



HAL
open science

Intérêt des lignées cellulaires de poisson en écotoxicologie pour l'étude de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité

Aude Kienzler

► **To cite this version:**

Aude Kienzler. Intérêt des lignées cellulaires de poisson en écotoxicologie pour l'étude de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité. Sciences agricoles. INSA de Lyon, 2013. Français. NNT : 2013ISAL0016 . tel-00952888

HAL Id: tel-00952888

<https://theses.hal.science/tel-00952888>

Submitted on 27 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre: 2013ISAL0016

Année 2013

Thèse

Intérêt des lignées cellulaires de poisson en écotoxicologie pour l'étude de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité

Présentée devant

L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

Pour obtenir

Le grade de docteur

Formation doctorale

Ecole doctorale Chimie de Lyon (chimie, procédés, environnement)

Spécialité Environnement industriel et urbain

Par

Aude KIENZLER

Soutenue le 15 mars 2013 devant la Commission d'examen

Jury

Mr. J. Cachot	Professeur (Univ. Bordeaux 1) - Rapporteur
Mme. V. Fessard	Directrice de recherches (ANSES) - Rapporteur
Mr. P. Lejeune	Professeur (INSA de Lyon) - Examineur
Mr. S. Lemière	Maître de Conférences, (Univ. Lille Nord de France) - Examineur
Mr. S. Aït-Aïssa	Ingénieur de recherches (INERIS) - Membre invité
Mr. A. Devaux	Ingénieur de recherches (INRA) - Directeur de thèse
Mme. S. Bony	Chargé de recherches (INRA) - Codirecteur de thèse

Laboratoire de recherche

UMR CNRS LEHNA 5023, USC INRA 1369, ENTPE, Vaulx en Velin

INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2011-2015

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	<u>CHIMIE DE LYON</u> http://www.edchimie-lyon.fr Insa : R. GOURDON	M. Jean Marc LANCELIN Université de Lyon – Collège Doctoral Bât ESCPE 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72.43 13 95 directeur@edchimie-lyon.fr
E.E.A.	<u>ELECTRONIQUE,</u> <u>ELECTROTECHNIQUE,</u> <u>AUTOMATIQUE</u> http://edeea.ec-lyon.fr Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN eea@ec-lyon.fr	M. Gérard SCORLETTI Ecole Centrale de Lyon 36 avenue Guy de Collongue 69134 ECULLY Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17 Gerard.scorletti@ec-lyon.fr
E2M2	<u>EVOLUTION, ECOSYSTEME,</u> <u>MICROBIOLOGIE, MODELISATION</u> http://e2m2.universite-lyon.fr Insa : H. CHARLES	Mme Gudrun BORNETTE CNRS UMR 5023 LEHNA Université Claude Bernard Lyon 1 Bât Forel 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43.12.94 e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr
EDISS	<u>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-</u> <u>SANTE</u> http://ww2.ibcp.fr/ediss Sec : Safia AIT CHALAL Insa : M. LAGARDE	M. Didier REVEL Hôpital Louis Pradel Bâtiment Central 28 Avenue Doyen Lépine 69677 BRON Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16 Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr
INFOMATHS	<u>INFORMATIQUE ET</u> <u>MATHEMATIQUES</u> http://infomaths.univ-lyon1.fr	M. Johannes KELLENDONK Université Claude Bernard Lyon 1 INFOMATHS Bâtiment Braconnier 43 bd du 11 novembre 1918 69622 VILLEURBANNE Cedex Tél : 04.72. 44.82.94 Fax 04 72 43 16 87 infomaths@univ-lyon1.fr
Matériaux	<u>MATERIAUX DE LYON</u> Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry Ed.materiaux@insa-lyon.fr	M. Jean-Yves BUFFIERE INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Saint Exupéry 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr
MEGA	<u>MECANIQUE, ENERGETIQUE,</u> <u>GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE</u> Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12 Bat. Saint Exupéry mega@insa-lyon.fr	M. Philippe BOISSE INSA de Lyon Laboratoire LAMCOS Bâtiment Jacquard 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.43.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 Philippe.boisse@insa-lyon.fr
ScSo	ScSo* M. OBADIA Lionel Sec : Viviane POLSINELLI Insa : J.Y. TOUSSAINT	M. OBADIA Lionel Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.69.72.76 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Remerciements

Cette thèse a été réalisée au sein de l'USC Impact génotoxiques sur les Hydrosystèmes et de l'équipe impacts des polluants sur les écosystèmes (IPE) du Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés (UMR LEHNA 5023), sur le campus de l'ENTPE de Vaulx-en-Velin, dont elle a bénéficié du soutien financier.

Je remercie sincèrement Mr Yves Perrodin, directeur adjoint du LEHNA, pour m'y avoir accueillie et pour m'y avoir permis de travailler. Les trois années passées dans ce laboratoire m'ont beaucoup appris et beaucoup apporté, tant sur le plan scientifique et technique que sur le plan humain.

Je remercie également très sincèrement Mme Sylvie Bony et Mr Alain Devaux, mes deux directeurs de thèse, pour m'avoir permis de mener à bien ce projet, pour leurs soutiens, leurs conseils de tous les instants, et leur grande gentillesse. Merci pour cet encadrement scientifique si enrichissant ; et avant tout merci d'avoir cru en moi, ce qui au départ n'était pas forcément évident !

Je fais part également de mes sincères remerciements à Mme Valérie Fessard, de l'ANSES et Mr Jérôme Cachot, de l'Université de Bordeaux 1 pour avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, ainsi qu'aux membres du jury, Mr Sébastien Lemièrre, de l'Université de Lille, Mr Philippe Lejeune, de l'INSA de Lyon, et Mr Selim Aït-Aïssa, de l'INERIS.

Je remercie tout particulièrement les membres de mon comité de pilotage : Mr Jean-Luc Ravanat, du CEA de Grenoble, pour l'analyse des bases méthylées de l'ADN, pour ses conseils et les réponses aux multiples questions que j'ai pu lui poser tout au long de ce travail ; Mr Selim Aït-Aïssa pour son aide et pour nous avoir fourni certaines lignées cellulaires ayant permis la réalisation de ce travail ; Mme Christelle Adam-Guillermin et Mme Sandrine Pereira de l'IRSN de Cadarache pour avoir suivi ce travail et pour leur conseils.

Merci à Barbara Malher et Peter Van Metre, de l'US Geological Survey, au Texas, pour m'avoir donné l'occasion de travailler sur la problématique « seal-coat » et pour m'avoir permis d'utiliser leurs données.

Merci également à Mme Chantal Guillard, de l'IRCE de Lyon et Mme Pascale Avouac du laboratoire LASH de l'ENTPE pour les prêts de matériel et pour leur aide pour la mesure des irradiations nécessaires à certaines expérimentations.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres de l'équipe IPE, pour leur gentillesse et leur accueil, les pauses café, les repas de Noël, les pots toujours partagés dans la bonne humeur ! Merci également à Alicia pour son travail et les innombrables commandes passées « in extremis » !

Un grand merci à Thérèse, Lydie et Xavier, pour les innombrables pauses de midi au soleil qui m'extirpaient avec bonheur de ma grotte obscure - non, je ne suis pas seule au monde- ; un merci tout particulier à Xavier Tronchère pour son aide précieuse, sa bonne volonté, sa bonne humeur, et sa bonne musique - enfin, là, ça dépendait de l'humeur ! Merci également à Marion et Nathalie pour leur participation à certaines expérimentations, ce qui m'a bien aidée !

Merci également à Emilie Lacaze et Raphaël Santos pour leur aide et leurs conseils de thésards avisés en écotoxicologie génétique, et un merci tout particulier à Morgane pour les stats et les petits bavardages salvateurs au quotidien ! Et oui il y a une vie à côté des articles et de celle du rat de laboratoire...

Enfin, mille merci à Emeric pour sa patience et son soutien ; à mon frère pour m'avoir appris que les limites que l'on se fixe sont pour le moins subjectives et faites pour être dépassées, et à mes parents pour m'avoir toujours soutenue et confortée dans mes choix, et sans qui je ne serais pas là où j'en suis aujourd'hui...

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS	1
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	3
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	11
INTRODUCTION GENERALE	13
PARTIE A - SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	17
CHAPITRE I - EFFETS DES STRESS ENVIRONNEMENTAUX SUR LE GENOME	19
1 Génotoxicité : généralités.....	21
1.1 Principales sources de génotoxiques pour l'environnement.....	21
1.2 Définition de la génotoxicité	22
1.3 Les différentes atteintes du génome	24
1.3.1 Génotoxicité directe : atteintes structurales.....	24
1.3.2 Génotoxicité indirecte	31
2 Mécanismes de défense des organismes vis-à-vis de la génotoxicité	36
2.1 Comportement d'évitement.....	36
2.2 Mécanismes photoprotecteurs	37
2.3 Bioactivation des xénobiotiques.....	37
2.4 Défense contre le stress oxydant	39
2.5 Modulation du cycle cellulaire	40
2.6 Mécanismes de réparation de l'ADN	42
2.6.1 Généralités.....	42
2.6.2 Activités de réparation de l'ADN chez le poisson : Publication I.....	46
CHAPITRE II - EVALUATION GENOTOXIQUE.....	75
1 Définition et utilisation des biomarqueurs de génotoxicité.....	77
2 Tests et biomarqueurs de génotoxicité mis en œuvre en écotoxicologie aquatique	80
3 L'essai des comètes.....	86
3.1 Principe et intérêts de l'essai	86
3.2 Versions modifiées de l'essai des comètes.....	90
3.2.1 Cas particulier de l'essai des comètes Fpg-modifié	92
3.2.2 Essai des comètes et mesure du niveau de méthylation des cytosines	92
3.2.3 Essai des comètes et mesure des activités de réparation de l'ADN	93

3.3 Place de l'essai des comètes en évaluation écotoxicologique et dans une approche multibiomarqueurs.....	94
CHAPITRE III - INTERET ET UTILISATION DES LIGNEES CELLULAIRES DE POISSON EN ECOTOXICOLOGIE.....	97
1 Modèles <i>in vitro</i> , une alternative aux essais d'écotoxicité <i>in vivo</i>	99
2 Les lignées cellulaires en évaluation de la toxicité aigüe (cytotoxicité).....	103
3 Les lignées cellulaires de poisson comme système biologique d'alerte	105
4 Les lignées cellulaires de poisson pour les études des mécanismes de toxicité.....	105
5 Les lignées cellulaires de poisson en évaluation de la génotoxicité	106
CHAPITRE IV - OBJECTIFS DE LA THESE	109
PARTIE B - ETUDES EXPERIMENTALES	113
CHAPITRE I - MATERIELS ET METHODES	115
1 Matériels biologiques mis en œuvre.....	117
1.1 Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées	117
1.2 Domaines d'utilisation	120
1.3 Conditions de culture.....	123
2 Evaluation de la cytotoxicité.....	123
3 Evaluation de la génotoxicité : protocole de l'essai des comètes standard.....	124
CHAPITRE II - EVALUATION DES DOMMAGES PRIMAIRES A L'ADN PAR UN ESSAI DES COMETES MODIFIE.....	127
1 Optimisation du protocole de l'essai des comètes modifié par une étape de digestion enzymatique	131
1.1 Détermination préalable des gammes d'exposition sub-cytotoxiques à divers génotoxiques	131
1.2 Choix de l'enzyme.....	134
2 Mise en œuvre de l'essai des comètes Fpg-modifié avec les lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1 : Publication II.....	137
CHAPITRE III - ETUDE DES CAPACITES DE REPARATION DES DOMMAGES A L'ADN DES LIGNEES RTL-W1 ET RTG-W1 ET APPLICATION AU DEVELOPPEMENT D'UN BIOMARQUEUR	161
1 Le système BER dans les lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1	165

1.1	Mise en place du protocole de suivi cinétique : choix de l'inhibiteur sur des critères de cytotoxicité et de génotoxicité.....	165
1.2	Mise en place du protocole de l'essai des comètes modifié de type BERc.....	168
1.2.1	Préparation de l'ADN substrat.....	169
1.2.2	Préparation des extraits cellulaires.....	173
1.3	Mise en évidence des capacités de réparation BER et développement d'un biomarqueur à l'aide de la méthode BERc : Publication III.....	178
2	Les systèmes NER et PER dans les lignées RTL-W1 et RTG-W1	198
2.1	Mise en place du protocole du suivi cinétique des systèmes de réparation NER et PER.....	198
2.2	Caractérisation des capacités de réparation NER et PER chez les lignées cellulaires de poisson RTL-W1 et RTG-W1 : Publication IV.....	200
CHAPITRE IV - MESURE DU NIVEAU DE METHYLATION DU GENOME DES LIGNEES RTL-W1 ET RTG-W1 ET POTENTIEL D'UTILISATION COMME BIOMARQUEUR EPIGENETIQUE.....		213
1	Niveau de méthylation de base de l'ADN et sensibilité à des agents déméthylants.....	217
1.1	Introduction.....	217
1.2	Matériels et Méthodes.....	218
1.2.1	Exposition aux agents déméthylants.....	219
1.2.2	Extraction de l'ADN génomique.....	220
1.2.3	Digestion de l'ADN et dosage HPLC-MS/MS des bases méthylées.....	220
1.3	Résultats.....	221
1.3.1	Niveau de méthylation de base du génome des deux lignées.....	221
1.3.2	Sensibilité des deux lignées à divers agents déméthylants.....	222
1.4	Discussion.....	223
2	Essai de mise au point du protocole de l'essai des comètes modifié.....	225
CHAPITRE V - APPLICATION DES BIOMARQUEURS DE GENOTOXICITE DEVELOPPES A L'EVALUATION DE LA GENOTOXICITE D'EFFLUENTS URBAINS.....		231
1	La problématique environnementale des « CTB-Sealcoat »	235
2	Evaluation de l'écotoxicité de deux revêtements de type « sealcoat » à base de coal-tar ou d'asphalte	236
2.1	Application des revêtements et collecte des eaux de ruissellement.....	236
2.2	Analyses chimiques des eaux de ruissellement.....	237
2.3	Evaluation écotoxicologique des eaux de ruissellement « CTB » et « ASB sealcoat » : tests monospécifiques.....	240
2.4	Evaluation écotoxicologique des eaux de ruissellement « CTB » et « ASB sealcoat » : cytotoxicité et génotoxicité sur la lignée cellulaire RTL-W1. Publication V en préparation.....	241
CHAPITRE VI - DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		259

1 Validation d'un essai des comètes Fpg-modifié pour augmenter la sensibilité de détection de dommages primaires à l'ADN dans des lignées cellulaires de poisson	261
2 Caractérisation des activités de réparation de type BER, NER et PER de 2 lignées cellulaires de poisson et développement de biomarqueurs utilisant ce potentiel de réparation	265
3 Mesure du niveau de méthylation globale de l'ADN des lignées cellulaires de poisson et perspectives d'utilisation en écotoxicologie.....	269
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	273
ANNEXES.....	307

Liste des abréviations

ABC : ATP Binding Cassette
ADN : Acide désoxyribonucléique
AhR : Récepteur Aryl Hydrocarbon
AP : Abasique
ARN : Acide ribonucléique
ATCC : American Type Culture Collection
B[a]P : Benzo[a]pyrène
BER : Base Excision Repair
BET : Bromure d'Ethydium
BrdU : Bromodéoxyuridine
CAT : Catalase
Cd : Cadmium
CE₅₀ : Concentration Efficace 50%
CTB : Cell Titer Blue®
CYP1A : Cytochrome P450
DCE : Directive Cadre sur l'Eau
DNMT : ADN méthyltransférases
DTT : Dithiothréitol
EC : Essai Comète
ECVAM : European Center for the Validation of Alternative Methods
ERO : Espèces Réactives de l'Oxygène
EROD : Ethoxyrésorufine-*O*-dééthylase
ESCODD : European Standard Committee on Oxydative DNA Damage
ET : Ecart-type
FaPyGua : 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine
FaPyAde : 4,6-diamino -5-formamidopyrimidine
GPx : Glutathion Peroxydase
GSH : Glutathion, forme réduite
GSSG : Glutathion, forme oxydée
HAPs : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HATs : Histone acétyle transférases
HDACs : Histone déacétylases
Me-FapyGua : 2,6-diamino-4-hydroxy-5N-methylformamidopyrimidine
Mg²⁺ : Magnésium
MN : Micronoyaux
MX : Méthoxiamine
NER : Nucleotid Excision Repair
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique
PARP-1 : Poly-(ADP-ribose)polymérase-1
PBS : Phosphates Buffered Saline (Tampon Phosphate Salin)

PCBs : Polychlorobiphényles
PER : Photoreactivation Repair
REACH : Enregistrement, évaluation et Autorisation des substances Chimiques
("Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals")
Ro 19-8022 : 1-((10-chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo(a)quinzolin-1-yl) carbonyl)-2-
pyrrolidine méthanol
SAM : S-adenosylméthionine
SEM : Erreur type (Standard Error of the Mean)
SOD : SuperOxyde-Dismutase
SVF : Serum de veaux foetal
TBT : Tributylétain
ThyGly : Thymine glycol
TI : Tail Intensity
UraGly : Uracile glycol
Zn : Zinc
3AB : 3-aminobenzamide
3-4 DCA : 3,4 di-chloroaniline
5-MeCyt : 5 méthyl-cytosine
%TI : % médian de fluorescence dans la queue (%Tail Intensity)
8-oxoGua : 8-oxo-7,8-dihydroguanine
8-oxodG : 8-oxodéoxyguanosine

