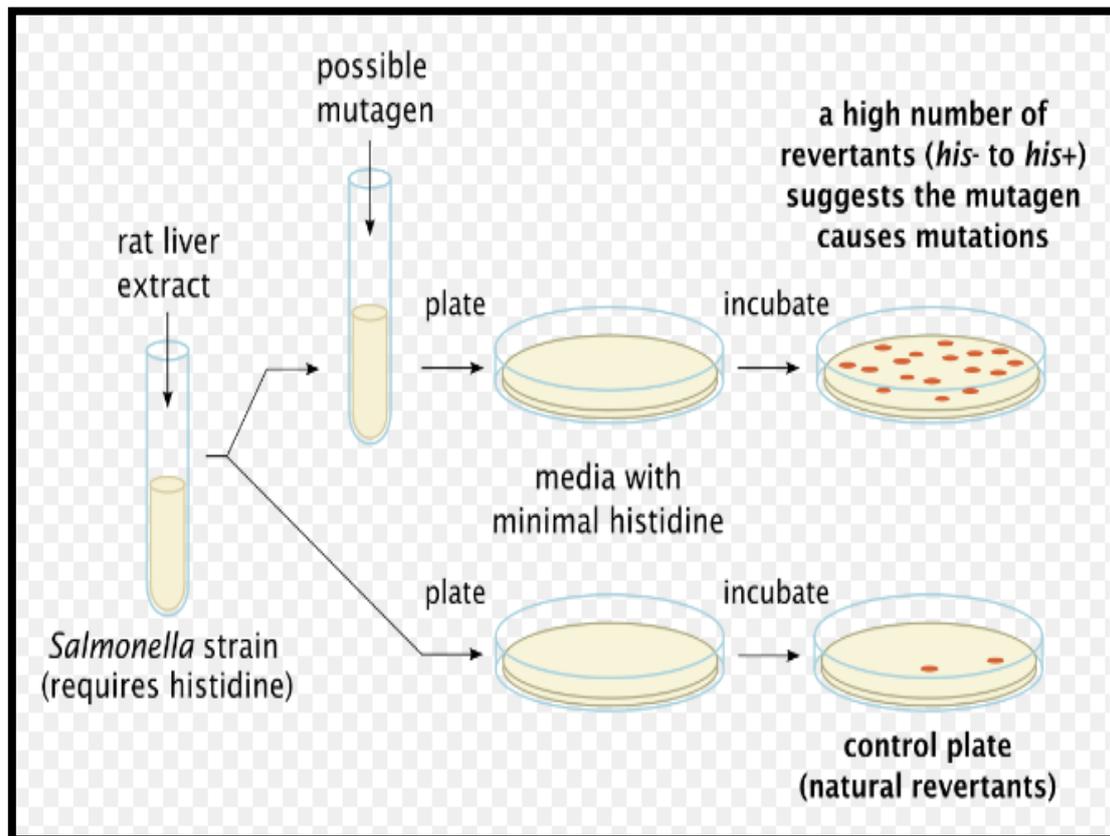
**Figure 3:** Schématisation de la formation des micronoyaux. (Cotelle, 1999)

#### 4.2.4. Test d'Ames

Le test d'Ames est un test de mutation génique qui consiste à examiner si une substance chimique est capable d'induire des mutations chez une bactérie : *Salmonella typhimurium* (His<sup>-</sup>). Les souches de *S. typhimurium* utilisées sont porteuses d'une mutation sur l'un des gènes gouvernant pour la synthèse de l'acide aminé histidine. Cette mutation (His<sup>-</sup>) rend les souches incapables de se développer sur milieu de culture dépourvu d'histidine.

Avec une fréquence propre à chaque souche, ces mutations (His-) peuvent réverter spontanément vers (His+). Les bactéries porteuses de cette mutation réverse, peuvent alors pousser sur milieu dépourvu de cet acide aminé.

La fréquence de ces mutations réverses peut être considérablement augmentée en exposant les bactéries à un agent mutagène. Le test d'Ames permet de quantifier l'induction de cette mutation réverse (His+). (Maron et Ames, 1983)



**Figure 4:** Principe d'application du test d'Ames. (Maron et Ames, 1983)

#### 4.2.5. Test des comètes

Le test des comètes permet de quantifier les lésions primaires de l'ADN, notamment les cassures de l'ADN, qui représentent une des lésions à forte probabilité d'apparition après exposition à des agents mutagènes.

Sur le plan technique, ce test des comètes (ou single cell gel electrophoresis assay) correspond à une technique d'électrophorèse sur micro gel d'agarose permettant de détecter des fragmentations de l'ADN de cellules individualisées. (Collins, 2004)

Le test réalisé dans sa version alcaline permet notamment la détection des cassures de l'ADN simple et double brin et aussi des sites de réparation incomplète d'alcali-labile. Les

sites de dommages à l'ADN peuvent aussi être révélés après traitement par des enzymes type endonucléase et glycosylase, qui vont générer des cassures visualisables par le test des comètes au niveau des lésions de l'ADN ; l'utilisation d'endonucléase peut ainsi permettre de détecter des lésions oxydatives des bases de l'ADN.

La réalisation pratique du test consiste, après lyse des membranes cellulaires, à la dénaturation de l'ADN en milieu fortement alcalin. L'ADN des cellules est ensuite placé dans un champ électrique permettant la migration différentielle des fragments. Compte tenu du faible voltage et ampérage, les molécules d'ADN intactes et donc trop lourdes pour avoir été déplacées par le champ électrique vont décrire une sphère compacte. Un ADN endommagé va, quant à lui, voir migrer ses fragments les plus courts en dehors de cette sphère, formant ainsi un " halo " d'ADN s'étirant en direction de l'anode.

Après l'électrophorèse, l'ADN est coloré avec un fluorochrome tel que le bromure d'éthyldium. Dans le cas d'un traitement alcalin, une étape de neutralisation est réalisée avant la coloration. Au moins 50 cellules sont analysées avec un système d'analyse d'image afin de déterminer plusieurs paramètres associés aux lésions de l'ADN :

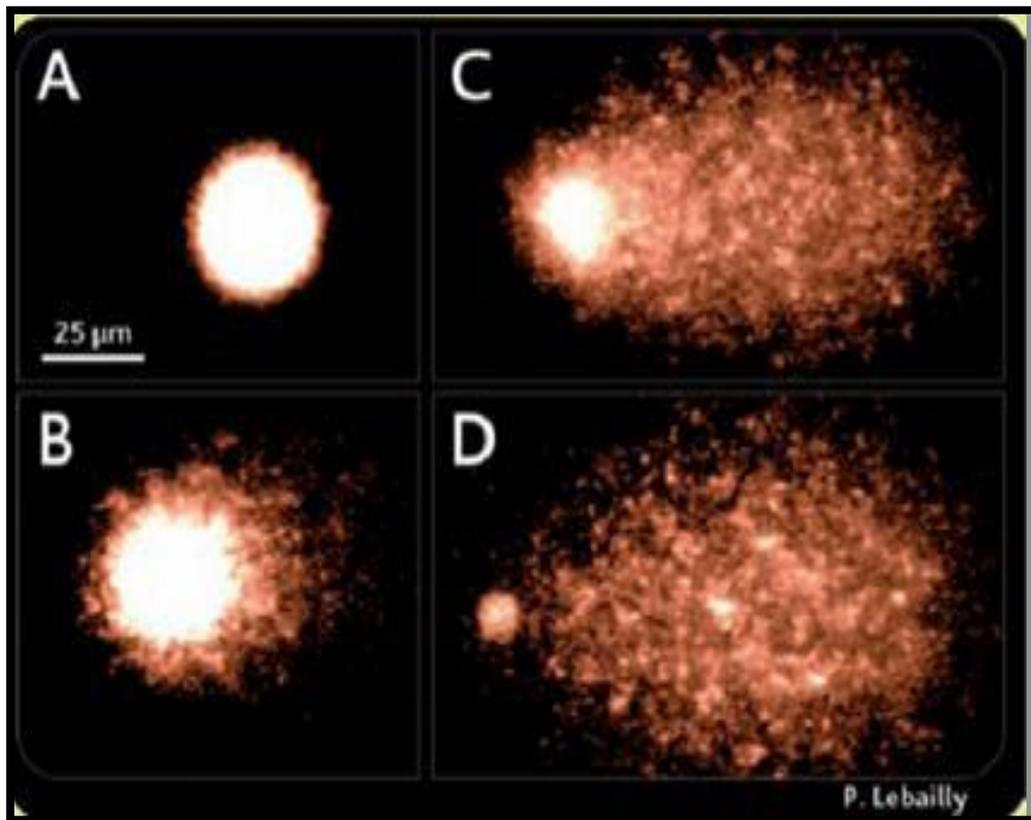
- Longueur de la comète (comet length ou CL) qui correspond à la longueur totale de la comète exprimée en  $\mu\text{m}$ .
- Longueur de la queue de la comète (tail length ou TL) mesurée du centre du noyau jusqu'à la fin de la queue (exprimée en  $\mu\text{m}$ ).
- Le pourcentage d'ADN migré dans la queue de la comète par rapport à l'ADN total (tail DNA ou TD).
- Le moment de la queue de la comète qui correspond à la longueur de la queue multipliée par le pourcentage d'ADN.

Le test des comètes permet d'étudier les effets génotoxiques de composés ou préparations chimiques et d'en préciser la relation dose-effets : il faut dans ce cadre traiter in vitro des cultures cellulaires par l'agent étudié, en présence éventuellement de fraction S9 à fins de bio-activation métabolique, et analyser ensuite les cellules exposées. (Marzin, 1999). Le test est également applicable à des cellules végétales. (Gichner *et al.*, 2006)

Le test des comètes permet d'explorer les cellules sanguines (lymphocytes) ou d'autres types de cellules (cellules épithéliales buccales) de sujets exposés ; il peut donc être employée pour la surveillance du personnel exposé en médecine du travail (Moller *et al.*, 2000 ; Faust *et al.*, 2004). Il est aussi applicable en éco-toxicologie pour la surveillance des organismes aquatiques et/ou des végétaux. (Dixon *et al.*, 2002)

L'intérêt principal de ce test est de mettre en évidence un événement immédiat lié à une exposition génotoxiques. Un autre intérêt de ce test est d'analyser les cellules individuellement, ce qui permet d'avoir de grandes quantités de données pour des analyses statistiques robustes quant à la détection d'un effet génotoxiques chez un sujet.

Une évaluation semi-quantitative (classement en quatre catégories) ou quantitative (évaluation du taille moment) des taux de dommages peut ensuite être réalisée (figure.04). (Ostling et Johanson, 1984)



**Figure 5:** photographie du noyau dans le test de comète : (A) noyau intact, (B) légère comète, (C) comète, (D) noyau atypique. (Ostling et Johanson, 1984)

#### 4.2.6. Détection des adduits chimiques ou des dommages oxydatifs à l'ADN

Le suivi du personnel exposé peut faire appel à la mesure des adduits chimiques ou des dommages oxydatifs à l'ADN déclenchés par les substances génotoxiques, ce qui doit ici être considéré plus comme un marqueur d'exposition que comme un marqueur d'effet. (Farmer *et al.*, 1996)

La détection directe des adduits à l'ADN formés par les produits chimiques peut se faire par post-marquage au phosphore 32, par immun-marquage à l'aide d'anticorps dirigés

contre les adduits quand ils sont disponibles (Galati *et al.*, 2001) et par des méthodes chromatographiques souvent couplées à la spectrométrie de masse (Angerer *et al.*, 2007). Ces techniques sont notamment applicables en médecine du travail pour l'analyse des adduits au niveau des leucocytes sanguins (Tuominen *et al.*, 2002). Un prélèvement cellulaire, souvent sanguin, est donc nécessaire, ce qui montre le caractère relativement invasif de ce type d'analyse. De plus, en raison de la durée de vie courte de la plupart des adduits à l'ADN (moins de 2 jours), il est nécessaire de collecter les échantillons le plus rapidement possible après une exposition aiguë ou à la fin d'une exposition chronique.

La technique des adduits permet de détecter ces liaisons aux macromoléculaires comme l'ADN (adduit à l'ADN) ou les protéines (adduit aux protéines, à l'hémoglobine), lors de l'exposition de l'organisme à des doses biologiquement actives d'agents génotoxique. (Lohman, 1988)

#### 4.2.7. Test d'*Allium cepa*

Les plantes supérieures sont reconnues comme d'excellents modèles génétiques pour détecter les mutagènes de l'environnement et sont fréquemment utilisées dans les études de surveillance. Parmi les espèces de plantes, *Allium cepa* a été utilisé pour évaluer les dommages à l'ADN. (Leme et Marin-Morales, 2009)

*Allium cepa* est l'une des espèces comestibles d'un grand genre (*Allium*) composé de plus de 700 espèces (Burnie *et al.*, 1999). (Tableau 1)

**Tableau 1:** classification systématique de l'oignon (*Allium cepa*). (Vander Meer, 1993)

<b>Règne</b>	Plantae
<b>Sous-règne</b>	Tracheobionta
<b>Division</b>	Spermatophyta
<b>Classe</b>	Liliopodia
<b>Ordre</b>	Liliales
<b>Famille</b>	Liliaceae
<b>Genre</b>	<i>Allium</i> L.
<b>Espèce</b>	<i>Allium cepa</i> L.

Parmi l'*Allium comestible*, l'oignon (*Allium cepa* L.). Le nom Onion est dérivé du latin, unio, qui signifie «une grande perle», elle a été utilisée dans les plantes médicinales et comme agent aromatisant indispensable.

Toute population d'*Allium cepa* possède ( $2X = 16$ ) chromosomes (Vander Meer, 1993), caractérisée par un haut pourcentage de division cellulaire, détection facile des aberrations chromosomiques après simple coloration.