Liste des figures et des tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Notions de génotoxicité directe et indirecte et leurs conséquences.....	22
Figure 2 : Principales modifications des bases de l'ADN.....	25
Figure 3 : Les trois voies d'activation du B[a]P et les différents types de lésions génotoxiques générées.....	26
Figure 4 : Principaux produits du dommage oxydatif aux bases de l'ADN.	27
Figure 5 : Sites nucléophiles permettant la formation d'adduits sur les bases de l'ADN.....	27
Figure 6 : Rayonnement UV, spectre solaire et absorption par l'ADN	29
Figure 7 : Principaux photoproduits issus des radiations UV	30
Figure 8 : Schéma des principales modifications épigénétiques et sites d'actions potentiels des polluants chimiques.....	35
Figure 9 : Mécanismes d'évitement, de protection et de réparation des organismes vis-à-vis des rayonnements UV.	37
Figure 10 : Principales étapes de la biotransformation des xénobiotiques lipophiles.....	38
Figure 11 : Principaux mécanismes de défense contre les ERO	39
Figure 12 : Cycle cellulaire: étapes et points de contrôle	41
Figure 13 : Réponses cellulaires aux dommages à l'ADN identifiées chez les mammifères..	42
Figure 14 : Mécanisme de réparation par excision des bases (BER).....	44
Figure 15 : Mécanisme de réparation par excision des nucléotides (NER).	45
Figure 16 : Applications possibles des biomarqueurs au laboratoire.....	78
Figure 17 : Principe de l'essai des comètes en conditions alcalines et de ses variantes.	87
Figure 18 : Classification des comètes en 5 stades selon l'intensité de la migration utilisée en quantification manuelle du niveau de dommages à l'ADN	88
Figure 19 : Sites de reconnaissance et activité d'incision des enzymes HpaII, MspI (gauche) et HhaI (droite).....	93
Figure 20 : Mécanismes proposés des différentes formes de génotoxicité exercées par le cadmium.....	96

Figure 21 : Divers domaines d'application des lignées cellulaires de poisson	104
Figure 22 : Les grands axes du travail de thèse et leurs différentes composantes	112
Figure 23 : Cytotoxicité des génotoxiques modèles H ₂ O ₂ , MMS et B[a]P sur les lignées cellulaires RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1.	132
Figure 24 : Cytotoxicité du cadmium, diuron et 3,4-DCA sur les lignées cellulaires RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1.	133
Figure 25 : Comparaison des niveaux de fragmentation lus par les essais comètes Fpg et Endo III-modifiés (%TI) après exposition des lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1 à H ₂ O ₂ (A) et au MMS (B).	136
Figure 26 : Les différentes étapes de l'étude des capacités de réparation des dommages à l'ADN des lignées RTL-W1 et RTG-W1	164
Figure 27 : Cytotoxicité du 3-aminobenzamide (gauche) et de la méthoxiamine (droite) sur les lignées cellulaires RTG-W1 et RTL-W1 après 24h d'exposition	166
Figure 28 : Cytotoxicité après 24h d'exposition au 3AB faisant suite à une exposition initiale des cellules au MMS (1 mM, 15 minutes).	167
Figure 29 : Niveau de base des dommages à l'ADN des deux lignées RTL-W1 et RTG-W1 après 24h d'exposition avec et sans 3AB dans les versions standard et Fpg-modifiée de l'essai des comètes.	167
Figure 30 : Principe de l'essai des comètes modifié BERc et différents points étudiés pour son optimisation avec les lignées cellulaires de poisson	169
Figure 31 : Molécule de Ro 19-8022	170
Figure 32 : Cytotoxicité du Ro 19-8022 sur les lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1....	171
Figure 33 : Niveaux de dommages à l'ADN générés par différents traitements au photosensibilisant Ro 19-8022 sur les lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1.	172
Figure 34 : Mise en évidence des capacités d'incision des lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1 sur un ADN porteur de différents niveaux de lésions type 8-oxoGua.	175
Figure 35 : Concentration des extraits et activité d'incision des extraits cellulaires RTL-W1 et RTG-W1 sur un ADN porteur de différents niveaux de lésions type 8-oxoGua	176
Figure 36 : Effet de la durée d'incubation sur la sensibilité de l'essai.....	177
Figure 37 : Effet de l'âge post-ensemencement des cellules lors de la confection des extraits sur l'activité d'incision.....	177
Figure 38 : Calibration de la lampe UVC	199

Figure 39 : Cytotoxicité immédiate des UVC sur les lignées RTL-W1 et RTG-W1.....	200
Figure 40 : La cytidine et ses deux analogues structuraux, la 5-azacytidine et la zébularine	218
Figure 41 : Niveau de base de méthylation en C5 des cytidines chez les deux lignées RTL-W1 et RTG-W1	221
Figure 42 : Mesure des 5-méthylcytosines (à gauche) et 5-hydroxyméthylcytosines (à droite) après exposition à la 5-azacytidine (11 jours) et à la zébularine (8 jours)	222
Figure 43 : Mesure de la 5-méthylcytosine (à gauche) et 5-hydroxyméthylcytosine (à droite) après exposition au TBT et au Cd	223
Figure 44 : Essai des comètes Fpg-modifié, essai des comètes modifié selon Wentzel et al. (2010) pour la mesure de la méthylation, et modifications apportées au protocole de Wentzel pour tenter de permettre son utilisation avec les lignées RTL-W1 et RTG-W1	227
Figure 45 : Fragmentation de l'ADN sur la lignée RTL-W1 suite à l'ajout de Mg^{2+} dans le tampon F (incubation d'1h min à 37°C).....	228
Figure 46 : Essai des comètes modifié et mesure de la méthylation sur lignées cellulaires de poisson : essai de modifications du protocole de Wasson et al., 2006 (en rose).....	229
Figure 47 : Application des revêtements « CTB sealcoat » et « ASB sealcoat ».....	237
Figure 48 : Concentrations en HAPs totaux (16 HAPs prioritaires pour l'US-EPA) et en hétérocycles azotés totaux dans les eaux de ruissellement de revêtement de type CTB et ASB en fonction du temps écoulé entre l'application du revêtement et la pluie.	238
Figure 49 : Concentrations (A) en HAPs selon leur complexité et (B) en hétérocycles azotés en fonction du temps après l'application des revêtements de type CTB (haut) et ASB (bas).239	

Publication II

Figure 1 : Comparison of classical (without enzyme, □) and Fpg-modified (■) comet assay on fish cell lines RTL-W1, PLHC-1, and RTG-W1 after exposure to MMS and H₂O₂. Results are mean ± SD of three independent experiments. *: statistically significant difference compared to control with or without enzyme (Kruskall Wallis ANOVA and Mann-Whitney U test, p<0.05).

Figure 2 : Comparison of level of DNA damage induced by cadmium on fish cell lines RTL-W1, PLHC-1, RTG-W1, after 24h of exposure when applying classical (□) and Fpg-modified (■) comet assay. Results are mean ±SD of three independent experiments. *: statistically significant difference compared to control with or without enzyme (Kruskall Wallis ANOVA and Mann-Whitney U test, p<0.05).

Figure 3 : Comparison of level of DNA damage induced by diuron and its metabolite 3,4-DCA on fish cell lines RTL-W1, PLHC-1, RTG-W1, after 24h of exposure when applying classical (□) and Fpg-modified (■) comet assay. Results are mean ±SD of three independent

experiments. *: statistically significant difference compared to control with or without enzyme (Kruskall Wallis ANOVA and Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

Figure 4 : EROD activity in RTL-W1 cells, PLHC-1 and RTG-W1 cells exposed to BaP. Each data point represents the mean of six culture wells \pm SEM of three independent experiments. B[a]P time exposure: \square 4h \blacksquare 8h \blacktriangle 16h \bullet 24h. *: statistically significant difference from the control (ANOVA, Newman and Keuls test, $p < 0.05$).

Figure 5 : Comparison of level of DNA damage induced by B[a]P on fish cell lines RTL-W1, PLHC-1, RTG-W1, after 24h of exposure when applying classical (\square) and Fpg-modified (\blacksquare) comet assay. Results are mean \pm SD of three independent experiments. *: statistically significant difference compared to control with or without enzyme (Kruskall Wallis ANOVA and Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

Publication III

Figure 1 : Flow diagram of the overall experimental design used to study DNA repair and BER capacity in RTL-W1 and RTG-W1 fish cell lines.

Figure 2 : Summary of the BERc assay protocol optimized for fish cell lines.

Figure 3 : Repair kinetics after H_2O_2 exposure (10 min, $10\mu M$), residual damage level detected by the alkaline comet assay in RTL-W1(\blacksquare) and RTG-W1(\bullet) \square : damage level in controls. Results are mean \pm SD of three independent experiments. *: significant difference between exposed and control cells (t-test, $p < 0.05$) for each experimental time.

Figure 4 : Repair kinetics after a 15 min MMS exposure in RTL-W1 and RTG-W1; A: residual damage level detected by the alkaline comet assay (1mM MMS,) ; B: residual damage level detected by Fpg-modified comet assay that reveals Fpg-sensitive site such as Fapy Me Gua (0.4mM MMS), with (\blacksquare) and without (\bullet) the BER inhibitor 3-AB. Results are mean \pm SD of three independent experiments. *: significant difference between damage level with and without 3AB (t-test, $p < 0.05$). †: significant difference between damage level in cells exposed without 3AB and the corresponding control (t-test, $p < 0.05$). \blacksquare MMS with 3AB \bullet MMS without 3AB, \circ no MMS, no 3AB.

Figure 5 : Base excision capacity of RTL-W1 and RTG-W1 cell extracts assessed with the BERc assay in RTL-W1 (A) and RTG-W1 (B) fish cell lines. Negative control: residual excision activity of extracts on undamaged substrate DNA. Positive control: excision activity of Fpg on 8OH-dG damaged DNA. Constitutive extract activity: extract incision activity on 8-OHdG-damaged DNA. TBT, 3AB, Cd: extract incision activity after a 24h exposure to $0.1\mu M$ TBT, 2.5 mM 3AB or $5\mu M$ Cd. *: significant difference when compared to constitutive extract activity (t-test, $p < 0.05$). Results are mean \pm SD of three independent experiments.

Figure 6 : Base excision capacity of control cells extract of RTL-W1 and RTG-W1 spiked with various concentrations of 3AB (top), Tributyltin (middle) and Cadmium (bottom). Open bars: RTL-W1, dark bars: RTG-W1. Results are mean \pm SD of three independent

experiments. *: significant difference between the excision capacity of the extract when compared to the control. ANOVA, and Tukey's HSD post-hoc test, $p < 0.05$.

Publication IV

Figure 1 : DNA damage level after various UVC exposure conditions in RTL-W1 and RTGill-W1 fish cell lines as revealed by standard and T4-modified comet assay. Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments, * significant difference compared to the corresponding control (0 UVC exposure - Mann & Whitney U test, $p < 0.01$).

Figure 2 : Photoenzymatic repair kinetics of T4-sensitive sites for RTL-W1 and RTGill-W1 cell lines after exposure to 1.75 J.m⁻² UVC. Control: UVC treated cells, no enzyme. *: Significant difference when compared to corresponding control ($p < 0.05$, mean of 3 \pm SD independent experiments).

Figure 3 : NER kinetics of T4-sensitive sites in RTGill-W1 fish cell line after exposure to UVC. *: Significant difference with initial DNA damage (ANOVA - Dunnet post-hoc test). Results are mean \pm SD of 3 independent experiments.

Figure 4 : NER kinetics in RTL-W1 fish cell line after exposure to UVC. *: Significant difference with initial DNA damage (ANOVA - Dunnet post-hoc test). Results are mean \pm SD of 3 independent experiments.

Publication V

Figure 1 : Genotoxicity of asphalt-based runoff water collected at different times measured by the Fpg-modified comet assay; with (striped bars) or without (full colored bars) exposure to UVA (2.4 J/cm²). Control: non-exposed cells; Control Water: cells exposed to 1 or 10% control water. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent replicates. *: significant difference with the corresponding control ($p < 0.05$).

Figure 2 : Genotoxicity of coal-tar-based runoff water collected at different times measured by the Fpg-modified comet assay; with (striped bars) or without (full colored bars) exposure to UVA (2.4 J/cm²). Control: non-exposed cells; Control Water: cells exposed to 1 or 10% control water. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent replicates. *: significant difference with the corresponding control ($p < 0.05$).

Liste des tableaux

Tableau 1 : Exemples d'interaction des métaux lourds avec les principaux systèmes de réparation de l'ADN.....	32
Tableau 2 : Les différents types de lésions prises en charge et les différents systèmes de réparation de l'ADN.....	43
Tableau 3 : Principaux tests utilisés pour évaluer la mutagénicité et la génotoxicité des eaux de surface, avantages et inconvénients.....	85
Tableau 4 : Principales ADN glycosylases utilisées en essai des comètes modifié.....	91
Tableau 5 : Principales lignées cellulaires utilisées en écotoxicologie aquatique	101
Tableau 6 : Exemples d'étude d'évaluation de la génotoxicité sur les lignées cellulaires, RTG-W1, RTL-W1 et PLHC-1.....	108
Tableau 7 : Caractéristiques des différentes lignées cellulaires utilisées.....	118
Tableau 8 : Caractéristiques métaboliques des lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1.....	119
Tableau 9 : Quelques exemples d'étude de la toxicité chez RTL-W1 et RTG-W1 et critères d'étude retenus.	121
Tableau 10 : Quelques exemples d'étude de la toxicité chez PLHC-1, et les critères d'étude retenus.	122
Tableau 11 : Composition et rôles des différents tampons utilisés lors de l'essai des comètes en conditions alcalines	125
Tableau 12 : Exposition aux différents génotoxiques	131
Tableau 13 : Facteurs d'induction du signal (%TI+enzyme/%TI sans enzyme) lus par l'essai des comètes modifié avec les enzymes Endo III et Fpg, calculés pour chaque concentration et chaque lignée cellulaire après exposition au MMS et à H ₂ O ₂	135
Tableau 14 : Agents méthylants/déméthylants et concentrations d'exposition choisies pour les lignées RTG-W1 et RTL-W1	219

Publication II

Table 1 : Sensitivity factor (concentration of the first significant effect without Fpg/concentration of the first significant effect with Fpg) depending on the pollutants tested for the three cell lines. NS: No significant genotoxic effect; +∞: sensitivity factor when genotoxicity was detected with the Fpg assay only.

Table 2 : Basal and maximum EROD activity (pmoles/min/mg protein) following BaP exposure at various time in RTL-W1, RTG-W1 and PLHC-1. Results are mean ± SD of three

independent experiments *: statistical significant difference from the control (non exposed cells) (ANOVA, Newman and Keuls test, $p < 0.05$).

Table 3 : EROD induction factor after exposure of the three cell lines RTG-W1, PLHC-1, RTL-W1 to B[a]P.

Publication IV

Table 1 : Effect of a 2.5 J.m^{-2} UVC treatment on RTL-W1 and RTGill-W1 cells viability 4h, 24h and 48h post-treatment. Results are expressed as fluorescence (arbitrary unit, 10^3). Data correspond to the mean \pm SEM of three independent experiments.

Publication V

Table 1 : Cell viability after a 24h exposure to coaltar based runoff water collected at different times, in combination or not with UVA exposure (2.4 J.cm^{-2}). Results are expressed as % viability compared to control and are mean \pm SEM of 3 independent replicates. *: significant difference with the control, $p < 0.05$

Table 2 : Cell viability after a 24h exposure to asphalt based runoff water collected at different time, in combination or not with UVA exposure (2.4 J.cm^{-2}). Results are expressed as % viability compared to control and are mean \pm SEM of 3 independent replicates. *: significant difference with the control, $p < 0.05$

Table 3 : Induction factor in DNA damage after co-exposure to 10% of runoff water collected at different time and to UVA (2.4 J.cm^{-2}) when compared with exposure to 10% runoff water alone. * significant difference when compared to control water induction factor

Table 4 : BER capacity of cell extract after exposure to 24h of coal-tar-based (CTB) or asphalt-based (ASB) 10% runoff water collected at different times with or without co-exposure to UVA (2.4 J/cm^2). Positive control: Fpg digestion of DNA damaged substrate. Control Water and Water + UV: cells exposed to 10% control water only. 3AB: model BER inhibitor (2.5 mM). Results are expressed as the mean \pm SD of three independent replicates. *a*: significant difference vs the control water, *b*: significant difference vs control water+UV (ANOVA, Dunett Post'hoc test).

Liste des publications et communications

PUBLICATIONS originales dans revues à comité de lecture

DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: a review. *Aquatic Toxicology* ; 134-135, 47-56 (2013).

Aude Kienzler, Sylvie Bony, Alain Devaux.

Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. *Toxicology in Vitro*; 26 (3) 500-10 (2012).

Aude Kienzler, Xavier Tronchère, Alain Devaux, Sylvie Bony

Assessment of Base Excision Repair activity in fish cell lines: towards a new biomarker of contaminant exposure? *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*; 753 (2) 107-13 (2013).

Aude Kienzler, Sylvie Bony, Xavier Tronchère, Alain Devaux

UV-Nucleotide Excision repair (NER) and Photoreactivation repair (PER) in two trout fish cell lines used in ecotoxicological assessment. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*; 125, 51-55 (2013).

Aude Kienzler, Xavier Tronchère, Alain Devaux, Sylvie Bony

Assessment of coal-tar and asphalt based sealcoat runoff cytotoxicity and genotoxicity on the RTL-W1 fish cell line.

Aude Kienzler, Nathalie Schweigert, Babara Mahler, Peter Van Metre, Jennifer Wilson, Alain Devaux, Sylvie Bony. En préparation.

COMMUNICATIONS ORALES

CBTOX 2011, Annual meeting, Ribeirao Preto, Brésil (22-25 juin 2011)

The use of fish cell lines in geno-ecotoxicology assessment (conférence invitée).

Sylvie Bony, Alain Devaux, **Aude Kienzler**, Charlotte Mucig, Aurelien Brakers de Hugo, Xavier Tronchere.

International Comet Assay Workshop– Kusadasi, Turquie (13-16 septembre 2011)

Validation and application of a modified comet assay in fish cell lines for aquatic genotoxicity assessment.