Le test *Allium cepa* est l'une des rares méthodes directes pour mesurer les dégâts dans des systèmes qui sont exposés à des mutagènes ou des agents cancérigènes potentiels et permet d'évaluer les effets de ces dommages par l'observation d'altérations chromosomiques. Pour cette étude, il est nécessaire que l'échantillon reste en division mitotique constante, en cherchant à identifier les effets toxiques et les altérations sur un cycle cellulaire ; et le test *Allium cepa* a été largement utilisé à cette fin. Il est avantageux d'utiliser le système de test *Allium cepa* puisque son principal composant est une plante vasculaire, ce qui en fait un excellent modèle génétique pour l'évaluation des polluants environnementaux, la détection des mutagènes dans différents environnements et l'évaluation de nombreux points génétiques (mutations ponctuelles des altérations chromosomiques). (Levan., 1938)

Le test de génotoxicité de l'oignon permet un dépistage facile des produits chimiques ou des échantillons ayant des effets génotoxiques, en particulier pour les plantes. D'abord, on utilise habituellement un test de croissance des racines pour déterminer la valeur EC50 de l'allongement de la racine. Ensuite, l'échantillon est testé pour des aberrations chromosomiques et / ou des micronoyaux où la valeur EC50 sert à la concentration testée la plus élevée. (Feretti *et al.*, 2007)

# **CHAPITRE II**

**Matériel**

**et**

**Méthode**

## **Matériel et méthodes**

### **1. Organisme d'essai et conditions de croissance**

Les bulbes d'oignons ont été obtenus sur un marché local à Guelma et choisis selon leur taille (environ 5 cm de diamètre) et leur apparence. Les écailles extérieures et les racines anciennes ont été éliminées avec précaution avant de commencer l'expérience. Durant toutes les expériences réalisées, les bulbes sont incubés à l'obscurité à température ambiante (20-22 °C).

### **2. Préparation du xylène testé**

Différentes concentrations du xylène sont préparées dans de l'eau de robinet (1, 2, 3, 4, 5,6 µl/ml). L'eau de robinet est utilisée comme contrôle négatif.

### **3. Détermination de la CE50**

Pour ce test de toxicité, 42 bulbes sont utilisés pour toutes les concentrations, y compris le contrôle négatif (eau de robinet), 6 bulbes sont utilisées pour chaque concentration. Ils sont placés dans des pots remplis par chaque solution à tester de tel sort que la base de la racine principale se trouve plongée dans la solution. L'incubation se fait à l'obscurité pendant 2 jours dans de l'eau de robinet puis dans le xylène avec changement des solutions chaque 24 heure. Après 4 jours de traitement, la longueur des racines est mesurée. La moyenne de la longueur des racines traitées et contrôles sont représentées en fonction du pourcentage d'inhibition de l'élongation racinaire et les différentes concentrations du xylène. La concentration produisant 50% d'inhibition de la croissance des racines relativement au contrôle est calculée et exprimée comme étant CE50.

### **4. Index mitotique (IM) et le test d'aberrations chromosomiques**

Les concentrations utilisées dans ce test sont basé sur la valeur de la CE50 déterminées dans le test de toxicité. Les racines sont préparées pour la microscopie. Les extrémités des racines de chaque groupe d'essai ont été immédiatement placées dans un fixateur éthanol/acide acétique, (3/1) pendant 24 h à 4 °C, puis conservées dans l'éthanol 70% à 4 °C jusqu'à utilisation. Pour l'observation microscopique, six lames ont été préparées pour chaque groupe d'essai et codées. Les pointes des racines ont été hydrolysées pendant 8 minutes dans de l'HCL 1N à 60 °C et colorées par la réaction de

Feulgen, puis les 2 mm apicaux ont été écrasées dans une goutte d'acide acétique à 45% sur les lames, et des lamelles ont été abaissées avec précaution pour exclure les bulles d'air. Les lamelles ont été scellées aux lames avec un vernis à ongles clair. (Boumaza *et al.*, 2016)

### **5. Observation microscopique**

Les lames sont observées au microscope optique ( $\times 40$ ). Pour l'index mitotique, 1000 cellules classées en interphase et prophase (P), ou cellules en division (métaphase (M), anaphase (A), ou télophase (T) sont calculées. L'index mitotique est exprimé comme étant le nombre des cellules en division par toutes les cellules (Ozmen et Summer, 2004 ; Sehgal *et al.*, 2006) selon la formule :

$$\text{IM} = \frac{\text{P} + \text{M} + \text{A} + \text{T}}{\text{nombre totale des cellules}}$$

Les cellules ont été examinées pour l'étude des aberrations chromosomiques par chaque dose de xylène. Les catégories suivantes d'aberrations ont été étudiées : fragments chromosomiques, c-mitose, pont, perte de chromosome, et autres aberrations.

### **6. Analyse statistique**

Toutes les données sont exprimées en moyenne  $\pm$  SD. Les différences statistiquement significatives entre les données du contrôle et les différentes concentrations du xylène sont déterminées par le test ANOVA suivie du test Dunnett bilatéral. La régression linéaire pour la détermination de la concentration efficace 50% (CE50) est effectuée en utilisant XLSTAT pour Windows. Le niveau de signification statistique est déterminé à  $p \leq 0.05$ .

# **CHAPITRE III**

**Résultats**

**et**

**Discussion**

## Résultats et discussion

Pour permettre l'évaluation des effets ou des dégâts causés par les agents mutagènes, il est nécessaire que les cellules utilisées comme modèle expérimental soit en division mitotique constante, en cherchant à identifier les effets toxiques et les altérations survenant au cours d'un cycle cellulaire. Pour ce faire, il existe le test *Allium cepa*, largement utilisé pour cet objectif. (Silva et Fonseca, 2003)

Dans la présente étude, la toxicité et la génotoxicité du xylène sont évaluées par le test *Allium cepa* en prenant en considération trois paramètres : l'inhibition de l'élongation racinaire qui permet de déterminer la CE50, l'effet sur l'index mitotique et l'étude des aberrations chromosomiques.

### 1. Test d'inhibition de l'élongation racinaire

La toxicité du xylène est évaluée en adoptant la méthode déterminant la CE50 qui correspond à la concentration qui provoque 50% de l'inhibition de l'élongation racinaire. Les résultats de ce test sont représentés dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Elongation racinaire et pourcentage d'inhibition.