Aude Kienzler, Sylvie Bony, Alain Devaux, Charlotte Mucig, Xavier Tronchère

4^{ème} séminaire d'écotoxicologie de l'INRA, St Lager, (7-8 novembre 2011)

Intérêt des lignées cellulaires de poisson en évaluation éco-génotoxicologique

Sylvie Bony, **Aude Kienzler**, Xavier Tronchere, Alain Devaux.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Colloques Nationaux

4^{ème} séminaire d'écotoxicologie de l'INRA, St Lager, France (7-8 novembre 2011)

Application d'un essai des Comètes modifié sur des lignées cellulaires de poisson : un outil sensible d'évaluation de la génotoxicité.

Aude Kienzler, Xavier Tronchère, Alain Devaux, Sylvie Bony.

Journée de l'Ecole Doctorale Chimie de Lyon, Villeurbanne, France (25 avril 2012)

Development of genotoxicity biomarkers in fish cell lines for aquatic risk assessment

Aude Kienzler, Sylvie Bony, Xavier Tronchère, Alain Devaux

SEFA-Lyon, France (4-5 juillet 2012)

DNA repair capacities in RTL-W1 cells and application of a Base Excision Repair comet assay

Aude Kienzler, Sylvie Bony, Xavier Tronchère, Alain Devaux

ECOBim 2012, Reims (5-8 juin 2012)

Development of genotoxicity biomarkers in fish cell lines

Aude Kienzler, Sylvie Bony, Xavier Tronchère, Alain Devaux

Colloques Internationaux

SETAC Europe Annual meeting, Séville-Espagne (23-27 mai 2010)

Development of genotoxicity biomarkers in fish cell lines for aquatic risk assessment

Sylvie Bony, **Aude Kienzler**, Isabelle Gaillard, Alain Devaux

SETAC Europe Annual meeting, Milan-Italie (15-19 mai 2011)

Application of the modified comet assay to three fish cell lines for genotoxicity assessment of pollutants

Aude Kienzler, Sylvie Bony, Xavier Tronchère and Alain Devaux

SETAC Europe Annual meeting, Berlin-Allemagne (20-24 mai 2012)

DNA repair capacities in RTL-W1 cells and application of a Base Excision Repair Comet assay

Aude Kienzler, Sylvie Bony, Xavier Tronchère and Alain Devaux.

Introduction générale

L'industrialisation, l'urbanisation, les pratiques agricoles intensives et les activités humaines de transport et de production d'énergie sont la source d'importants rejets de xénobiotiques dans les différents compartiments de l'environnement. Plus de 100 000 molécules chimiques issues des activités anthropiques sont ainsi retrouvées dans les écosystèmes aquatiques qui sont décrits comme le réceptacle ultime de la majorité, voire de l'intégralité des contaminants (Depledge et Galloway 2005).

L'exposition des organismes aquatiques à des agents chimiques et physiques peut conduire à différentes formes de toxicité. Parmi celles-ci les effets génotoxiques recensés chez les organismes aquatiques ont fait l'objet d'une attention particulière depuis deux décennies (Anderson et Wild 1994; Shugart et Theodorakis 1996). Les atteintes génotoxiques initiales, entre plus d'être une source de dépenses métaboliques importantes du fait de la réparation, peuvent être à l'origine de mutations ayant des conséquences cruciales pour l'individu (augmentation de l'incidence des cancers). Au niveau de la population, les conséquences de ces mutations peuvent être une diminution globale de la fitness des organismes (survie, croissance, reproduction) ou une diminution de la diversité génotypique, ce qui peut se traduire *in fine* par une modification de la structure des classes d'âge, une diminution de la taille de la population, voire par son extinction (Würgler et Kramers 1992; Bickham et Smolen 1994). Ainsi, les effets génotoxiques occupent une place de plus en plus grande dans l'évaluation du risque écotoxique dans le domaine aquatique (Depledge 1998; Jha 2004).

La prise de conscience croissante de la contamination des hydrosystèmes et de ses conséquences possibles a amené depuis quelques années à un durcissement des contraintes réglementaires, avec l'adoption de nouveaux règlements (Règlement REACH pour "Registration, Evaluation and Authorisation of CHemicals"; Règlement n° 1107/2009 pour la mise sur le marché des produits phytosanitaires) et directives (Directive Biocides, Directive Cadre sur l'Eau) visant à améliorer l'évaluation toxicologique, dont la génotoxicité, des molécules chimiques mises sur le marché, et à surveiller l'état chimique et écologique des milieux aquatiques. Pour ce faire, de nombreux outils sont utilisés, dont plusieurs tests et biomarqueurs de génotoxicité. La plupart d'entre eux s'intéressent essentiellement aux dommages primaires induits par les génotoxiques, ou à leur caractère mutagène. Les

mécanismes de réparation de l'ADN ou encore les mécanismes épigénétiques régissant l'expression des gènes, deux voies indirectes de génotoxicité, restent peu renseignés malgré l'attention qu'ils méritent de par leurs effets sur l'intégrité du génome et de sa fonctionnalité (Shugart et al. 2003; Lee et Lee 2006; Caldwell 2012).

Développer des outils permettant d'évaluer ces types d'expression génotoxique *in vivo* peut se révéler fastidieux et coûteux, du fait notamment des contraintes liées à l'élevage des organismes (crustacés, poissons...) en laboratoire et de la mise en œuvre de protocoles lourds. Dans ce contexte, l'approche *in vitro* sur lignées cellulaires pisciaires représente une alternative intéressante, car ces modèles possèdent de nombreux avantages, dont la conservation de nombreuses caractéristiques de l'organisme d'origine (ectothermie, certaines capacités de biotransformation ou de réparation de l'ADN...), ce qui justifie leur utilisation à des fins d'évaluation de la génotoxicité en milieu aquatique. Elles sont déjà fréquemment utilisées pour des mesures de cytotoxicité et sont d'ailleurs proposées comme une alternative possible au test de toxicité aigüe *in vivo* sur poisson dans un contexte réglementaire (Castaño et al. 2003; Schirmer 2006). Cependant, leur utilisation en matière d'évaluation de la génotoxicité de molécules chimiques et de matrices environnementales complexes (effluents, sédiments) est à ce jour encore relativement occasionnelle (Bols et al. 2005; Fent 2007).

Parmi les nombreux essais de génotoxicité utilisés *in vivo* et *in vitro* en écotoxicologie aquatique, le test des comètes occupe une place de choix, tout du moins dans la version alcaline standard telle que décrite par Singh et al. (1988) (Braunbeck et Neumüller 1996; Frenzilli et al. 2009; Devaux et Bony 2013. In press.). Cependant, plusieurs variantes développées en toxicologie humaine, comme par exemple l'utilisation d'enzymes de restriction spécifiques permettant de caractériser la nature des lésions mises en évidence (Collins et al. 1997; Collins 2004) ou le niveau de méthylation de l'ADN (Wasson et al. 2006 ; Wentzel 2010), ou encore la mesure des activités de réparation des dommages à l'ADN (Langie et al. 2006) n'ont pour l'heure, peu ou pas été utilisées dans le domaine de l'écotoxicologie. La versatilité de l'essai des comètes constitue donc un atout de choix pour tenter de développer ce type d'approche dans une perspective écotoxicologique.

La thèse présentée ici a pour objectif général de développer de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité impliquant des activités de réparation et un marqueur épigénétique dans des lignées cellulaires de poisson, afin d'apporter des informations complémentaires à celles fournies par la mesure des dommages primaires à l'ADN utilisée

historiquement au laboratoire en écotoxicologie aquatique, le tout en privilégiant l'utilisation de l'essai des comètes en conditions alcalines dans ses différentes versions.

Quatre pistes principales ont été explorées :

1. le développement d'un biomarqueur de génotoxicité utilisant un essai des comètes modifié par ajout d'une endonucléase permettant d'augmenter la sensibilité globale de l'essai lorsqu'appliqué à 3 lignées cellulaires de poisson.

2. la caractérisation des activités de réparation de type excision de base (BER) et de nucléotide (NER) ainsi que la réparation photoenzymatique (PER) de 2 lignées cellulaires de poisson dans le but de développer des biomarqueurs utilisant leurs potentiels de réparation de l'ADN.

3. l'étude du niveau de méthylation de l'ADN de ces lignées pisciaires et de son utilisation possible comme biomarqueur à caractère épigénétique.

4. un essai d'application des biomarqueurs (1) et (2) à une problématique environnementale de contamination par des goudrons de houille aux USA.

Avant de présenter les résultats de ces travaux et de les discuter, une étude bibliographique aborde les effets des stress environnementaux sur le génome, les différents mécanismes de défense existant pour y faire face, ainsi que les méthodes d'évaluation de la génotoxicité en écotoxicologie aquatique avec une emphase particulière sur le test des comètes, et l'intérêt des lignées cellulaires de poisson en écotoxicologie.

Partie A - Synthèse bibliographique

Cette synthèse bibliographique concerne les principaux concepts et outils utilisés dans le cadre de cette thèse en prenant soin de les replacer dans un contexte d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques.

Un premier chapitre traite des effets des stress environnementaux sur le génome et sa fonctionnalité. La notion de génotoxicité, les différents types de dommages à l'ADN et les mécanismes de défense mis en place par les organismes pour y faire face sont abordés. Les systèmes de réparation de l'ADN chez le poisson et leur intérêt comme biomarqueurs en écotoxicologie ont fait l'objet d'un travail approfondi et d'une réflexion qui ont conduit à la rédaction d'une revue bibliographique soumise au journal « Aquatic Toxicology » présentée dans ce chapitre (Publication I).

Le chapitre 2 traite ensuite de l'évaluation de la génotoxicité en écotoxicologie aquatique en abordant les différents types de biomarqueurs pouvant être mis en œuvre et les techniques qui y sont associées. Dans ce cadre, l'utilisation des dommages primaires à l'ADN et la technique de choix pour les mesurer que représente l'essai des comètes avec ses nombreuses variantes sont particulièrement détaillées puisque largement mises à profit dans notre travail expérimental. Dans ce chapitre, nous justifions également le choix des systèmes biologiques utilisés pour notre travail en illustrant l'intérêt des lignées cellulaires de poisson en écotoxicologie, en particulier pour l'évaluation génotoxique.

En conclusion de cette étude bibliographique, nous présentons les objectifs détaillés de ce travail de thèse et les expérimentations mises en œuvre pour les atteindre.

Chapitre I - Effets des stress environnementaux sur le génome

1 Génotoxicité : généralités

1.1 Principales sources de génotoxiques pour l'environnement.

Le milieu aquatique se trouve être le réceptacle final des nombreuses émissions d'origine anthropique, toutes comprenant pour partie non négligeable des molécules potentiellement génotoxiques et mutagènes (Claxton et al. 1998; Ohe et al. 2004). Parmi toutes ces sources de contamination, White et Rasmussen (1998) ont montré que les eaux en provenance des stations d'épuration représentent une charge génotoxique particulièrement importante, et ces auteurs ont par ailleurs mis en évidence une forte corrélation entre l'accroissement démographique, certaines activités humaines et la génotoxicité des eaux de surface. Parmi les principaux effluents à fort pouvoir génotoxique issus de l'industrie, on retrouve les effluents des industries pharmaceutiques (tels que par exemple ceux produisant la furazolidone et le nitrofurfurale, deux agents antibactériens), les effluents de l'industrie de pâte à papier et des fours à coke, de nombreux composés organiques issus de l'industrie chimique, les effluents des industries de résines époxy, de teintureries et des raffineries pétrolières (Houk 1992). Certains métaux lourds (mercure, arsenic, plomb, chrome, nickel, cadmium...) provenant des lixiviats de terrils, d'aciéries et de fonderies, ou encore d'émissions liées aux transports ont également un pouvoir génotoxique démontré mais peuvent aussi avoir une origine naturelle (fond géochimique), et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) issus des processus de combustion des énergies fossiles sont une autre source de contamination bien connue des écosystèmes dont les effets génotoxiques ne sont plus à démontrer. Les rejets agricoles sont également une source préoccupante de contamination génotoxique des écosystèmes aquatiques de par la multiplicité et les quantités des molécules utilisées (Canna-Michaelidou et Nicolaou 1996; Evrard et al. 2010). Les résidus médicamenteux quant à eux représentent une source reconnue de pollutions émergentes (Halling-Sørensen et al. 1998; Heberer 2002; Jones et al. 2002), d'autant plus préoccupante que nombre de ces molécules possèdent un potentiel génotoxique significatif, comme par exemple les agents anticancéreux alkylants (Buerge et al. 2006; Jolibois et Guerbet 2006; Catastini et al. 2008; Besse et al. 2012), et que les traitements en station d'épuration de ces composés organiques complexes sont encore très imparfaits. Même si cette liste n'est pas exhaustive, citons enfin les nanoparticules utilisées dans les pneus automobiles, les peintures, les cosmétiques ou pour la remédiation des sols et des effluents qui sont également retrouvées en grandes quantités dans l'environnement (Gottschalk et al. 2009;

Bhatt et Tripathi 2011) avec un potentiel génotoxique qui fait actuellement l'objet de nombreuses évaluations (Chio et al. 2012; Ema et al. 2012; Klien et Godnić-Cvar 2012).

1.2 Définition de la génotoxicité

La littérature propose selon les auteurs diverses définitions qui varient subtilement selon le contexte dans lequel elles sont citées. Dans le cadre de ce travail, nous considérerons que la génotoxicité englobe toutes les modifications physiques (structurelles) ou fonctionnelles du génome et nous distinguerons les notions de génotoxicité directe et indirecte (Figure 1).

La génotoxicité directe implique une interaction du contaminant avec la structure de l'ADN. Elle regroupe les effets de molécules chimiques (ou de leurs métabolites) et d'agents physiques *via* leur aptitude à porter directement atteinte à l'intégrité de la molécule d'ADN soit par leur capacité à se lier aux sites nucléophiles de ce dernier (cas d'une molécule à potentiel électrophile), soit par leur aptitude à modifier énergétiquement les liaisons existantes dans l'ADN (c'est notamment le cas des agents physiques). La génotoxicité directe induit ainsi essentiellement des lésions primaires à l'ADN (cassures, adduits) et des événements clastogènes comme des cassures chromosomiques.

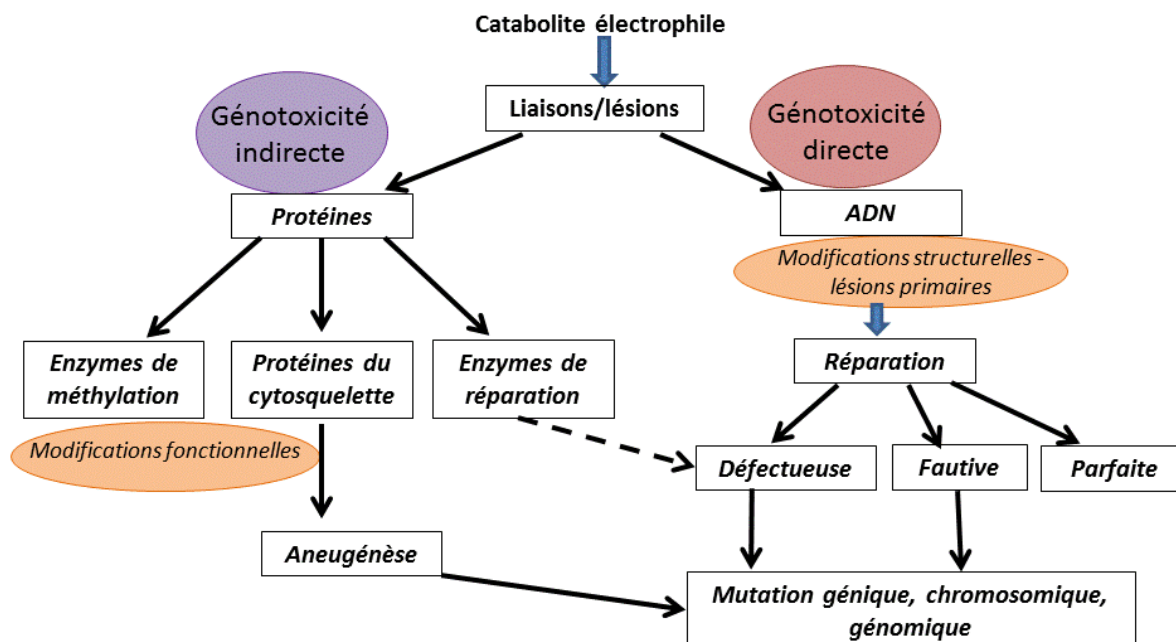


Figure 1 : Notions de génotoxicité directe et indirecte et leurs conséquences

La génotoxicité indirecte inclue les effets toxiques induits sur des composés cellulaires associés, tels que les protéines du fuseau mitotique, induisant des événements aneugènes, ou tels que les enzymes impliquées dans la réparation et la réplication de l'ADN.

Nous retiendrons pour cette thèse une définition encore plus étendue en ajoutant à ce qui précède la prise en compte d'effets sur l'épigénome, pouvant conduire à une atteinte de l'ADN non plus *via* sa structure, mais en interférant directement avec sa fonctionnalité *via* les systèmes de régulation de l'expression du génome.

Lorsqu'une lésion primaire à l'ADN n'est pas ou mal réparée, elle peut être fixée et se transmettre d'une génération à l'autre suite à la réplication de l'ADN ; on parle alors de mutation. La génotoxicité précède ainsi la mutagenicité. Cependant, la plupart des lésions à l'ADN sont réparées, cela dépendant notamment du type et de la quantité de lésion, et des activités de réparations mis en oeuvre. Seule une minorité de ces lésions est susceptible de conduire à des mutations. Enfin, si elle apparaît, une mutation peut aboutir à la disparition ou à l'altération des fonctions d'un gène si elle est située dans les régions promotrices ou codantes (exons), induire un changement d'acide aminée dans la protéine codée (mutation faux sens), ou bien rester muette si elle se situe dans une région non codante, du fait de la redondance du code génétique, ou encore si elle induit une modification d'acide aminé n'ayant pas de conséquences sur le fonctionnement de la protéine.