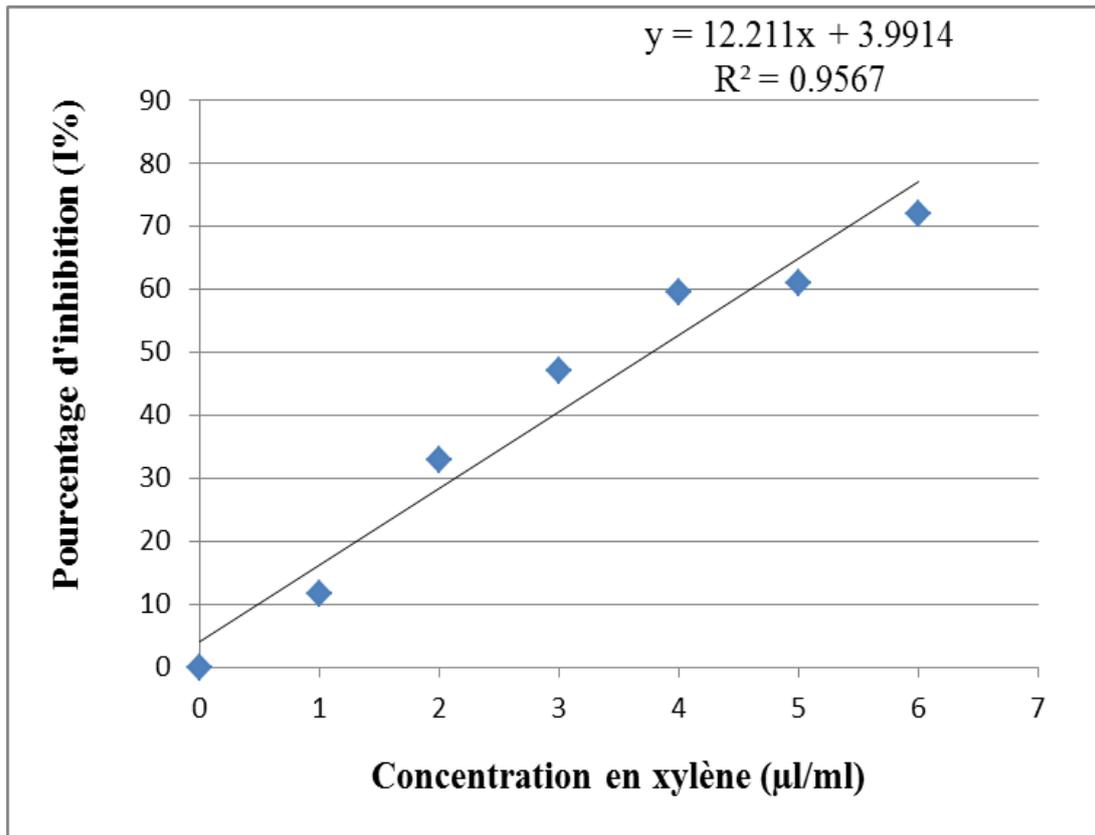
Paramètres	Contrôle-96h	1 µl/ml	2 µl/ml	3 µl/ml	4 µl/ml	5 µl/ml	6 µl/ml
ER(%) ± SD	100.77 ± 7.51	89.21 ± 7.89b	67.79 ± 8.37c	53.66 ± 4.31d	41.15 ± 4.91e	39.72 ± 3.35e	28.66 ± 2.76f
I (%)	/	11.55	32.97	47.11	59.61	61.04	72.1

ER (%) : Elongation Racinaire en pourcentage

I (%) : pourcentage d'Inhibition de l'élongation racinaire

\*Les pourcentages de l'élongation racinaire avec la même lettre ne présentent aucune différence significative entre eux ( $p > 0.05$ )

La représentation graphique du pourcentage d'inhibition de l'élongation racinaire (I%) en fonction des concentrations du xylène montre une relation proportionnelle, avec un coefficient de corrélation  $R^2 = 0.956$  (effet dose réponse). La concentration efficace CE50= 3.77 µl/ml.



**Figure 6:** Effet inhibiteur des différentes concentrations du xylène sur l'élongation racinaire d'*Allium cepa*.

## 2. Index mitotique (IM)

L'effet du xylène sur l'index mitotique du méristème racinaire d'*Allium cepa* est présenté dans le tableau 3. L'indice mitotique (IM), caractérisé par le nombre total de cellules en division dans le cycle cellulaire, a été utilisé comme paramètre pour évaluer la cytotoxicité de plusieurs agents.

Les niveaux de cytotoxicité d'un agent peuvent être déterminés par l'augmentation ou la diminution de l'IM. Les résultats obtenus dans la présente étude montre une diminution inversement proportionnelle de IM en fonction des concentrations du xylène. Les IM enregistrés sont significativement inférieurs par rapport au contrôle négatif, ce qui peut indiquer des altérations dérivant de l'action chimique sur la croissance et le développement des cellules méristématiques exposées. La réduction des IM est un indicateur important dans la surveillance de la pollution de l'environnement et les contaminants, en particulier ceux qui

présentent un potentiel toxique et cytotoxique et/ou génotoxique. (Leme et Marin-Morales, 2009)

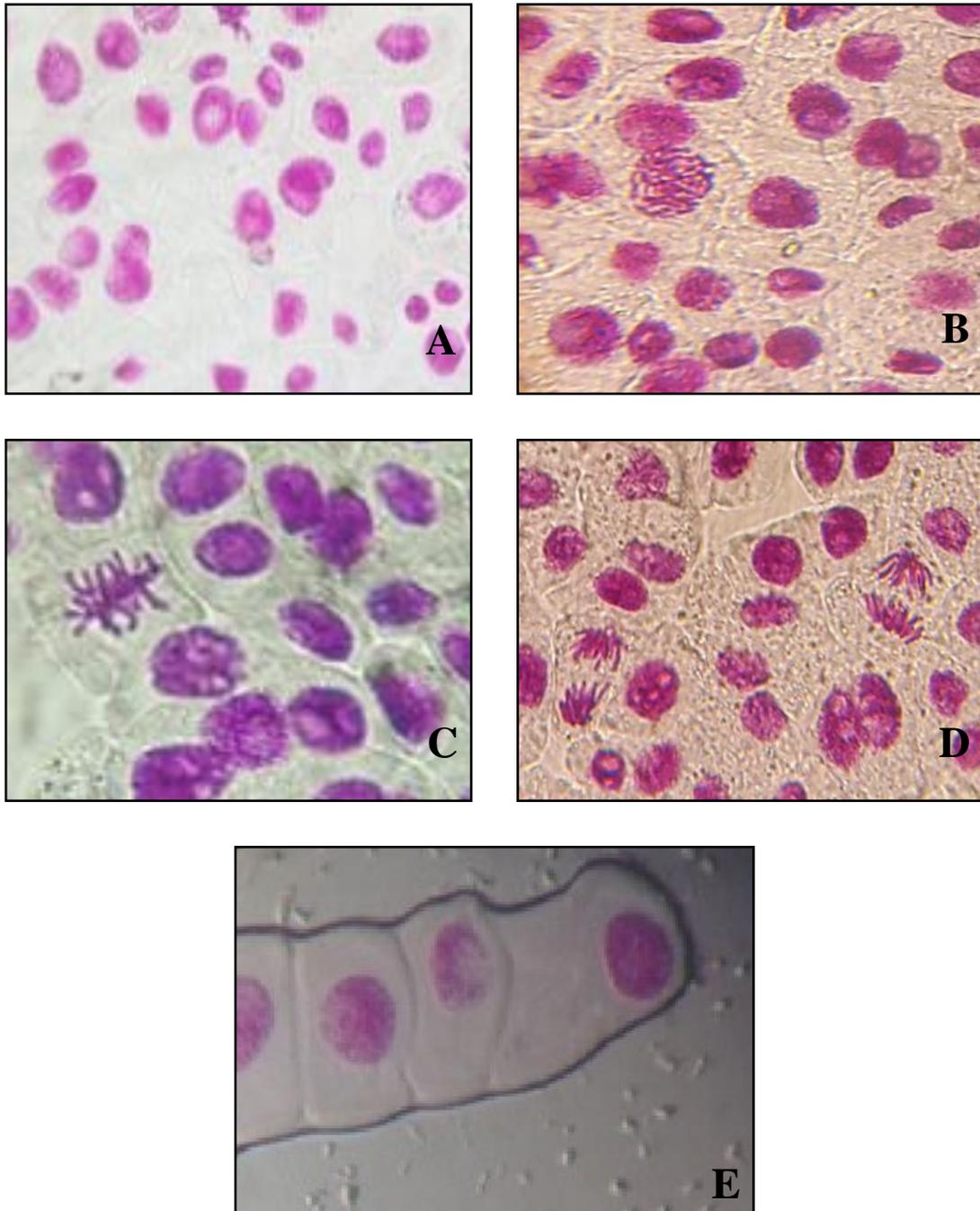
**Tableau 3:** effets du xylène sur les phases mitotiques (PM) et l'index mitotique (IM) des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa*.