Un grand nombre de produits chimiques industriels (aldéhydes, cétones, époxydes, hydrocarbures aromatiques polycycliques, composés allyliques, sels inorganiques) sont des génotoxiques mutagènes provoquant des mutations chromosomiques de nombre (mutations génomiques) conduisant à des tumeurs. Une des principales cibles de ces composés dans les cellules sont les protéines du cytosquelette (tubuline, kinésine, dynéine), impliquées dans la division cellulaire en général et la ségrégation des chromosomes en particulier (Thier et al. 2003; Bonacker et al. 2004).

La génotoxicité est donc une notion complexe qui englobe différents mécanismes. Dans le cadre de ce travail, nous nous intéresserons aux lésions primaires à l'ADN, ainsi qu'à deux mécanismes de génotoxicité indirecte : l'interaction des contaminants avec les protéines de réparation de l'ADN d'une part, et avec le fonctionnement de l'épigénome d'autre part. Ces deux types d'effets ont jusqu'à présent été peu abordés dans le domaine de l'éco-génotoxicologie, et représentent à ce titre un champ de recherche original.

1.3 Les différentes atteintes du génome

1.3.1 Génotoxicité directe : atteintes structurelles

Formation de sites abasiques

La perte d'une base par cassure de la liaison N-glycosidique entraîne la formation de sites apuriques ou apyrimidiques regroupés sous le terme de sites abasiques (AP). Ils sont fréquents (Matsumoto et al. 1994), présentent souvent un caractère promutagène, et peuvent bloquer la réplication (Loeb et Preston 1986). La réparation de ce type de lésion peut conduire à l'insertion erronée de bases et favoriser ainsi les mutations. Les sites AP sont très labiles et conduisent le plus souvent à des cassures simple brin dont la persistance peut entraîner des lésions irréversibles conduisant à la mort cellulaire. Ils peuvent également apparaître suite à la réparation par les ADN glycosylases du système BER (base excision repair) (Figure 2) de bases endommagées par des agents chimiques comme l'acide nitreux, qui provoque une désamination des bases, ou suite à l'action de radicaux libres en situation de stress oxydant (Memisoglu et Samson 2000; Evans et al. 2004). La formation d'adduits dépurinants comme les Benzo[a]pyrène-N7-Gua (B[a]P-N7-Gua) ou le B[a]P-C8-Gua suite à la formation du radical cation du B[a]P peut également aboutir à la dépurination de l'ADN et à la création d'un site abasique (Xue et Warshawsky 2005).

Les désaminations spontanées de bases

Les groupements aminés des bases peuvent être instables et leur perte peut conduire à des mésappariements et entraîner une suppression de l'information codante (Lutsenko et Bhagwat 1999). L'exemple le plus connu est celui de la formation d'uracile après désamination de la cytosine avec une fréquence de 100 à 500 événements par jour pour une cellule humaine (Figure 2).

Les lésions oxydatives

Les dommages oxydatifs à l'ADN font partie des lésions les plus fréquentes et sont principalement un produit intrinsèque de la physiologie cellulaire lié aux réactions de la chaîne respiratoire mitochondriale (Ames et al. 1993), aux activités des peroxysomes (Yeldandi et al. 2000), à la détoxification de certains composants de la cellule et de nombreux xénobiotiques ainsi qu'aux rayonnements UV et radiations ionisantes. Ces réactions conduisent en effet à la genèse d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) ou de l'azote (NO). Ces ERO, ou ROS pour « reactive oxygen species », incluent les radicaux libres (radical

superoxyde $O_2^{\cdot-}$, dioxygène singulet 1O_2 , radical hydroxyle $\cdot OH$, $\cdot NO\dots$) et d'autres formes hautement réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La réaction des ERO avec l'ADN peut conduire à l'oxydation des bases (Figure 2) mais aussi du ribose, et à la formation de cassures de brins ou de pontages ADN-protéines (Marnett 2000; Dizdaroglu et al. 2002).

De nombreux contaminants sont décrits comme étant génotoxiques *via* la production d'ERO. Parmi les exemples bien décrits citons le B[a]P, qui après métabolisation par la voie des quinones exerce une partie de sa génotoxicité *via* la production d'ERO (figure 3B) (Xue et Warshawsky 2005) ou le cadmium, qui induit un stress oxydant *via* une diminution des antioxydants cellulaires et une production d'ERO par les mitochondries (Bertin et Averbeck 2006).

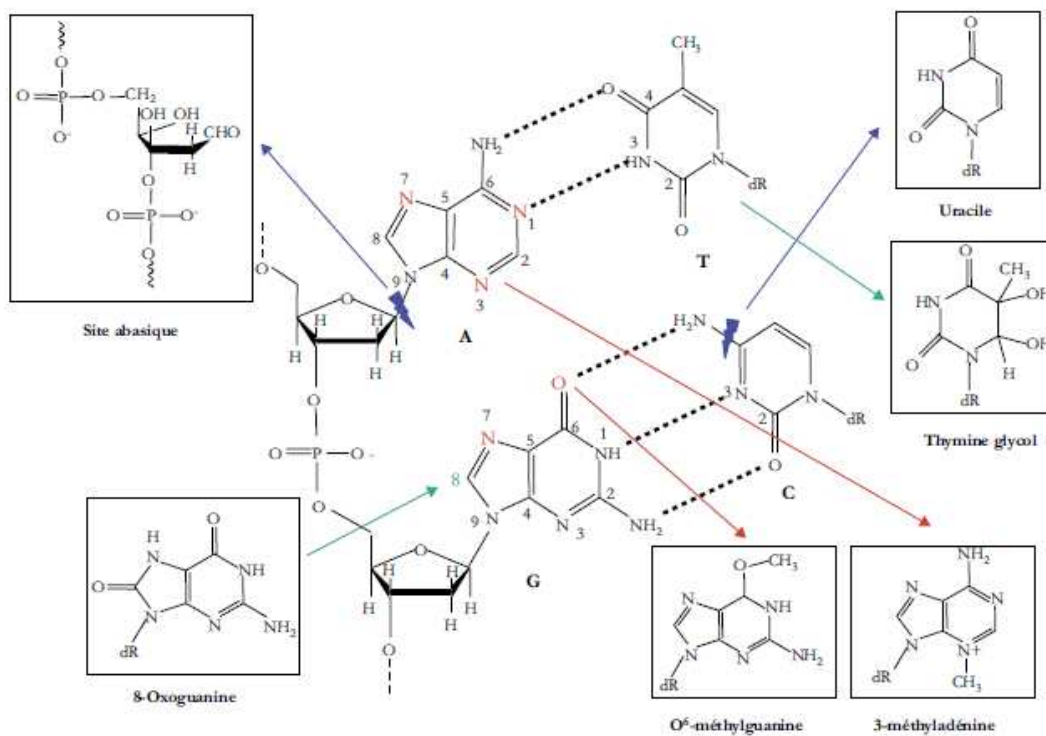


Figure 2 : Principales modifications des bases de l'ADN.

Lésions majoritaires issues de l'excision ou de la déamination des bases (→), du métabolisme oxydatif (→) ou de l'alkylation des bases (→).
(d'après Pourquier, 2006)

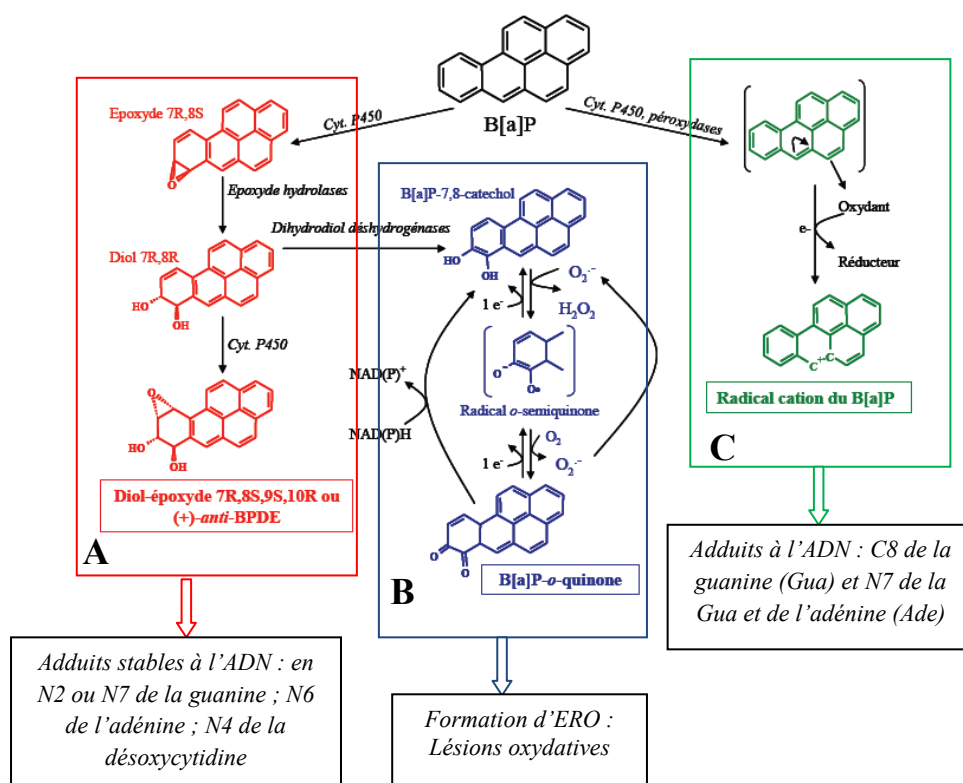


Figure 3 : Les trois voies d'activation du B[a]P et les différents types de lésions génotoxiques générées
(d'après Marie 2007, modifié)

Les mécanismes de formation des lésions oxydatives à l'ADN sont bien décrits dans la littérature (Evans et al. 2004). Une grande variété de bases oxydées a été identifiée (Figure 4) mais la 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) est l'une des plus abondamment et des plus rapidement formées, si bien qu'elle et son nucléoside correspondant (la 8-oxo-7,8-déoxyguanosine ou 8-oxodG) sont classiquement utilisés comme des biomarqueurs des dommages oxydatifs à l'ADN, en particulier chez l'homme (Collins et al. 1996). La présence de 8-oxoGua et de nombreuses autres bases oxydées dans l'ADN peut conduire à des erreurs de réparation et participe ainsi à la mutagenèse (principalement des mutations transverses GC>TA et GC>CG), à la cancérogénèse, et aux processus de vieillissement cellulaire (Kino et Sugiyama 2000; Cooke et al. 2003; Azqueta et al. 2009).

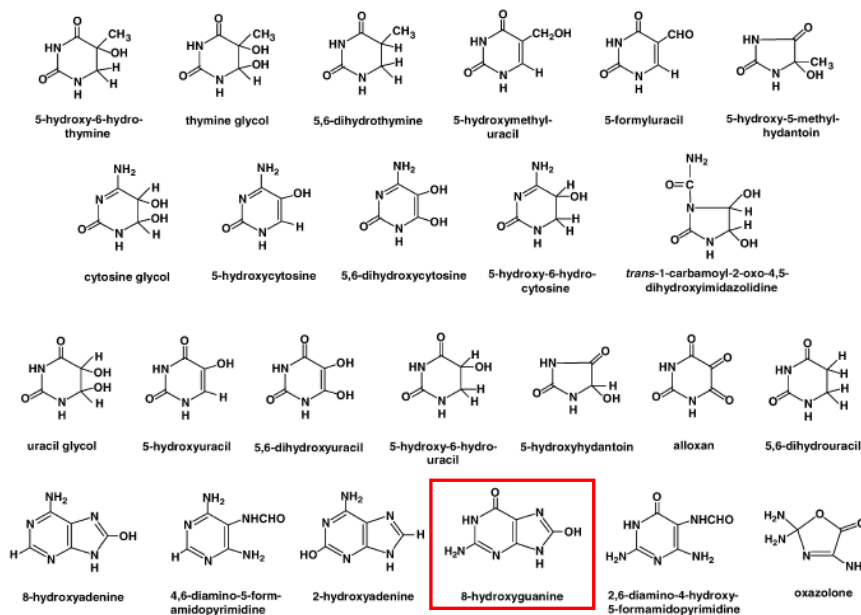


Figure 4 : Principaux produits du dommage oxydatif aux bases de l'ADN.
(d'après Cooke et al. 2003)

Formation d'adduits à l'ADN

Un adduit à l'ADN est le produit de la réaction entre une molécule présentant des sites électrophiles et les sites nucléophiles de l'ADN, conduisant à la formation d'une liaison covalente et à un produit plus ou moins volumineux (de Kok et al. 2002). Les sites nucléophiles de l'ADN sont essentiellement les noyaux puriques et pyrimidiques et les liaisons phosphate (Esaka et al. 2003; Farmer 2004). Il existe 17 sites potentiels de formation d'adduits au niveau des bases (Figure 5). La détection de certains adduits constitue un outil classique d'évaluation d'un risque mutagène, voire cancérigène pour une molécule donnée (Lutz 1979; Farmer 2004).

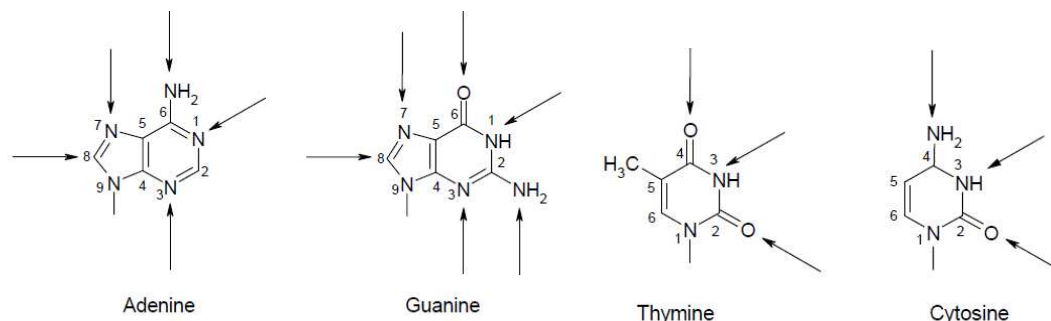


Figure 5 : Sites nucléophiles permettant la formation d'adduits sur les bases de l'ADN
(d'après Esaka et al. 2003)

➤ Les **adduits d'alkylation** sur les bases puriques ou pyrimidiques de l'ADN sont le résultat de l'action des agents alkylants, capables de fixer un radical alkyl sur les bases (Figure 2). Les sources d'alkylation de l'ADN peuvent être endogènes (S-adenosylméthionine et produits de peroxydation des lipides (Barrows et Magee 1982; Marnett et Burcham 1993) ou exogènes (nitrosamines, nitrosourée, certains agents anti-cancéreux, chlorure de vinyle...). L'alkylation d'un nucléotide peut entraîner des perturbations lors de la réplication et induire des mutations.

➤ Les **adduits d'oxydation**, en particulier sur la guanine, sont générés lors d'un stress oxydant (cf. ci-dessus), par ajout d'un groupement OH aux bases (Figure 2).

➤ Des **adduits plus volumineux** peuvent être observés lorsque certains xénobiotiques, après pénétration dans l'organisme et activation métabolique en composés très réactifs, se fixent par liaison covalente aux sites nucléophiles de l'ADN, de l'ARN ou les protéines. Ces adduits sont souvent suffisamment volumineux pour pouvoir créer des distorsions de la molécule d'ADN et bloquer la réplication et la transcription. C'est le cas par exemple des amines aromatiques issues de pesticides ou d'insecticides (Guengerich 2000), ainsi que des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), après bioactivation par la voie des mono oxygénases à cytochrome P450 (CYP1A). Cette voie des CYP1A entraîne avec le B[a]P la formation d'un époxyde sur les carbones C7 et C8 de la molécule par mono-oxygénation, dont l'hydrolyse conduit à la formation d'un diol (Figure 3A). Une nouvelle époxydation sur les carbones C9 et C10 par les cytochromes P450 transforme ce diol en un diol-époxyde, ou 7,8-dihydroxy-9,10-époxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrène (BDPE), le métabolite ultime du B[a]P pour sa réactivité vis-à-vis de l'ADN. Celui-ci se lie à l'ADN pour former majoritairement un adduit stable principalement sur les atomes N2 de la guanine et N6 de l'adénine (Szeliga et Dipple 1998; Marie et al. 2008) mais peut aussi former de façon minoritaire un adduit en position N4 de la déoxycytidine (Wolfe et al. 2004) ou en position N7 de la guanine (Xue et Warshawsky 2005). Cette dernière liaison, étant déstabilisatrice, donne naissance à un adduit dépurinant.

Une autre voie de métabolisation du B[a]P correspond à une oxydation mono-électronique de la molécule par des peroxydases et les CYP1A formant des radicaux cations, électrophiles très réactifs vis-à-vis de l'ADN (Figure 3C). Ces radicaux entraînent ainsi également la formation d'adduits, principalement en position C8 et N7 de la guanine (Gua) et N7 de l'adénine. D'autres HAPs peuvent être métabolisés selon cette voie, s'ils possèdent

également un potentiel d'ionisation bas, permettant l'arrachement d'un électron et la formation d'un radical cation relativement stable.

Les pontages

Les pontages inter-brins entre bases puriques ou pyrimidiques peuvent se produire après l'action respective de contaminants tels que la mitomycine C et le psoralène. D'autres types de pontages, comme ceux entre l'ADN et les histones, peuvent également être provoqués par des agents chimiques tels que des anti-cancéreux (ellipticines) et des aldéhydes que l'on retrouve dans les matières plastiques, des colorants et des solvants.