Concentration ( $\mu\text{l/ml}$ )	IM (moyenne $\pm$ SD) (%)	Moyenne des phases mitotiques PM (%) $\pm$ SD*			
		Int + Pro	Met	Ana	Tel
2	91.07 $\pm$ 0.75b	67.7 $\pm$	4.38 $\pm$	3.52 $\pm$	24.38 $\pm$
		6.45	0.94a	0.79a	3.24a
4	65.05 $\pm$ 2.83d	77.06 $\pm$	1.08 $\pm$	1.44 $\pm$	20.39 $\pm$
		5.47	0.28c	0.64b	1.92a
6	43.99 $\pm$ 1.91f	93.25 $\pm$	0.63 $\pm$	1.61 $\pm$	4.49 $\pm$
		4.83	0.26c	0.67b	3.09c

L'index mitotique reflète la fréquence de la division cellulaire et il est considéré comme un paramètre important dans l'évaluation de la toxicité d'une substance en nous renseignant sur la possibilité de l'analyse génotoxicologique, parce qu'un index mitotique inférieur à 10 signifie qu'il n'y a pas suffisamment de cellules en division pour qu'elles soient analysées. (Rank J, 2003)

L'inhibition de la croissance des racines est généralement liée à l'activité méristématique apicale (Webster et Macleod, 1996), et à l'allongement cellulaire au cours de la différenciation (Fusconi *et al.*, 2006). Selon (Asita OA et Matebesi LP, 2010), la signification de l'index mitotique ne réside pas uniquement dans la possibilité de l'analyse toxicogénétique, mais il reflète lui-même la toxicité d'une substance testée.

La diminution de ce paramètre est considérée comme un signe de toxicité par plusieurs auteurs (Saxena P.N *et al.*, 2005). Donc, il est possible que la diminution observée de l'IM dans notre étude soit due à la toxicité du xylène qui peut inhiber la synthèse d'ADN ou bloquer la phase G2 du cycle. (Mesi *et al.*, 2003) ont désigné des valeurs limites cytotoxiques pour l'IM : une diminution en dessous de 22% du contrôle négatif provoque des effets létaux sur l'organisme d'essai tandis qu'une baisse inférieure à 20% provoque des effets sublétaux.



**Figure 7:** Cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* en division régulière et normale :  
(A) interphase, (B) prophase, (C) métaphase, (D) anaphase, (E) télophase.

### 3. Test des aberrations chromosomiques (AC)

Les AC sont caractérisés par des changements dans la structure chromosomique ou dans le nombre total de chromosomes, qui peuvent se produire à la fois spontanément et par suite de l'exposition à des agents physiques ou chimiques. Les altérations chromosomiques structurales peuvent être induites par plusieurs facteurs, tels que les ruptures d'ADN, l'inhibition de la synthèse de l'ADN et la réplication de l'ADN altéré. Les AC numériques, par exemple. L'aneuploïdie et la polyploïdie sont les conséquences d'une ségrégation anormale des chromosomes, qui peut se produire soit spontanément soit par l'action d'agents aneugènes. (Albertini *et al.*, 2000). Les résultats du test des aberrations chromosomiques sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4:** Effet génotoxique du xylène sur le méristème racinaire d'*Allium cepa*.

Revoir le calcul des AC%

Concentration µl/ml	Nombre des cellules	fragments	ponts	C- mitose	perte	Autre	ACT	AC%
0	770	34	0	0	25	0	59	7.66
1	772	90	3	50	77	13	233	30.18**
2	577	101	7	59	78	27	272	47.14**
3	593	93	13	105	68	9	288	48.56**
4	520	100	9	175	59	7	350	67.30***
5	591	193	16	150	20	1	380	64.29***
6	364	105	0	18	0	0	123	33.79**

AC : Aberrations Chromosomiques, (\*\*): très significatif ( $p < 0.01$ ), (\*\*\*) : très hautement significatif ( $p < 0.001$ ).