Les rayonnements UV sont une autre source importante de dommage à l'ADN (Ravanat et al. 2001). Les UVC, très énergétiques sont directement absorbés par l'ADN et l'endommagent gravement, mais n'atteignant pas la surface terrestre, ils ne jouent pas de rôle biologique *in situ*. Les UVB et UVA (Figure 6) traversent l'atmosphère, et les UVB peuvent être directement absorbés par l'ADN, interagissant essentiellement avec les bases pyrimidiques. Les radiations UV engendrent principalement deux types de photoproduits : des dimères de pyrimidine de type cyclobutane, formés par liaisons covalentes entre pyrimidines adjacentes, qui sont les produits majoritaires suite à une exposition aux UVB et C, et des photoproduits pyrimidine (6-4) pyrimidone (Ravanat et al. 2001) (Figure 7).

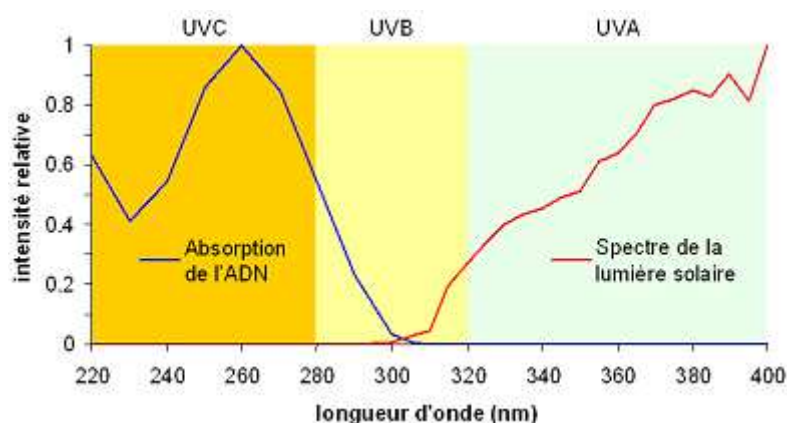


Figure 6 : Rayonnement UV, spectre solaire et absorption par l'ADN

Source : http://inac.cea.fr/Phocea/Vie_des_labos/Ast/ast_visu.php?id_ast=140

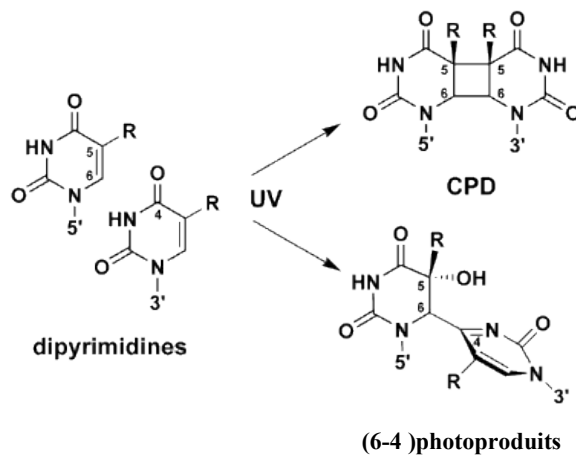


Figure 7 : Principaux photoproduits issus des radiations UV

CPD : dimère de pyrimidines-cyclobutane

(6-4) photoproduits : pyrimidine (6-4) pyrimidone

Les cassures simple et double brins

Peu d'agents induisent directement des cassures franches à l'ADN. Les principales sources de cassures double brins sont les radiations ionisantes (Frankenberg-Schwager 1990). Ces radiations proviennent du rayonnement cosmique et de la radioactivité naturelle de la terre, ou bien de sources anthropiques de radioactivité, et provoquent la formation de molécules excitées et ionisées entraînant divers types de dommages dont ces cassures. Les cassures peuvent aussi être induites par la production d'espèces radicalaires suite à l'action de certains composés oxydatifs exogènes ou endogènes (Eastman et Barry 1992), ou résulter de l'intervention des mécanismes de réparation de ces dommages (Eastman et Barry 1992; Collins et al. 1997). En conditions alcalines, certaines lésions de l'ADN se traduiront par des cassures de brins. Ces sites, dit « alcali-labiles », comprennent les sites AP, certains adduits, la thymine glycol, la 5,6-dihydrothymine, des photoproduits comme la pyrimidine(6-4)pyrimidone et certaines lésions induites par la bléomycine (Horváthová et al. 1998; Aso et al. 1999; Higurashi et al. 2003). Les cassures de brins peuvent également être dues à l'intercalation d'un xénobiotique, aux adduits et aux dimères de pyrimidine qui bloquent la fourche de réparation, ou à l'activation d'enzymes telles que topoisomérases et hydrolases lysosomales (Eastman et Barry 1992; Horváthová et al. 1998). Elles peuvent avoir pour conséquence des effets clastogènes et être à l'origine de micronoyaux.

Les intercalations

Certaines molécules, tel que l'éthidium, la proflavine, ou la doxorubicine, peuvent s'intercaler dans l'ADN, dans l'espace compris entre deux paires de bases. L'intercalation induit un changement de la structure locale du brins d'ADN, qui induit elle-même des modifications fonctionnelles, dont souvent une inhibition de la réplication ; ce qui fait de ces agents intercalants des composés potentiellement mutagènes.

1.3.2 Génotoxicité indirecte

1.3.2.1 Modulation des activités de réparation

La plupart des lésions primaires à l'ADN décrites ci-dessus sont prises en charge par des systèmes de réparation (dont les mécanismes seront détaillés dans la revue qui correspond à la publication I de notre travail, chapitre I § 2.6.2), qui jouent un rôle fondamental dans la pérennité des cellules et à plus long terme dans celle des individus. Or, certains contaminants environnementaux sont susceptibles d'agir en inhibant ou en modulant ces capacités de réparation (Ames et al. 1993; Cloutier et Castonguay 1998; Shugart et al. 2003). Ce type d'effet est alors susceptible d'accentuer la génotoxicité directe, en particulier dans les situations de pluri-contamination.

Au laboratoire, de nombreuses molécules sont connues et utilisées comme inhibiteur modèle pour étudier les différents mécanismes de réparation de l'ADN ou pour augmenter la sensibilité des essais de génotoxicité (Speit et Hartmann 1995; Martin et al. 1999; Speit et al. 2004b). Citons parmi les plus courantes, l'hydroxyurée, la cytosine arabinoside (Martin et al. 1999; Martin et al. 2000; Speit et Schütz 2008) ou encore l'aphidicoline (Speit et al. 2003; Speit et al. 2004b; Speit et Schütz 2008; Vande Loock et al. 2010) et le 3-aminobenzamide, ce dernier étant un inhibiteur de la PARP-1 (Poly-(ADP-ribose)polymérase-1), enzyme clé de la réparation des cassures de brins (Kopeika et al. 2004; Parsons et al. 2005). Ce type d'activité pourrait se retrouver dans l'environnement au titre des résidus médicamenteux puisque l'on assiste actuellement entre autre, à l'émergence de nombreux agents anticancéreux inhibiteurs de la PARP-1 (Węsierska-Gądek et al. 2012). Certains métaux lourds sont également connus pour leur capacité à inhiber la réparation de l'ADN en général (Hartwig 1998; Lankoff et al. 2006) (Tableau 1) et l'activité des ADN glycosylases en particulier (Wang et al. 2006). Des cibles potentiellement très sensibles au cadmium et au cuivre sont les doigts de zinc des facteurs de transcription de l'ADN et des enzymes de réparation (Giaginis et al. 2006).

Métal	Système de réparation	Lésions substrats de l'ADN	Etape la plus affectée	Mécanismes
Nickel(II)	NER	Photoproduits induits par les UV	Reconnaissance de la lésion	Compétition avec le Mg ²⁺
	BER	Oxydation des bases (incluant la 8-oxoGua), alkylations	Excision de la base	?
Cadmium(II)	NER	Photoproduits induits par les UV	Reconnaissance de la lésion	Compétition avec le Zn ²⁺
			Excision du nucléotide	Interagit avec la protéine ERCC1
	BER	Oxydation des bases (incluant la 8-oxoGua), alkylation	Excision de la base	Interagit avec la protéine TFIIH et RPA (réplication) Inhibe la Fpg : la substitution d'une cystéine dans le doigt de zinc de la protéine pourrait inhiber la liaison de la protéine à l'ADN. Inhibe OGG1 : diminue la transcription de hOGG1 en inhibant la liaison du facteur de transcription SPI à l'ADN. Inhibe l'activité de l'endonucléase APE1
	MMR	Réparation des mésappariements	Reconnaissance de la lésion	Inhibe l'hydrolyse de l'ATP et la liaison à l'ADN des complexes de liaisons MutSα, MutSβ (levure) et MSH2 (homme)
Arsenic(III)	NER	Photoproduits induits par les UV	Incision	?
Cobalt(II)	NER	Photoproduits induits par les UV	Incision, polymérisation	Compétition avec le Mg ²⁺

NER, Nucleotide excision repair, BER, Base excision repair

Tableau 1 : Exemples d'interaction des métaux lourds avec les principaux systèmes de réparation de l'ADN
(d'après Hartwig 1998)

1.3.2.2 Atteintes fonctionnelles de l'ADN via l'épigénome

En plus des effets génotoxiques au sens classique de la définition, il est intéressant de considérer les mécanismes de régulation de l'expression des gènes comme d'autres cibles potentielles des contaminants environnementaux. En effet une toxicité s'exerçant à ce niveau pourra modifier la fonctionnalité de l'ADN en l'absence de tout dommage structurel au niveau de la séquence nucléotidique (Cheng et al. 2012). Nous faisons ici référence à l'épigénome, constitué par une série de « marques chimiques », situées sur l'ADN lui-même et les histones qui l'entourent. Ces marques sont les principales clés permettant de moduler l'accessibilité de l'ADN à la transcription de gènes d'intérêt. Ces marques conduisent à différents états de la chromatine correspondant soit à une chromatine décondensée et transcriptionnellement active, soit à une chromatine condensée et transcriptionnellement inactive. Ce fascinant marquage épigénétique, réversible et transmissible mitotiquement ou

méiotiquement varie au cours du développement, de la différenciation cellulaire, avec le temps (vieillesse) mais aussi en réponse à des stimuli extérieurs tels que des conditions physico-chimiques du milieu, la nutrition et l'exposition à des xénobiotiques (Szyf 2007). Ces changements dans l'expression des gènes conduisent souvent à la modification du phénotype de l'organisme, et peuvent être transmis à la descendance, même lorsque celle-ci n'est plus exposée. De fait, ces mécanismes épigénétiques représentent des cibles extrêmement pertinentes en écologie et en écotoxicologie et pourraient avoir un intérêt en évaluation du risque environnemental (Vandeghehuchte et Janssen 2011) en particulier s'ils faisaient l'objet de développements en tant que biomarqueurs. Toutefois, si les connaissances en épigénétique humaine évoluent rapidement, cette discipline en est encore à un stade très précoce pour les espèces aquatiques.

Nous décrivons ci-après les principaux mécanismes épigénétiques identifiés à ce jour à savoir la méthylation des cytosines ou des histones, l'acétylation de ces dernières (Jones et Takay 2001), ainsi que leurs premières intégrations dans des études en écotoxicologie aquatique. D'autres mécanismes d'ordre post-transcriptionnel identifiés récemment chez l'homme sont également brièvement décrits ici.

Méthylation des cytosines de l'ADN :

L'expression d'un gène peut être modifiée par le niveau de méthylation en C5 des cytosines (5-MeCyt) dans des régions riches en dimères CpG de l'ADN, appelés îlots CpG. Ceux-ci sont souvent associés à des promoteurs de gènes (Figure 8A). Ces méthylation s'opèrent grâce à une famille d'enzyme, les DNA cytosine 5-méthyltransférases (DNMTs), capables de transférer un groupement méthyl provenant d'un cofacteur, la S-adénosylméthionine (SAM). Les îlots CpG des régions promotrices des gènes fonctionnels ne sont pas méthylés, alors que la méthylation de ces îlots réduit souvent le gène associé au silence. Le mécanisme proposé est que cette méthylation en C5 de la cytosine empêche la liaison des facteurs de transcription et inhibe ainsi leur interaction avec la machinerie cellulaire responsable de l'expression du gène (LeBaron et al. 2010). Par ailleurs, cet effet va dépendre du type de gène concerné (ex : oncogènes, dont l'expression favorise l'apparition de tumeurs).

Les méthylation de l'ADN peuvent être transmises de génération en génération. Le maintien de cet état d'activité (actif ou silencieux) d'une génération cellulaire à l'autre implique que les effets d'une exposition transitoire à un xénobiotique peuvent être transférés à

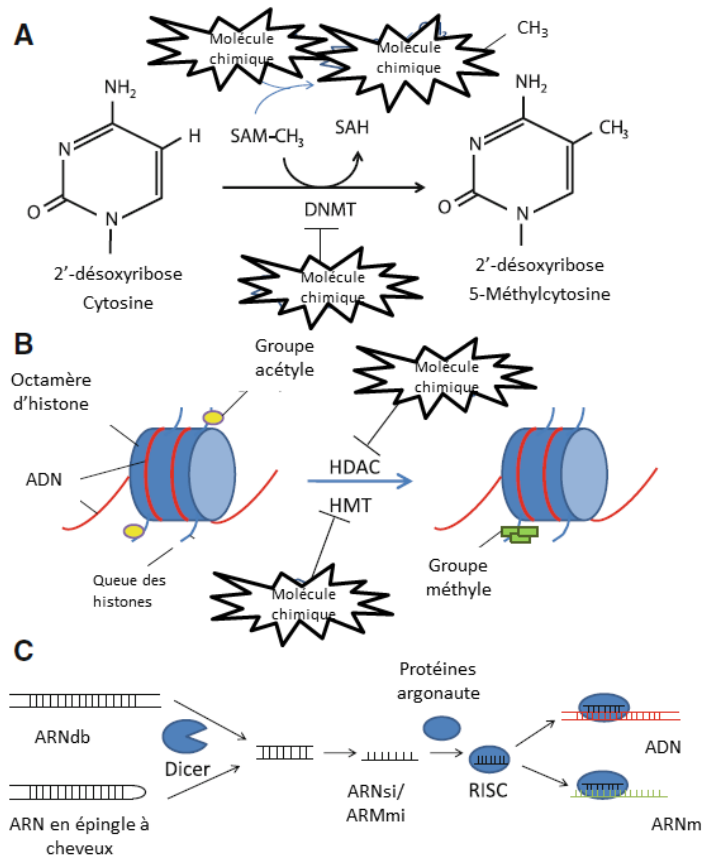
la génération suivante, même si elle n'a pas été exposée, par simple « héritage épigénétique ». Ainsi, il a déjà été montré que l'exposition d'une rate gestante à des perturbateurs endocriniens tels que la vinclozoline ou le méthoxychlore entraîne une décroissance de la capacité spermatogénique et augmente l'infertilité chez les mâles des générations F1 à F4 (Anway et al. 2005). L'exposition au tributylétain et au triphénylétain induit une déméthylation significative des 5-MeCyt chez le poisson (Wang et al. 2009), et l'exposition aux métaux lourds en général et au cadmium en particulier peut directement modifier l'état épigénétique du génome (Poirier et Vlasova 2002; Fragou et al. 2011). La méthylation de l'ADN a également été mise en évidence chez la daphnie, ce qui laisse pressentir des effets épigénétiques possibles chez cette espèce (Vandegheuchte et al. 2009a). Si chez cet organisme le cadmium (Cd) ne semble pas avoir d'effet sur le niveau de méthylation de l'ADN, l'exposition d'une génération parentale au zinc (Zn) a entraîné une diminution significative du niveau de méthylation chez la génération F1 (Vandegheuchte et al. 2009b).

Méthylation et acétylation des histones :

Les principales enzymes impliquées dans ce processus sont les histone déacétylases (HDACs), les histone acétyl transférases (HATs) et les histone méthyltransférases. L'état condensé ou décondensé de la chromatine est dicté par les modifications post-traductionnelles des histones liées à l'ADN : leur méthylation au niveau des résidus lysine entraîne une fermeture de la chromatine, alors que leur acétylation, toujours au niveau des résidus lysine, entraîne une ouverture de la chromatine (Figure 8B) et le recrutement d'ARN polymérase et de facteurs de transcription. La déacétylation conduit inversement au silence du gène. Il a déjà été montré que des xénobiotiques peuvent avoir des effets sur les enzymes responsables de ces modifications d'histones (Szyf 2007).

Autres mécanismes : ARN non codants régulateurs

Les microARN (ARNmi) et les petits ARN interférents (ARNsi), deux classes de petits ARN non codants, semblent également jouer un rôle important dans la modulation de l'expression des gènes chez l'homme. On parle alors d'inactivation épigénétique transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle. L'ARNsi s'associe à un complexe protéique en formant un nouveau complexe appelé RISC (RNA Induced Silencing Complex). Ce complexe s'apparie avec l'ARNm complémentaire de l'ARNsi (Figure 8C). En cas d'appariement parfait (ARNsi), l'ARNm est détruit et il n'y a donc pas traduction.



Les trois principaux mécanismes de l'épigénétique : A) la méthylation de l'ADN par transfert d'un groupe méthyle ($-CH_3$) en C-5 de la cytosine, formant la 5-méthylcytosine. SAM : S-adenosyl-méthionine, SAH : S-adenosylhomocystéine, DNMT : DNA-méthyltransférase. Les polluants peuvent agir en utilisant la SAM comme donneur de méthyle pour leur métabolisation ou en inhibant l'action des DNMTs. B) Déacétylation et méthylation des queues des protéines histones. HDAC : Histone déacétylase ; HMT : histone méthyltransférase. Les polluants peuvent agir sur l'action de ces deux enzymes. C) Les molécules d'ARN non codant tels que microARN et petit ARN interférant (ARNmi et ARNsi) sont formées à partir d'ARN double brin (ARNdb) ou molécules d'ARN en épingle à cheveux. Le complexe RISC cible l'ARN complémentaire (ARNm) ou l'ADN et interfère avec la transcription et la translation.

Figure 8 : Schéma des principales modifications épigénétiques et sites d'actions potentiels des polluants chimiques.

(d'après Vandegheuchte et Janssen 2011)

Les RISC étant à l'origine de cette destruction restent ensuite parfaitement fonctionnels, ce qui leur permet d'opérer de nouveau sur d'autres ARNm de même spécificité. C'est cette réutilisation qui les rend particulièrement offensifs. Le système de « RNA silencing » pourrait également interagir avec les autres mécanismes épigénétiques. En association avec les ARN

polymérase, les RISC peuvent activer les ADN méthyltransférases, et agir ainsi sur la méthylation de l'ADN (Vandegheuchte et Janssen 2011).

Les microARN (ou ARNm) sont de courts acides ribonucléiques simple-brins propres aux cellules eucaryotes. Leur appariement à une séquence complémentaire de l'ARN messager du gène cible conduit à la répression transcriptionnelle ou à la dégradation de cet ARNm. Il semblerait que les microARN modulent également les différences interindividuelles de réponse aux xénobiotiques (Szyf 2007) et que l'exposition aux xénobiotiques puisse influencer sur leur expression (Saito et Jones 2006). Ce mécanisme épigénétique semble effectif chez le poisson (Boonanuntanasarn et al. 2003).

2 Mécanismes de défense des organismes vis-à-vis de la génotoxicité

Pour protéger leur ADN, cible de nombreuses agressions, les organismes aquatiques ont développé plusieurs types de mécanismes de défense : les premiers sont les comportements et les traits physiologiques pour éviter dans la mesure du possible, les dommages à l'ADN ; ceux-ci concernent essentiellement les rayonnements UV. Viennent ensuite les mécanismes cellulaires comme la biotransformation ou les défenses anti-oxydantes. En dernier recours, lorsque ces dommages n'ont pu être évités, les mécanismes spécifiques de réparation des lésions à l'ADN entrent en jeu.

2.1 Comportement d'évitement

L'eau ne constitue qu'un écran partiellement efficace contre la fraction UV du rayonnement solaire. En effet, un rayon UVB doit traverser plus de 500 mètres d'eau pure avant d'être totalement absorbé. Dans la nature, l'eau contient toutefois des matières organiques capables d'absorber une partie des rayons UVB et UVA (Bracchini et al. 2005). Dans l'environnement, les UVB peuvent ainsi pénétrer au plus jusqu'à quelques dizaines de mètres de profondeur dans l'eau claire ou peuvent être complètement absorbés dès les premières dizaines de centimètres en eau turbide (Häder et al. 2007). De fait, dans de nombreux écosystèmes aquatiques, les organismes occupant la zone euphotique proche de la surface de l'eau, potentiellement exposés aux rayonnements UVB, ont développé des stratégies pour faire face aux dommages potentiels. La première d'entre elle est un comportement d'évitement (Figure 9). Ainsi la profondeur de fraie chez le poisson est corrélée avec l'exposition aux UV : une incubation *in-situ* a montré que dans un lac présentant

une eau limpide, 100% des œufs de perche (*Perca flavescens*) meurent avant l'éclosion lorsqu'ils sont placés proches de la surface. Dans ce même lac, 92% des œufs sont pondus à plus de 3 m de profondeur, alors que dans un lac proche moins transparent, 76% des œufs sont pondus à moins d'un mètre de profondeur (Huff et al. 2004).

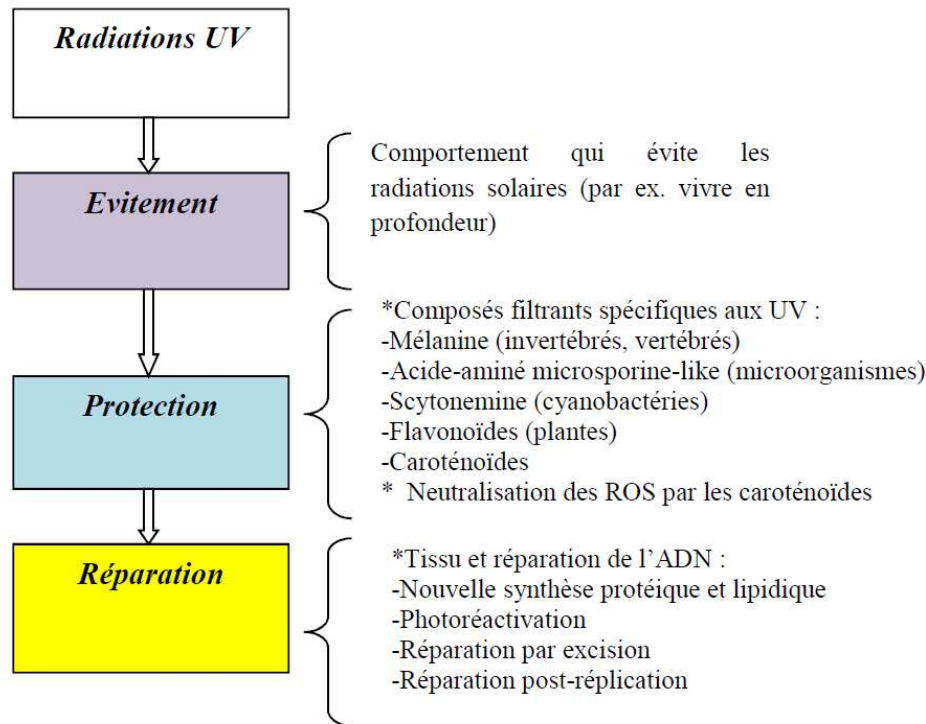


Figure 9 : Mécanismes d'évitement, de protection et de réparation des organismes vis-à-vis des rayonnements UV.
(d'après Dahms et Lee 2010)

2.2 Mécanismes photoprotecteurs

Le mucus représente une première barrière physiologique contre les dommages UV-induits. Puis, au niveau cellulaire, les mécanismes photoprotecteurs et les mécanismes de défenses antioxydantes ont une grande importance dans la protection vis-à-vis des UV (Figure 9). Chez les organismes aquatiques, on trouve plusieurs composés photoprotecteurs connus pour absorber directement ou indirectement les radiations solaires comme des pigments type mélanine et caroténoïdes (Lamare et Hoffman 2004; Olson et Mitchell 2006; Auerswald et al. 2008).

2.3 Bioactivation des xénobiotiques

La biotransformation se définit par un ensemble de réactions biochimiques dont la finalité est de détoxifier les xénobiotiques en les rendant plus facilement éliminables par

l'organisme. Elle comporte trois phases (Figure 10). Les principales réactions de **Phase I**, ou de fonctionnalisation, sont par exemple des réactions d'oxydation, prises en charge par les mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP) fortement inductibles pour la plupart d'entre elles. Elles sont surtout exprimées dans le foie mais on les trouve aussi dans d'autres organes (poumons, reins...).

Certaines réactions d'oxydation peuvent également, dans une moindre mesure, être prises en charge par les déshydrogénases agissant sur les alcools, les aldéhydes aliphatiques et aromatiques, et par des monoamines oxydases. Les polluants aromatiques peuvent augmenter ou diminuer l'activité catalytique des enzymes à CYP. Chez le poisson, les mono-oxygénases hépatiques sont particulièrement induites par les composés de type hydrocarbures aromatiques halogénés tels que les polychlorobiphényles (PCB), les HAP et les dioxines. D'autres réactions de phase I impliquant les flavines monooxygénases, des estérases, hydrolases, et déshydrogénases sont également possibles mais beaucoup plus rares.

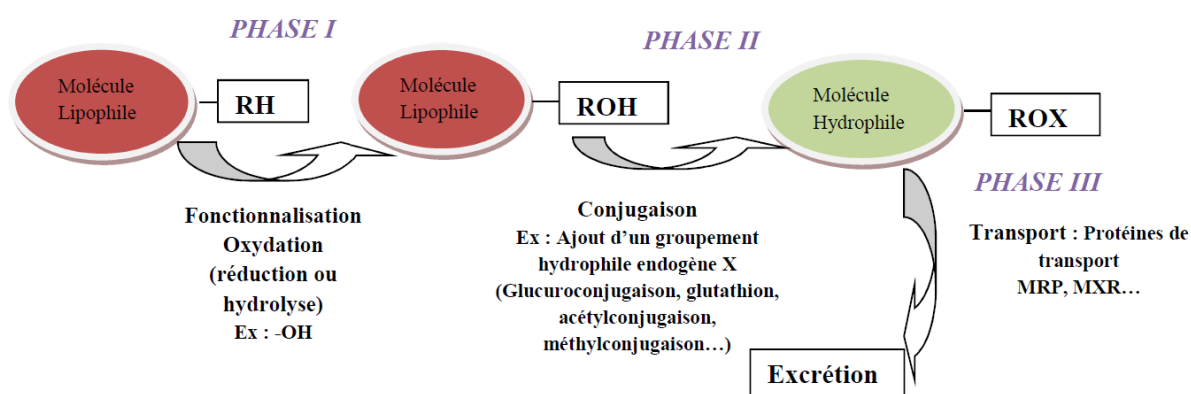


Figure 10 : Principales étapes de la biotransformation des xénobiotiques lipophiles

Les réactions de **Phase II** ou de conjugaison concernent l'ajout d'un radical hydrophile : elles ont lieu sur les métabolites de phase I ou sur des xénobiotiques non modifiés, si leur structure chimique le permet. La conjugaison du xénobiotique avec un composé endogène permet d'augmenter l'hydrophilie de la molécule et facilite son transport et son élimination.

Enfin, les réactions de **Phase III** impliquent des protéines de transport incluant les ABC transporteurs, pour ATP-Binding Cassette, telle que la p-glycoprotéine et les protéines MRP (Multidrug Related Protein) ou MXR (Multi Xenobiotic Resistance), permettant l'excrétion des produits de biotransformation.

Il est à noter que ces mêmes réactions de biotransformation, qui ont pour vocation première de détoxifier l'organisme, peuvent dans certains cas aboutir à la formation de molécules beaucoup plus toxiques que les molécules parents ; c'est le cas de certains HAPs par exemple, qui, pris en charge par la voie des monooxygénases à cytochromes P450, sont transformés en diols-époxydes pouvant réagir avec l'ADN comme décrit précédemment (Figure 3A).

2.4 Défense contre le stress oxydant

Nous avons vu précédemment que les lésions oxydatives de l'ADN par les ERO sont des événements fréquents, notamment liés à des événements endogènes. Pour y faire face, les cellules sont équipées de plusieurs systèmes de défense antioxydante dont l'activité est prépondérante.

➤ Les **systèmes antioxydants primaires** incluent certains dispositifs enzymatiques tels que la superoxyde-dismutase (SOD), présente dans le cytosol et les mitochondries, capable d'éliminer O_2^- en produisant H_2O_2 ; la catalase (CAT) localisée dans les peroxysomes et permettant la dismutation de H_2O_2 en O_2 et en eau; et la glutathion peroxydase (GPx) également présente dans le cytosol et les mitochondries, permettant de catalyser l'oxydation du glutathion (GSH) pour former du GSSG (forme oxydée du glutathion) tout en réduisant des hydroperoxydes organiques ou en consommant H_2O_2 (Figure 11).

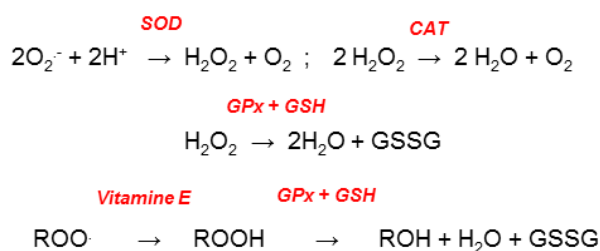


Figure 11 : Principaux mécanismes de défense contre les ERO

SOD : superoxyde dismutase, CAT : catalase ; GPx : glutathion peroxydase, GSH : glutathion (forme réduite), GSSG : glutathion (forme oxydée)

Ces trois enzymes antioxydantes majeures se retrouvent chez les organismes aquatiques bien qu'en quantité variable selon les espèces (Winston 1991). Les molécules empêchant la conversion d' O_2^- et H_2O_2 en radical hydroxyle ($\cdot OH$) sont également incluses dans les antioxydants primaires (protéines de stockage et de transport du fer ou du cuivre telles que

transferrine, lactoferrine, ferritine, métallothionéine, céruléoplasmine...). Elles agissent en chélatant les ions métalliques catalyseurs de cette réaction. Par ailleurs, les métallothionéines peuvent également agir en piégeant directement les ERO (Thornalley et Vasák 1985).

➤ Les **systèmes antioxydants secondaires** agissent sur les intermédiaires réactifs, ou fixent directement les radicaux libres, empêchant alors la propagation des réactions d'oxydation. D'autres réduisent les ERO et doivent ensuite être régénérés afin de reconstituer le pool intracellulaire. La principale molécule antioxydante liposoluble est la vitamine E (ou α -tocophérol). Les vitamines C et A ont également des propriétés antioxydantes (Moore et al. 1989; Goudable et Favier 1997). L'acide urique, le coenzyme Q-10 et les composés thiolés intracellulaires tels que le glutathion (GSH) et l'homocystéine sont aussi des antioxydants secondaires (Jahngen-Hodge et al. 1997; Neuzil et al. 1997).

➤ Les **systèmes antioxydants tertiaires** sont eux impliqués dans la réparation de l'ADN et la méthionine sulfoxyde réductase.

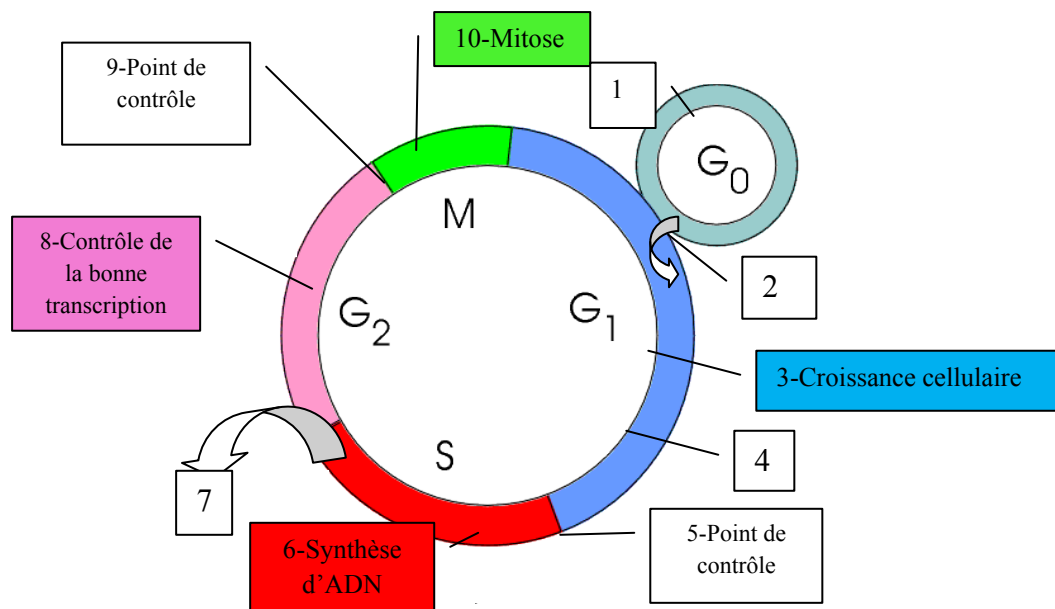
2.5 Modulation du cycle cellulaire

Lorsque les mécanismes de protection précédemment évoqués ne suffisent pas à maintenir l'intégrité de l'ADN, une seconde ligne de défense entre en jeu. Elle commence par des modulations du cycle cellulaire qui déterminent l'enclenchement de processus tels que la réparation des dommages à l'ADN ou l'apoptose. Ces mécanismes sont prépondérants dans le maintien de l'intégrité du génome, visent à la plus grande fidélité dans la transmission du matériel génétique et contribuent à limiter l'instabilité de l'information génétique.

Le cycle cellulaire des cellules eucaryotes comprend 4 phases (Figure 12): la phase S (synthèse) permet la répllication de l'ADN, la phase M (mitose) permet la division en deux cellules filles, et deux phases d'intervalle, pour l'une la croissance cellulaire (G1), pour l'autre le contrôle de la bonne transcription (G2). Lorsque la cellule ne se divise plus, elle entre dans une phase de sénescence, G0. L'arrêt en G0 peut être induit par différents stimuli exogènes (radiations UV, drogues chimio thérapeutiques) ou endogènes (activation d'oncogènes, stress oxydatif). En fonction des stimuli qui la déclenche, la sénescence peut être répllicative (après un certain nombre de divisions cellulaires) ou accélérée, en particulier lorsqu'elle est induite par des lésions de l'ADN. Elle représente un programme de protection contre toute capacité de prolifération illimitée et est donc un mécanisme suppresseur de tumeur, inhibant la prolifération des cellules présentant des lésions à l'ADN. Si les dommages à l'ADN sont trop importants, la cellule cesse de se diviser, reste en phase G0 ou se suicide

par apoptose. Dans le cas contraire, différents points de contrôle induisent une pause temporaire en G_0 , activent la réparation de l'ADN et assurent le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire le temps de la réparation, puis la ré-initiation du cycle (Bartek et Lukas 2001).

Les points de contrôle, situés entre les phases G_1 et S et les phases G_2 et M , sont constitués d'une succession de signaux cellulaires transmis par trois groupes de protéines : les senseurs des dommages à l'ADN, les transducteurs (dont ATM et ATR), puis les effecteurs qui exécutent les réponses, et incluent donc les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et la régulation de la transcription et du cycle cellulaire (BRCA1, Cdc25c, p53) (Figure 13).