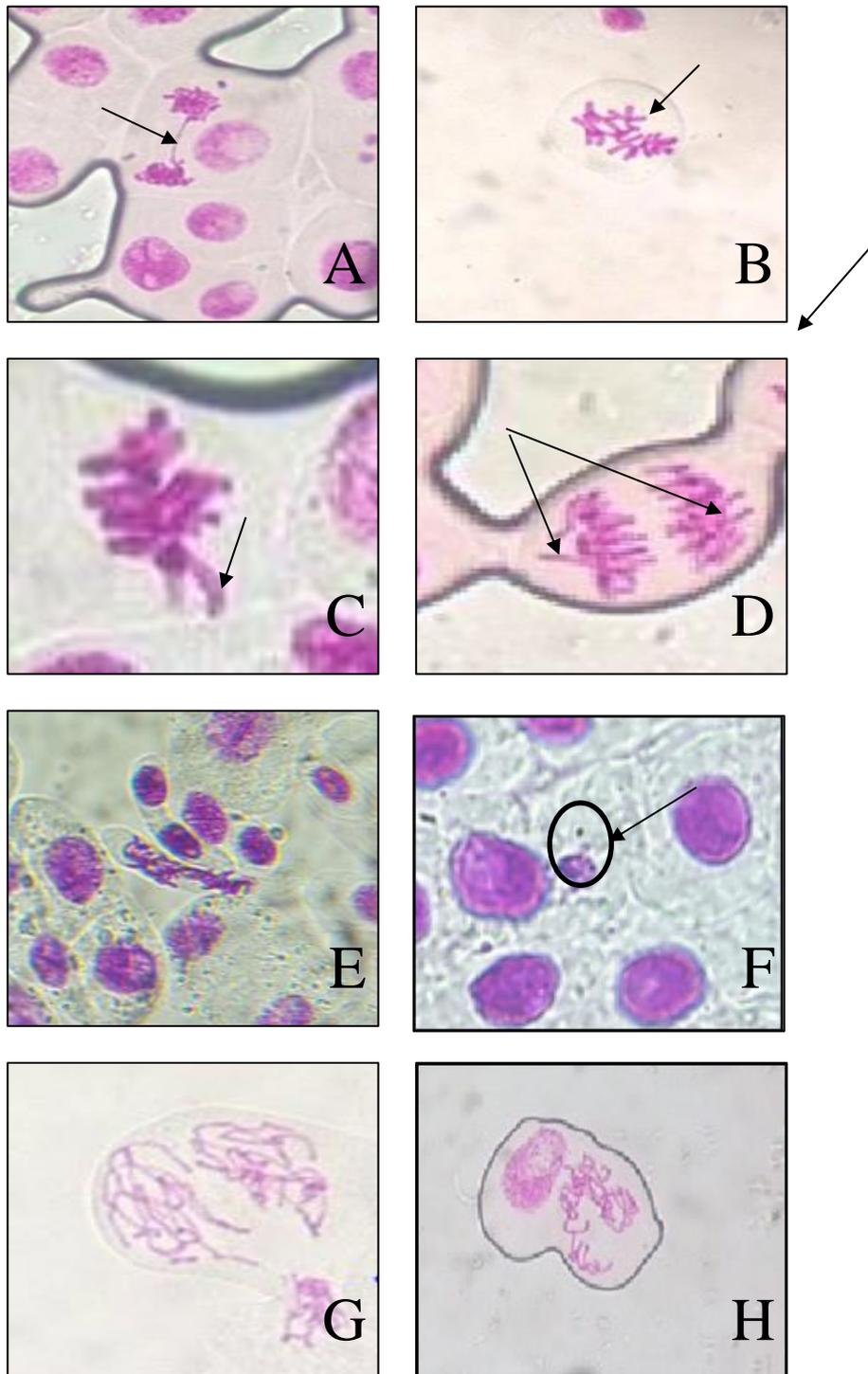
Les ponts et les fragments chromosomiques, sont des indicateurs d'une action clastogènes, tandis que les pertes de chromosomes, les retards, l'adhérence, la multipolarité et C-métaphases résultent d'effets aneugènes.

Les ponts de chromatine pourraient se produire au cours de la translocation et l'échange de chromatides inégale et provoquent des mutations structurelles chromosomiques. Ce type d'anomalie a également été observé dans la mitose d'*Allium cepa* après les traitements avec le xylène. (Borboa et C, 1996)

Les ponts peuvent être chromosomique due à la rigidité et l'incapacité subséquent de la séparation de l'anaphase libre. Ces ponts sont habituellement formés par chromatides sœurs jointes qui restent ensemble jusqu'à la fin de l'anaphase ou la télophase. Si ces liaisons deviennent trop fortes, les chromatides peuvent se briser. (Gomurgen, 2005 ; Turkoglu, 2007 ; El Ghamery *et al.*, 2000 ; Luo *et al.*, 2004)

La présence de C-métaphase indique des effets sur l'organisation de la chromatine, qui peut être liée à un déséquilibre des protéines responsables de la structure de la chromatine nucléaire (Kuras *et al.*, 2006). Le présent essai montre que le xylène peut avoir des effets génotoxiques à une certaine dose.

La présence de c-métaphase dans les cellules était la preuve de l'action de xylène concerné sur le fuseau mitotique (Matsumoto *et al.*, 2006). Au vue de toutes ces données et les résultats obtenus, on peut dire que notre étude a montré un effet génotoxique du xylène. La formation de micronoyaux implique une perte de matériel génétique et une rupture de l'ADN, ce qui signifie à un effet clastogène ou aneugène. (Sudhakar *et al.*, 2001)



**Figure 8:** Les types d'aberrations chromosomiques dans le méristème racinaire d'*Allium cepa* exposé au xylène : (A) : anaphase avec pont chromosomique, (B) : métaphase avec chromosome perte, (C) : métaphase avec fragment chromosomique, (D) : anaphase avec chromosome pause, (E) : c-métaphase, (F) : micronoyau, (G, H) : autres aberration chromosomiques.

**Conclusion**  
**et**  
**Perspectives**

## **Conclusion et perspectives**

En conclusion, le xylène a montré un effet génotoxique remarquable au niveau des cellules méristématiques racinaires d'*Allium cepa* en induisant majoritairement des fragmentations, des c-mitose et des ponts. Ces résultats suggèrent un potentiel cancérigène possible du xylène, donc plus de précautions sont recommandées lors de l'exposition.

La présente étude a montré en plus l'utilité du test d'aberrations chromosomiques réalisé sur *Allium cepa* dans l'évaluation de la génotoxicité des produits chimiques.

En perspective, d'autres types de tests de génotoxicité sont recommandés en utilisant d'autres modèles expérimentaux pour donner plus de détails concernant le mécanisme précis de génotoxicité. Pour une étude plus précise, une enquête épidémiologique associée aux tests de génotoxicité chez le personnel des laboratoires serait plus utiles

# **Références**

# **Bibliographiques**

## Références bibliographiques

---

- Albertini, D. Anderson, G.R. Douglas, L. Hagmar, K. Hemmink, F. Merlo, A.T. Natarajan, H. Norppa, D.E. Shuker, R. Tice, M.D. Water, A. Aitio, (2000). IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans, International Programme on Chemical Safety, *Mutat. Res.* 463 111–172.
- Angerer J, Ewers U and Wilhelm M, (2007). Human biomonitoring: state of the art. *Int J Hyg Environ Health* 210:201-228.
- Arp EW Jr, Wolf PH, Chekoway H, (1983). Lymphocytic leukemia and exposures to benzene and other solvents in the rubber industry. *J Occup Med* 25:598-602.
- Asita Okorie Asita et Matebesi L. P, (2010). Genotoxicity of hormoban and seven other pesticides to onion root tip meristematic cells, *African Journal of Biotechnology* Vol. 9 (27), pp. 42254232.
- Berenblum I, (1941). The cocarcinogenic action of croton resin. *Cancer Res* 1:44-48.
- Bickman, J.W; Smolen, M.J, (1994). Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environmental Health Perspectives*, 102, 2528.
- Borboa. L, C. De La Torre, (1996). The genotoxicity of Zii (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells, *New Phytol.* 134 481–486.
- Boumaza, A., Lalaoui, K., Khallef, M., Sbayou, H., Talbi, H., and Hilali, A, (2016). Assessment of Cytotoxic and Genotoxic Effects of Clodinafop-propargyl Commercial Formulation on *Allium cepa* L.
- Burnie G, Forrester S, Greig D, Guest S, Harmony M, Hobley S, Jackson G, Lavarack P, Melanie L, Donald RM, Macoboy S, Molyneux B, Moodie D, Moore J, North T, Newan D, Pienaar K, Purdy G, Silk J, Ryan S and Schien G, (1999). *Botanica: The illustrated A-Z of over 10,000 garden plants*, (3<sup>rd</sup> Ed.), Random House Australia Pty Ltd, New South Wales, pp 74.
- Collins AR, (2004). The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26:249-261.
- Cotellet S, (1999). Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide de plantes supérieures, Thèse de Doctorat de L'Université de Metz, soutenue le 22 janvier 1999
- Dixon DR, Pruski AM, Dixon LR and Jha AN, (2002). Marine invertebrate ecogenotoxicology: a methodological overview. *Mutagenesis* 17:495-507.

## Références bibliographiques

- El Ghamery, A.A, El Nahas, A.I, Mansour, M.M, (2000). The action of atrazine herbicide as an indicator of cell division on chromosomes and nucleic acid content in root meristems of *Allium cepa* and *Vicia faba*. *Cytologia* 65, 277–287.
- Engstrom J, Riihimaki V, (1979). Distribution of m-xylene to subcutaneous adipose tissue in short-term experimental human exposure. *Stand J Work Environ Health* 5:126-134.
- Fang Z, Sonner J, Laster MJ, Ionescu P, Kandel L, Koblin DD, et al., (1996). Anesthetic and convulsant properties of aromatic compounds and cycloalkanes: implications for mechanisms of narcosis. *Anesth Analg.* 83:1097-104.
- Farmer PB, Sepai O, Lawrence R, Autrup H, Sabro Nielsen P, Vestergard AB, Waters R, Leuratti C, Jones NJ, Stone J, Baan RA, van Delft JH, Steenwinkel MJ, Kyrtopoulos SA, Souliotis VL, Theodorakopoulos N, Bacalis NC, Natarajan AT, Tates AD, Haugen A, Andreassen A, Ovrebo S, Shuker DE, Amaning KS, Castelain P and et al.,(1996). Biomonitoring human exposure to environmental carcinogenic chemicals. *Mutagenesis* 11:363-381.
- Faust F, Kassie F, Knasmuller S, Boedecker RH, Mann M and Mersch-Sundermann V, (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 566:209-229.
- Feretti, d., zerbini, i., zani, c., ceretti, e., moretti, m., monarca, s, (2007). *Allium cepa* chromosome aberration and micronucleus tests applied to study genotoxicity of extracts from pesticide-treated vegetables and grapes. *Food Addit. Contam.* 24 (6): 561-572.
- Fusconi, A., Repetto, O., Bona, E., Massa, N., Gallo, C., DumasGaudot, E., Berta, G, (2006). Effect of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 58, 253–260.
- Galati R, Zijno A, Crebelli R, Falasca G, Tomei F, Iecher F, Carta P and Verdina A , (2001). Detection of antibodies to the benzo (a) pyrene diol epoxide-DNA adducts in sera from individuals exposed to low doses of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Exp Clin Cancer Res* 20:359-364.
- Gichner T, Patkova Z, Szakova J and Demnerova K, (2006). Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 65:420-426.

## **Références bibliographiques**

- Gomurgen A.N, (2005). Cytological effect of the potassium metabisulphite and potassium nitrate food preservative on root tips of *Allium cepa* L. *Cytologia*, 70: 119128.
- Hood RD, Ottley MS, (1985). Developmental effects associated with exposure to xylene: a review. *Drug Chem Toxicol.* 8:281-97.
- Jeanne Mager, Stellman, (2000-2004). *Encyclopédie de sécurité et de santé au travail.* 3e éd. française: Annick Viro. ISBN : 92-2-209203-1
- Jovica M. Jovanoviæ, Milan M. Jovanoviæ, Mirjana J. Spasiæ1, Stevo R. Lukiaæ1, (2004). Peripheral Nerve Conduction Study in Workers Exposed to a Mixture of Organic Solvents in Paint and Lacquer Industry. 45(6), 769-774.
- Kurás M, Nowakowska J, Sliwinska E, Pilarski R, Ilasz R, Tykarska T, Zobel A, Gulewicz K, (2006). Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium test* induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J Ethnopharmacol* 107: 211-221.
- Kandyala R, Raghavendra SPC, Rajasekharan ST, (2010). Xylene: an overview of its health hazards and preventive measures. *J Oral Maxillofacial Pathol.* 14(1):1–5.
- Lefebvre G. *chimie des hydrocarbures.* Paris: 1978, 46-182. ISBN : 2.7108-0342-9
- Leme, D.M., and Marin-Morales, M.A, (2009). *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 682, 71–81.
- Levan, A, (1938). The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*, *Hereditas*, 24, pp. 471- 486, ISSN 0018-0661.
- Lohman P.H.M-Adducts, In: Baritsh H, hemminki K, O'NEIL I.K, (1988). Methods for detecting DNA damaging agents in humans. Lyon, IARC. IARC Scientific Publications 9, pp.1320
- Luo, L.Z, Werner, K.M, Gollin, S.M, Saunders, W.S, (2004). Cigarette smoke induces anaphase bridges and genomic imbalances in normal cells. *Mutat. Res.* 554, 375–385.
- Mackay, d., shiu, w.y. and ma, k.c, (1992). *Illustrated handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals*, Volume 1, Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Maron D.N, Ames B.N, (1983). Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Research.* 113, 173-215.

## Références bibliographiques

- Marzin D, (1999). New approaches to estimating the mutagenic potential of chemicals. *Cell Biol Toxicol* 15:359-365.
- Matsumoto ST, Mantovani MS, Malagutti MI, Dias AL, Fonseca I.C, MarinMorales MA, (2006). Assessment of the genotoxic and mutagenic effects of chromium residues present in tannery effluents using the micronucleus and comet assay in *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in of *Allium cepa*. *Genetics and Molecular Biology*, 29: 148158.
- Mesi A., Kopliku D., (2013). *Food Environ Procedia Technol.* 8: 19 – 26.
- Moller P, Knudsen LE, Loft S and Wallin H, (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:1005-1015.
- Negraia Casu, G, (2010). Impact écotoxicologique des hydrocarbures monoaromatiques dans l'environnement au Canada. Université de Sherbrooke.
- Niaz, K., Bahadar, H., Maqbool, F., and Abdollahi, M, (2015). A review of environmental and occupational exposure to xylene and its health concerns. *EXCLI Journal* 14, 1167.
- Ogata M, Tomokuni K, Takatsuka Y, (1970). Urinary excretion of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m- or p-xylene as a test of exposure. *Br J Ind Med.* 27:43–50.
- Ortega Eslava Maria Isabel, (2000). Exposition professionnelle aux antinéoplasiques: surveillance du risque cancérigène. *Revue de la littérature. Médecine du Travail et Ergonomie.* Vol XXXVII (2): 57-81
- Ostling O, Johanson KJ, (1984). Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291298.
- Ozmen, A. & Summer, S, (2004). Cytogenetic effects of kernel extracts from *Melia azedarach* L., *Caryologia*, 57, pp. 290–293.
- Pound AW, (1970). Induced cell proliferation and the initiation of skin tumour formation in mice by ultraviolet light. *Pathology* 2:269-275.
- Rank, J, (2003). The method of *Allium* anaphase–telophase chromosome aberration assay. *Ekologija*, 38–42.
- Rogers JV, Gunasekar PG, Garrett CM, McDougal JN, (2001). Dermal exposure to m-xylene leads to increasing oxidative species and low molecular weight dna levels in rat skin. *J Biochem Mol Toxicol.* 15: 228-30.