En [1], sous l'influence de facteurs de croissance, la cellule reçoit le signal de se diviser.

En [2], les cellules sortent de G_0 et progressent en phase G_1 (croissance cellulaire [3]) au-delà d'un point de restriction [4] si elles reçoivent un stimulus constant.

En [5], il existe un point de contrôle ne laissant se diviser que l'ADN « normal ».

En [6], la cellule double sa quantité d'ADN. En cas d'anomalie non réparable de l'ADN, elle évolue vers la mort [7] par apoptose. Sinon, elle progresse en phase G_2 ([8] contrôle de la bonne transcription)

En [9], nouveau point de contrôle avant la séparation du matériel génétique vers deux cellules filles.

En [10], la mitose s'accomplit. Les cellules filles se séparent et retournent en G_0 , sauf si un stimulus entretient le processus

Figure 12 : Cycle cellulaire: étapes et points de contrôle

Source : <http://www.inrp.fr/Acces/biotic/genetic/adn/html/points3.htm>, modifié

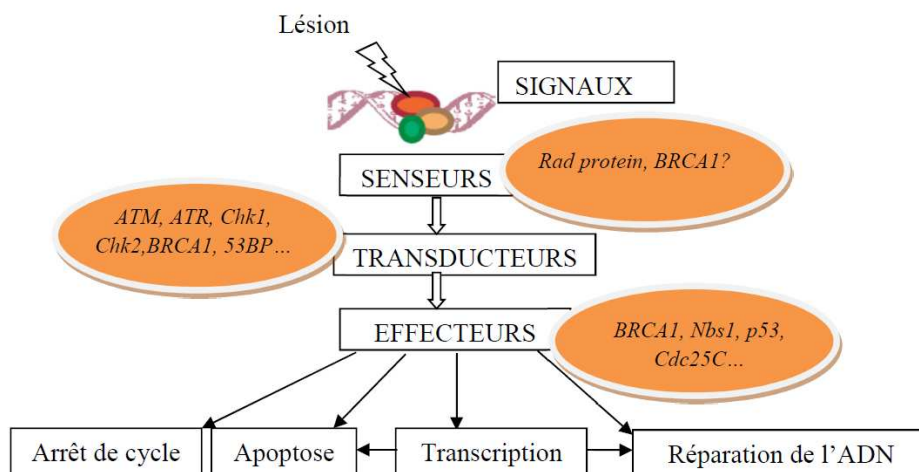


Figure 13 : Réponses cellulaires aux dommages à l'ADN identifiées chez les mammifères.
(d'après Zhou et Elledge 2000), modifié

2.6 Mécanismes de réparation de l'ADN

2.6.1 Généralités

L'ADN étant constamment exposé à de nombreux agents chimiques et physiques nocifs, environ 10 000 lésions sont induites quotidiennement dans chaque cellule (Hoeijmakers 2001). Pour y faire face, la cellule peut faire appel à 5 grands systèmes de réparation : la réparation par réversion directe de la lésion, la réparation par excision de bases (BER), la réparation par excision de nucléotides (NER), le système de réparation des mésappariements (MMR) ou la réparation par recombinaison de l'ADN. Chacun d'entre eux prendra en charge préférentiellement un ou plusieurs types de lésions de l'ADN (Tableau 2), mais une même lésion pourra éventuellement être réparée par différents mécanismes, ce qui permet à la cellule de compenser dans une certaine mesure la défaillance d'un de ces systèmes. Nous ne détaillerons ici que les deux principaux systèmes de réparation impliqués dans la réparation directe des dommages primaires induits par les génotoxiques, que sont le BER et le NER. L'ensemble des mécanismes de réparation identifiés chez le poisson sera ensuite abordé plus en détail dans le paragraphe suivant (§2.6.2).

<i>Lésions</i>	<i>Mécanismes de réparation associés</i>
O ⁶ -méthylguanine Certains adduits d'alkylation	Réparation directe de la lésion
Mésappariement de bases	Réparation des mésappariements (MMR)
Sites abasiques Bases oxydées Désamination de bases Bases alkylées Cassures simple brin	Réparation par excision des bases (BER)
Lésion UV (dimères de cyclopyrimidines et photo-produits 6,4) Adduits volumineux Adduits de platines	Réparation par excision nucléotidique (NER)
Cassures double brin de l'ADN	Réparation par recombinaison homologue (HRR) Réparation par recombinaison non-homologue ou end-joining (NHEJ)

Tableau 2 : Les différents types de lésions prises en charge et les différents systèmes de réparation de l'ADN
(d'après Pourquier 2006) modifié

La réparation par excision des bases, dont les différentes étapes sont présentées dans la Figure 14, prend principalement en charge les lésions oxydatives liées au métabolisme cellulaire, les alkylations, et les cassures simples brins. Ce mécanisme fait appel à une suite très coordonnée de réactions qui s'enchaînent de façon à éviter l'exposition de l'ADN en cours de réparation au milieu cellulaire (Dianov et Parsons 2007).

Le système de réparation par excision des nucléotides (Figure 15) prend préférentiellement en charge la réparation des adduits volumineux induits par l'exposition aux agents génotoxiques environnementaux (aflatoxines, benzo[a]pyrène...), les pontages avec les molécules exogènes, et les lésions induites par les UV: (6-4) photoproduits ou dimères de pyrimidine cyclobutane (Christmann et al. 2003).

Ce mécanisme comprend deux voies, le GG-NER (*global-genome* NER), qui répare les lésions à l'ADN indépendamment de leur localisation dans le génome et le TC-NER (*transcription coupled*-NER), induit par la présence de lésions au niveau des régions transcrites de l'ADN. Les gènes transcrits peuvent ainsi être réparés en priorité et avec beaucoup plus d'efficacité que le reste du génome (Hoeijmakers 2001).

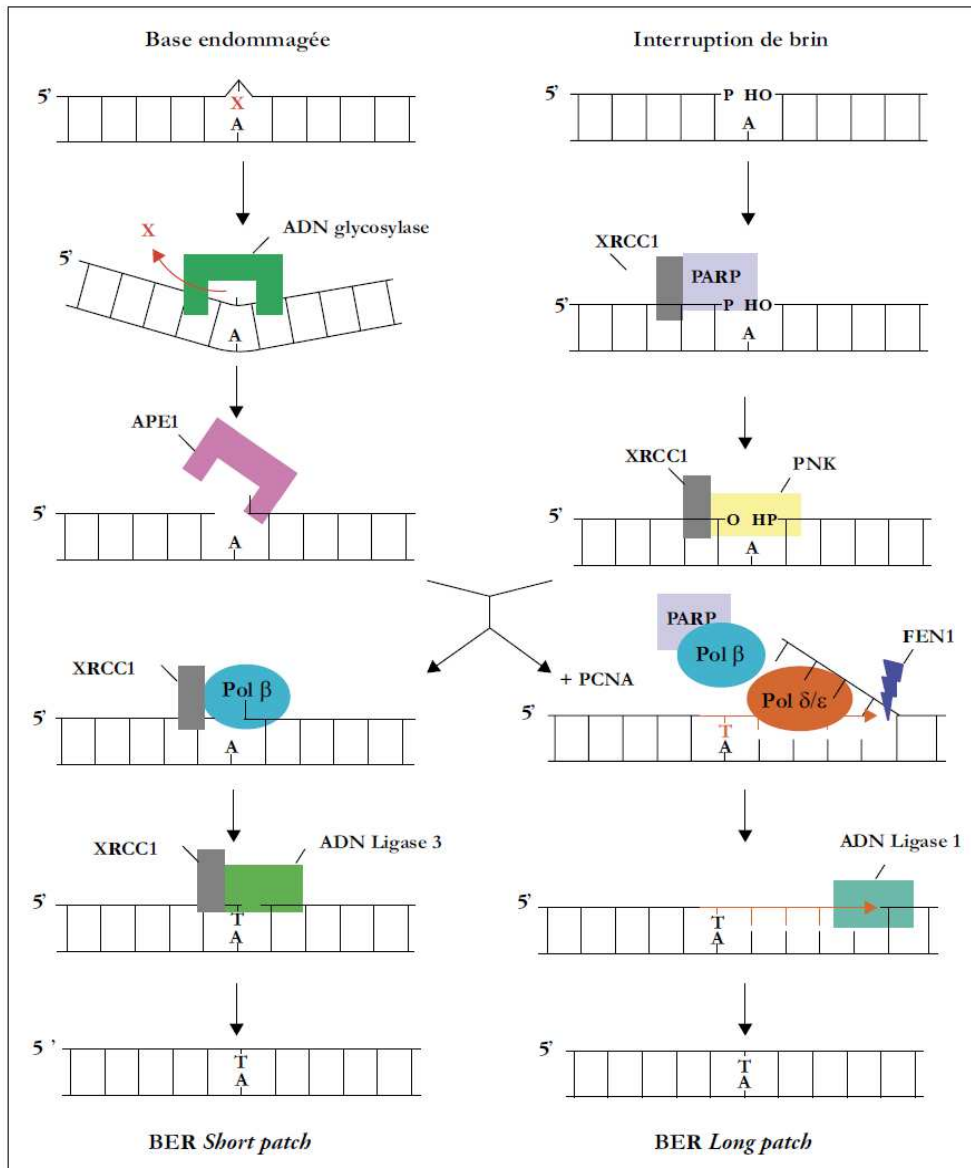


Figure 14 : Mécanisme de réparation par excision des bases (BER).

Chez l'homme, la base endommagée est éliminée par une ADN glycosylase spécifique du type de dommage et l'ADN est incisé par l'endonucléase APE1. S'il s'agit d'une coupure simple brin, c'est généralement la protéine PARP qui identifie la lésion, puis recrute le complexe XRCC1. Dans les deux cas, l'interruption du brin peut être réparée par deux voies : le « short-patch BER » (majoritaire) consistant à remplacer uniquement le nucléotide manquant avec l'intervention du facteur XRCC1 et de l'ADN ligase 3, ou le « long-patch BER », qui implique la synthèse de plusieurs nucléotides (deux à six après la lésion) par la polymérase β en association avec la molécule PCNA (d'après Pourquoier 2006).

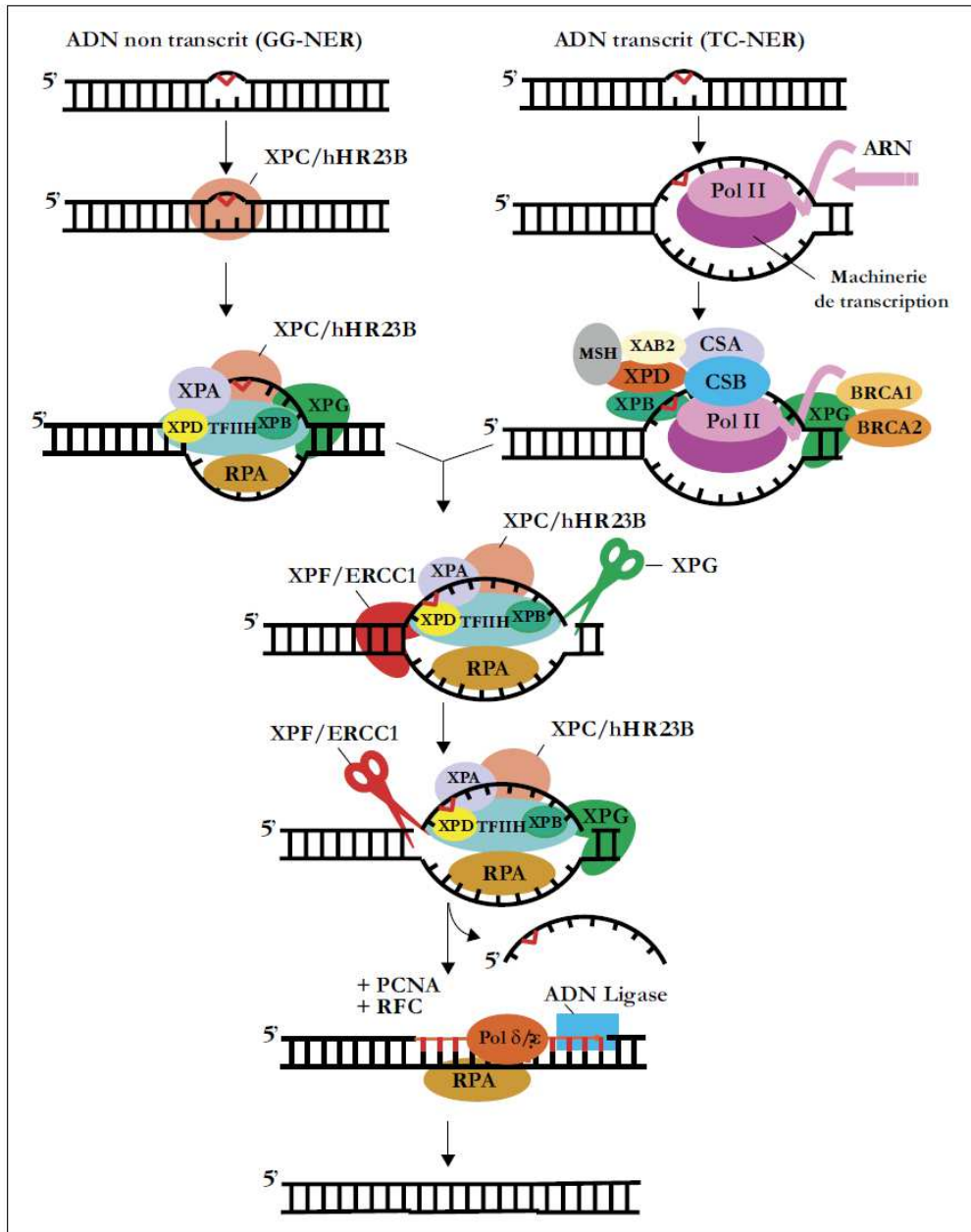


Figure 15 : Mécanisme de réparation par excision des nucléotides (NER).

On distingue deux voies de NER selon la localisation de la lésion (ADN non transcrit et ADN transcrit), qui ne diffèrent que par le mode de détection de la lésion : par le complexe XPC-hHR23B dans le cas du CG-NER et par le blocage de la machinerie de transcription dans le cas du TC-NER. Dans ce dernier cas, les protéines CSA et CSB participent à la détection du dommage au même titre que l'ADN Polymérase impliquée dans la synthèse du brin. Les deux hélicases XPB-XPD du complexe TFII-H permettent le maintien ouvert de la double hélice. Les nucléases XPG et XPF-ERCC1 effectuent alors l'excision du brin endommagé puis l'ADN polymérase effectue une nouvelle synthèse de brin et la religation est assurée par l'ADN ligase (d'après Pourquier 2006).

Si les systèmes de réparation de l'ADN sont relativement bien connus chez l'homme, l'information concernant les organismes aquatiques et le poisson en particulier est beaucoup plus diffuse et parcellaire. La recherche des connaissances dans ce domaine a fait l'objet d'une partie importante de ce travail bibliographique et l'absence de synthèse sur le sujet à ce jour nous a incité à rédiger une revue bibliographique publiée dans le journal « Aquatic Toxicology ». (Kienzler et al., 2013. Aquatic Toxicology 134-135, 47-56)

2.6.2 Activités de réparation de l'ADN chez le poisson : Publication I

Résumé : La réparation de l'ADN étant la première ligne de défense contre les génotoxiques, sa connaissance approfondie chez les espèces cibles est de première importance. Les poissons ou les lignées cellulaires pisciaires étant fréquemment utilisées comme modèle d'étude en génotoxicité aquatique, il est légitime de s'interroger sur la façon d'intégrer à ces études les capacités de réparation de l'ADN, et de se demander dans quelle mesure celles-ci pourraient être considérées comme des biomarqueurs d'intérêt. Par ailleurs, une meilleure connaissance de ces capacités de réparation chez le poisson pourrait aider à l'interprétation des données de génotoxicité et au choix d'espèces cibles, de stades de développement ou de tissus particulièrement intéressants, que ce soit dans le cadre d'études de surveillance environnementale ou de développement de biomarqueurs. La première partie de cette revue dresse un état des lieux des connaissances sur les différents systèmes de réparation chez le poisson, *in vivo* et sur modèles cellulaires, s'intéressant tour à tour au mécanisme de réparation par excision des bases (BER), à la réversion directe des alkylations par les O⁶-alkylguanine transférases, à la réparation par excision des nucléotides (NER), ainsi qu'à la réparation photoenzymatique et à la réparation des cassures double brins par la recombinaison homologue ou non homologue.

Dans une seconde partie, une revue des études écotoxicologiques intégrant la réparation de l'ADN comme paramètre de réponse à des contaminants seuls ou en mélange est réalisée. Trois approches sont fréquemment retrouvées dans la littérature : l'étude de l'expression des gènes de réparation de l'ADN en réponse à l'exposition aux génotoxiques, le suivi de l'activité de réparation de l'ADN par la mesure en cinétique du nombre de lésions dans le temps, et l'étude de la modulation des activités de réparation de l'ADN suite à l'exposition *in situ* aux génotoxiques. Enfin, le lien entre ces connaissances et l'intérêt qu'elles pourraient avoir en écotoxicologie ainsi que les perspectives d'utilisation de ces connaissances en évaluation du risque écotoxicologique sont abordées.

DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: A review

Aude Kienzler¹, Sylvie Bony^{1,2}, Alain Devaux^{1,2}

¹ Université de Lyon, UMR LEHNA 5023, F-69518, Vaulx-en-Velin, France

² INRA, USC IGH 1369, ENTPE, F-69518, Vaulx-en-Velin, France

Abstract

The knowledge of DNA repair in a target species is of first importance as it is the primary line of defense against genotoxicants, and a better knowledge of DNA repair capacity in fish could help to interpret genotoxicity data and/or assist in the choice of target species, developmental stage and tissues to focus on, both for environmental biomonitoring studies and DNA repair testing.