## **Références bibliographiques**

- Roney, N., and Navarro, H.A, (1994). Toxicological Profile for Toxaphene: Draft (US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Agency for Toxic Substances and Disease Registry).
- Savolainen K, Kekoni J, Riihimäki V, Laine A, (1984). Immediate effects of m-xylene on the human central nervous system. Arch Toxicol (Suppl). 7:412-7.
- Saxena, P.N, Chauhan, L.K.S, Gupta, S.K, (2005). Cytogenetic effects of commercial formulation of cypermethrin in root meristem cells of *Allium sativum*: Spectroscopic basis of chromosome damage. Toxicology 216, 244–252.
- Sehgal,R, Roy, S. & Kumar, D.V.L, (2006). Evaluation of cytotoxic potential of latex of *Calotropis procera* and Podophyllotoxin in *Allium cepa* root model, Biocell, 30, 1, pp. 913, ISSN 16675746.
- Silva, J. & Fonseca, M.B, (2003). Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana, In: Genética Toxicológica, Silva, J., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P. (Orgs.), pp. 69-84, Ed. Alcance, Porto Alegre.
- Sudhakar r, gowda n and venu g, (2001). Mitotic abnormalities induced by silk dyeing industry effluents in the cells of *allium cepa*. Cytologia 66: 235–239.
- Tassaneeyakul W, Birkett DJ, Edwards JW, Veronese ME, Tukey RH, Miners JO, (1996). Human cytochrome P450 isoform specificity in the regioselective metabolism of toluene and o-, m-and p-xylene. J Pharmacol Exper Ther. 276:101-8.
- Tuominen R, Baranczewski P, Warholm M, Hagmar L, Moller L and Rannug A ,(2002). Susceptibility factors and DNA adducts in peripheral blood mononuclear cells of aluminium smelter workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. Arch Toxicol 76:178-186.
- Turkoglu. S, (2007). Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 626: 414.
- Vander Meer QP, (1993). *Allium cepa* L.cv.Groupe Common Onion.In: Siemonsma J.S., KasemPiluek. Plant resources of South-East Asia. PudocScientific publishers 8, 68-71.
- Webster, P.L, MacLeod, R.D, (1996). The root apical meristem and its margin. In: Waishel, Y., Eshel, A., Kafkafi, U. (Eds.), Plant Roots. The Hidden Half, second ed. Marcel Dekker, New York, pp. 51–76.
- Withers HR, (1963). The influence of some irritant chemicals and scarification on tumour initiation by urethane in mice. Br J Cancer 17:460-470.

# Résumés

## **Abstract**

In the present study, the cytotoxic and genotoxic potential of xylene was determined using *Allium cepa* root cells. The EC50 value was determined using a root growth inhibition test, and the roots were then treated with different concentrations. The results indicate that xylene significantly decreased the mitotic index (MI) in all treatments as compared to the control group in a dose-dependent manner. On the other hand, xylene affected the percentage of mitotic stages. The types of abnormalities observed were fragments that appeared to be the most common type, bridges, C-mitosis, laggards, and chromosome loss. The data obtained in this study showed that plant bioassays are a useful and important test battery for detecting the possible genotoxicity of chemicals.

**Keywords:** Chromosomal aberration, *Allium cepa*, cytotoxicity, genotoxicity, mitotic index, xylene.

## Résumé

Dans la présente étude, le potentiel cytotoxique et génotoxique de xylène a été déterminé au niveau des cellules racinaire d'*Allium cepa*. La valeur EC50 a été déterminée en utilisant un test d'inhibition de la croissance des racines, puis les racines ont été traitées avec différentes concentrations. Les résultats indiquent que le xylène a diminué de façon significative l'indice mitotique (IM) dans tous les traitements comparativement au groupe témoin de manière dose-dépendante. D'autre part, le xylène a affecté le pourcentage des phases mitotiques. Pour le potentiel génotoxique, le xylène augmente significativement la fréquence des cellules anormales. Les types d'anomalies observées étaient des cassures qui semblent être le type le plus fréquent, les ponts, la C-mitose, les pauses, et la perte des chromosomes. Les données obtenues dans cette étude ont montré que les bio-essais végétaux sont une batterie d'essai utile et importante pour détecter la génotoxicité possible des produits chimiques.

**Mots-clés :** Aberrations chromosomiques, *Allium cepa*, cytotoxicité, génotoxicité, index mitotique, xylène.

## الملخص

تمت دراسة التأثيرات السامة والسمية الجينية للمادة الكيميائية (xylène) باستخدام اختبار البصل, أولا تم تحديد قيمة (EC50) من خلال تقييم تثبيط استطالة الجذور حيث استعملت محاليل مختلفة التراكيز من (xylène). تشير النتائج الى انخفاض بشكل ملحوظ في مؤشر الانقسامية (IM) للخلايا الانشائية مقارنة مع مجموعة الشاهد بطريقة تناسب عكسي مع تركيز المحلول المختبر, وقد لوحظت تشوهات من بينها قطع الجسور وفقدان الكروموزومات. اظهرت النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة ان الاختبارات البيولوجية التي تعتمد على النبات كنظام اختبار, مفيدة ومهمة في الكشف عن السمية الوراثية للمواد الكيميائية.

**الكلمات المفتاحية** السمية الوراثية, البصل, السمية الخلوية, مؤشر الانقسامية, التشوهات الكروموزومية, الاكسيلين.

# **Annexe**

## **Les solutions**

### **• Dilution de l'éthanol 95 % et conservation**

Pour diluer l'éthanol 95% à éthanol 70% on prend 70 ml de éthanol 95% et compléter le volume par l'eau distillée jusqu'à 100 ml. Après 24 heures fixer les racines de chaque tube par l'éthanol 70% puis conserver à 4 °C pour une observation différée.



### **• Préparation du HCl 1N**

Préparer l'HCl 1N à partir de l'HCl 12,236 N, poser 20 ml de l'eau distillée dans un Buchner de 100 ml puis ajoutée 8,1726 ml de HCl puis compléter le volume jusqu'à 100 ml avec l'eau distillée pour avoir HCl 1N puis conserver dans un flacon sombre à 4 °C.

### **• Préparation du colorant Feulgen**

- ✓ Mesurer 0.25 g Fushine basique.
- ✓ 50 ml H<sub>2</sub>O d bouillir à 100 °C puis refroidissent 10 min (50 °C).
- ✓ Ajouter 5 ml de 1N HCl et agiter avec l'agitateur.
- ✓ Ajouter 0,5 g de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> et aussi agiter avec l'agitateur.
- ✓ Conserver dans un flacon sombre et couvert avec de papier aluminium pendant une nuit à 4 °C.

## Annexe

- ✓ Filtrer à l'obscurité par un papier filtre puis conserver dans un flacon sombre pour 15 à 20 jours au max.