This review focuses in a first part on what is presently known on a mechanistic basis, about the various DNA repair systems in fish, *in vivo* and in established cell lines. Data on base excision repair (BER), direct reversal with O⁶-alkylguanine transferase and double strand breaks repair, although rather scarce, are being reviewed, as well as nucleotide excision repair (NER) and photoreactivation repair (PER), which are by far the most studied repair mechanisms in fish. Most of these repair mechanisms seem to be strongly species and tissue dependent; they also depend on the developmental stage of the organisms. BER is efficient *in vivo*, although no data has been found on *in vitro* models. NER activity is quite low or even inexistent depending on the studies; however this lack is partly compensated by a strong PER activity, especially in early developmental stage.

In a second part, a survey of the ecotoxicological studies integrating DNA repair as a parameter responding to single or mixture of contaminant is realized. Three main approaches are being used: the measurement of DNA repair gene expression after exposure, although it has not yet been clearly established whether gene expression is indicative of repair capacity; the monitoring of DNA damage removal by following DNA repair kinetics; and the modulation of DNA repair activity following exposure *in situ*, in order to assess the impact of exposure history on DNA repair capacity. Since all DNA repair processes are possible targets for environmental pollutants, we can also wonder at which extent such a modulation of repair capacities in fish could be the base for the development of new biomarkers of genotoxicity.

Knowing the importance of the germ cell DNA integrity in the reproductive success of aquatic organisms, the DNA repair capacity of such cells deserve to be more studied, as well as DNA repair capacities of established fish cell lines. The limited amount of available data, which shows low/slow DNA repair capacities of fish cell lines compared with mammalian

cell lines, concerned mainly the NER system; thus this point merits to be explored more deeply. Additionally, since some of the DNA repair systems appear more efficient in embryo larval stages, it would be of interest to consider embryonic cell lineages more closely.

Keywords: DNA repair, fish, fish cell line, genotoxicity.

Contents

1. Introduction	48
2 DNA repair systems in fish and fish cell lines	49
2.1 Base excision repair	49
2.2 Direct reversal with O⁶-alkylguanine transferase	50
2.3 Nucleotide excision repair (NER)	52
2.4 Photoenzymatic repair	55
2.5 Repair of double strand breaks	56
3 How to assess DNA repair in an ecotoxicological perspective	57
3.1 Expression of DNA repair genes in response to genotoxicants	58
3.2 Assessing DNA repair activity by monitoring DNA damage removal	60
3.3 Modulation of DNA repair activity following exposure to genotoxicant <i>in situ</i>	60
4 Conclusion and perspectives	61

1. Introduction

In contaminated environments, the loss of DNA structural or functional integrity in exposed organisms can result in deleterious effects in individuals and have delayed consequences at the population level, especially when fitness is affected through impaired growth or reproduction (Devaux et al., 2011; Lacaze et al., 2011a; Lewis and Galloway, 2009). However, a large array of primary DNA damages are likely to be repairable, therefore the use of genotoxicity biomarkers in fish would gain from a better knowledge of their DNA repair capacities. The early fish DNA repair studies have employed cell lines, either established or primary ones, and have compared the dose response and DNA repair data with similarly treated mammalian cultured cells (Mano et al., 1982; Regan et al., 1982; Shima et al., 1981). From these first results, substantiated by some more recent ones, it has evolved a general belief that fish and fish cell lines might possess rather low DNA repair activities compared with mammals (Bailey et al., 1996; Bols et al., 2005; Miller et al., 1989; Willett et al., 2001). However, given the known differences between fish and mammalian cells (lower

growth temperatures and extended doubling time in fish), the conclusion that fish DNA repair occurs at low rate or capacity requires further examination (Walter et al., 2001b).

All of the basic DNA repair pathways, such as base and nucleotide excision repair (BER and NER), photoreactivation or photoenzymatic repair (PER), homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ) have been proven to exist in fish (Ahmed et al., 1993; Applegate and Ley, 1988; Ishikawa et al., 1984; Weber, 2005) as well as the presence of poly(ADP-ribose)polymerases (PARP) (Burtscher et al., 1987; Fan et al., 2006; Hagmann et al., 1998). *Xiphophorus* is one of the few genus for which a rather complete view of DNA repair capacities and species-specific differences are available because their well-established backcross hybrid genetics make them an excellent system to study the contribution of DNA repair to induced tumorigenesis (David et al., 2004). The other species used for genotoxicity, carcinogenesis and DNA repair studies are zebrafish, often chosen as a model system to detect genotoxicants in water and to study carcinogenesis (Notch and Mayer, 2009b; Notch et al., 2007; Sandrini et al., 2009a; Sandrini et al., 2009b; Soares et al., 2012; Sussman, 2007; Troxel et al., 1997), rainbow trout (Bailey et al. 1988; Miller et al 1989; Bailey et al 1996; Weimer et al. 2000; Sekar et al, in press), particularly studied regarding its sensitivity to aflatoxin (AFB1) carcinogenesis (Bailey et al., 1987; Nakatsuru et al., 1990), and medaka (Aoki et al., 1993; Ishikawa et al., 1984; Masahito et al., 1989).

This paper aims first at reviewing the knowledge on the different fish DNA repair systems characterized *in vivo*, in primary cultures or in established cell lines. Second, we gathered up as much as possible ecotoxicological studies dealing with fish models that have integrated DNA repair measurements in their approaches, to finally make proposals of perspectives to improve the knowledge of DNA repair in fish and its possible use in ecotoxicological assessment.

2. DNA repair systems in fish and fish cell lines

2.1 Base excision repair

BER is the major mechanism for repairing DNA base lesions caused by genotoxicants such as oxidation, alkylation and single strand breaks (SSB) (Pourquier, 2006). In mammals, BER is initiated by removal of the damaged base by specific DNA glycosylases, followed by 3' or 5' cleavage of the phosphodiester backbone by an apurinic/apyrimidic AP endonuclease (APE) generating DNA single strand breaks. Strand breaks are then recognized by XRCC1 and/or PARP proteins, before further repair via two pathways resulting in the replacement of

one (short-patch pathway) or more (long-patch pathway) nucleotides. In case of SSB repair, the lesion is directly recognized by XRCC1 and PARP protein. Polymerase β (Pol β) is involved in both BER pathways, required for repair of single-nucleotide lesions and gaps and for insertion of the first nucleotide in long-patch BER. The last step of BER is the ligation by a DNA ligase.

A few BER enzymes known in mammals have been found and studied in detail in fish, such as Ogg1 (Gonzales et al., 2005; Shi et al., 2011) and DNA pol β (Oehlers et al., 2004). DNAPol β protein sequence in the fish *Xiphophorus maculatus* shows more than 80% of sequence homology with amphibians and mammals, and the structure of its gene was found to be similar to that of human (Oehlers et al., 2004). Heather et al. (2004) found no significant difference in XiphPol β mRNA and protein expression levels between three *Xiphophorus* species. All developmental stages (unfertilized egg, embryo and adult) are capable of BER in zebrafish, with two major differences, the absence of DNAPol β , and the presence of backup Mg²⁺-dependent endonuclease activity in early stage embryos contrary to adult. The switch to adult BER profile occurs fully when embryos hatch and encounter normal oxidative stress (Fortier et al., 2009).

BER capabilities among various tissues in two *Xiphophorus* species showed a similar activity pattern: brain>testis>gill=liver, with brain possessing a 2 to 3-fold higher BER activity than liver (Walter et al., 2001b). Besides, it is noteworthy that no data on BER in fish cell lines is available in literature.

2.2 Direct reversal with O⁶-alkylguanine transferase

DNA alkylation is one of the most frequent lesions following environmental genotoxicants exposure (Kuehl et al., 1994). Besides BER, another DNA repair process toward DNA alkylation at the O6 position of guanine (O⁶-alkylguanine) is the direct reversal by O⁶-alkylguanine transferases. The highly conserved protein O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (O⁶-MGMT) directly transfers methyl groups from the O6 position of guanine (O⁶MG) to one of its two cysteine residues (Olsson and Lindahl, 1980).

O⁶-MGMT activity has been observed in liver of 8 fish species with considerable interspecies variations (Nakatsuru et al., 1987). Comparative studies regarding O⁶-MGMT activity in fish (medaka) and mammals (human, hamster, mice, and rat) give conflicting results: some of them suggest that fish express O⁶-MGMT repair activity at lower levels than mammals (Hall and Montesano, 1990; Nakatsuru et al., 1987) whereas other report

comparable values for O⁶-MGMT activity in fish and other vertebrates (Woodhead et al., 1986).

Walter et al (2001a) demonstrated a strong O⁶-MG repair capability in extracts from different tissues of two Xiphophorus species. Both species repaired efficiently the O⁶-MG lesion in the same tissue-specific manner: brain \geq testis > gill \geq liver, with a level of O⁶-MGMT activity found in fish brain very similar to those reported for rodent liver. In mammals, liver contains the highest O⁶-MGMT activity compared to other tissues with brain activity being about only 9% of that observed in liver (Grafstrom et al., 1984). This reverse profile can be related to the different circulatory anatomy that exists between mammals and fish, for which blood flow from the gills enters the brain before the liver. However, a different order of tissue-specific expression of O⁶-MGMT was found in the hermaphrodite fish *Kryptolebias marmoratus* by measuring mRNA levels (liver > brain > thyroid > muscle, skin > gonad, intestine > eye), but the relationship between mRNA and activity level of O⁶-MGMT was not clearly demonstrated (Rhee et al., 2011a).

Xiphophorus O⁶-MGMT activity shares many of the *Escherichia coli* and mammalian O⁶-MGMT's characteristics, including rapid reaction kinetics, although it exhibits a lower temperature optimum and reduced sensitivity to the O⁶-MGMT inhibitor, O⁶-benzylguanine (Walter et al., 2001a). Besides, no adaptative increase in enzyme activity was observed in rainbow trout following carcinogenic treatment (Nakatsuru et al., 1987), although O⁶-MGMT activity has been found to be slightly inducible in rat and highly inducible in bacteria (Grombacher and Kaina, 1995; Laval, 1990; Laval, 1991; Pegg et al., 1985).

K. marmoratus embryos and juveniles has lower levels of O⁶-MGMT mRNA than adults (Rhee et al., 2011a), indicating more susceptibility to DNA damage by alkylating agents during these early developmental stages, which is different from data obtained for mice in which no evidence was found for a lower activity in very young animals (Nakatsuru et al., 1989). At the adult stage, Aoki et al. (1993) observed in medaka a clear age-dependent decrease in O⁶-MGMT activity. Lifespan studies realized in this species suggested that aging might play an important role in spontaneous tumor development : an age-dependent increase in liver tumor incidence was observed in fish aged from 1 to 5 years, which could in part be explained by a decline in O⁶-MGMT activity with aging (Masahito et al., 1989; Masahito et al., 1988). This would partly explain the high susceptibility of this fish species to carcinogens and stresses the interest of medaka as a sensitive fish model for genotoxicity studies.

2.3 Nucleotide excision repair (NER)

NER is the repair pathway of choice for UV-light induced photolesions, DNA cross-links, or bulky adducts generated from exposure to compounds such as aflatoxine or polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). NER consists of two distinct pathways: (1) global genomic repair (GGR), which removes lesions from non-transcribed domains of the genome and the non-transcribed strands of transcribed regions, and (2) transcription-coupled repair (TCR), which removes various lesions from the transcribed strand of active genes. Basically, both NER processes go through the same steps, but recognition of the lesion, DNA unwinding and excision of the lesion are performed by different groups of enzyme depending on the pathway (Christmann et al., 2003). Then, resynthesis occurs by polymerase and ligation by DNA ligase I.

2.3.1 Chemical adduct repair

Several chronic exposure studies realized in vivo or with primary fish cell cultures showed that various DNA-adducts tend to accumulate in liver what is consistent with a relatively inefficient NER in this tissue (Ericson and Balk, 2000; French et al., 1996; Jung et al., 2009b). No repair of DNA adduct within a 21-day-study after exposure to AFB1 was observed on zebrafish liver (Troxel et al., 1997). More recently, no NER activity was found over a 72h period in primary cultured hepatocytes from *Ictalurus punctatus* and *Ameiurus nebulosus*, two catfish species having known differential sensitivities to liver carcinomas (Willett et al., 2001), nor over a 48-h period in cultured primary trout liver cells after exposure to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene (DMBA) or benzo(a)pyrene (BaP) (Weimer et al., 2000). However, in other tissues, some evidence of NER activity was demonstrated using the unscheduled DNA synthesis technique (UDS) which is based on nucleotide incorporation in repair patches of NER (Kelly and Latimer, 2005). Significant UDS was found in several fish cell lines (central mudminnow heart and fin chum heart, fathead minnow epithelium, rainbow trout gonad) after exposure to chemicals including AFB1 (Walton et al., 1983, 1984, 1987). This repair activity was nevertheless lower than the activity found in HF and CHO cells. UDS was also demonstrated in vivo in five species: medaka (*O. latipes*), blind cave fish (*Anoptichtys jordani*), Oriental water fish (*Misgurnus anguillicaudatus*), guppy (*Poecilia reticulata*) and Siamese fighting fish (*Betta splendens*) after exposure to various chemical carcinogens (Ishikawa et al., 1984).

2.3.2 *UV damage repair*

In fish, the far most studied DNA repair process is NER consecutive to UV-induced damage. It has to be noticed that UV-induced DNA damage can also be repaired in fish by another process: photoenzymatic repair, on which we will come back later.

Main UV-induced lesions are the helix-distorting cyclobutyl-pyrimidine photodimers (CPDs) and the pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts (6-4PDs) (Ravanat et al., 2001). 6-4PDs, which distort the DNA helix more than CPDs, are predominantly removed by GGR, while CPDs are removed more efficiently by TCR. In vitro, NER consecutive to UV induced lesions (also called dark repair) has been studied in many cultured fish cells, but has been generally found negligible or very slow when compared to mammalian cells (Achey et al., 1979; Kator, 1984; Mano et al., 1982; Regan and Cook, 1967; Shima et al., 1981; Woodhead et al., 1980), the NER process several days in fish cells (Notch and Mayer, 2009a).

In vivo, Groff et al. (2010) studied UVA-B induced genotoxicity and lesion repair in two Amazonian fish: *Colossoma macroporum* (tambaqui) and *Arapaimas gigas* (pirarucu), and found difference in both sensitivity to UV and NER capacity. Other evidence of efficient NER were found in fish larvae from five freshwater species representing four families and three orders: *Lepomis macrochirus* (bluegill), *Salvelinus fontinalis* (brook trout), *Esox lucius* (northern pike), *Onchorynchus mykiss* (rainbow trout), *Perca flavescens* (yellow perch) (Olson and Mitchell, 2006). The decrease in photoproducts varied among species: the highest CPD reduction being observed in northern pike and rainbow trout, the lowest in bluegill and brook trout. Thus, the most closely related species (rainbow and brook trout) did not show similar NER capacity; rainbow trout larvae showing a particularly efficient NER activity allowing a nearly complete repair within 48h after a UVB exposure (Mitchell et al., 2009). Those results show similarity with other studies highlighting significant differences in DNA repair between closely related species and even between strains within a given species (Karentz et al., 1991; Mitchell et al., 2004). Moreover, the NER of the 6-4PDs was more efficient in vivo in *Xiphophorus variatus* than that of the CPD, with 70% of the 6-4PDs removed 24h after UVB radiation compared with 30% of the CPDs (Mitchell et al., 1993). Meador et al (2000) indicated that the initial rate of repair of 6-4PDs in vivo in *Xiphophorus* exhibited values very comparable to those reported for rodents.

2.3.3 NER may be tissue specific, depending on fish species

In medaka, high UDS was found in cerebral ganglion cells compared with liver or intestinal cells (Ishikawa et al., 1984). Significant differences exist between NER capacities in caudal fin, skin and sword of *X. signum*, repair rates being the greatest in the skin, with half-life for 6-4PDs of about 10h (the same range as in mammalian skin), the slowest in the caudal fin, and intermediate in the sword (Mitchell et al., 2001). However, some similarities have been found by other authors. As an example, no difference in UDS between fin and heart cells of central mudminnow was observed (Walton et al., 1984) and little variation in sensitivity or similar maximal UDS response was observed in two gonadal rainbow trout cell lines, after exposure to several chemicals (Walton et al., 1983). Besides the type of tissue, the type of exposure might also have some weight in the repair observed: fish receiving a pulsed high exposure did not develop elevated concentration of DNA adducts, which could be due to DNA repair processes, whereas fish being exposed over a long time to a low level UV did accumulate a significant number of DNA adducts (Holth et al., 2009).

2.3.4 NER may be developmentally regulated

It has been shown that the same organism at different developmental stages can express different sensitivity to UV (Browman et al., 2003). This could be partly explained by different NER capacities as according to some authors, NER may be developmentally regulated.

Kator (1984) demonstrated that in contrast to cells cultured from adult tissues, primary cultures prepared from medaka embryos in the late blastula stage removed significant amount of CPDs by excision repair. A high rate of excision repair in rainbow trout (Mitchell et al., 2009) and fathead minnow embryos was reported (Applegate and Ley, 1988), with 50% of the CPDs repaired in the dark within 9 h. Mitchell et Hartman (1990) supported the idea that proliferating cells from organs, tumors, and embryos have a greater DNA repair capacity than terminally differentiated, non-proliferating cells, differential expression of repair genes and accessibility of chromatin to repair enzymes being considered as determinants in the developmental regulation of DNA repair.

2.3.5 NER and preferential repair

Bacteria, primate and human cells are known to exhibit preferential repair, removing UV photoproducts faster from active genes than from the overall genome (Mellon et al., 1986; Mellon and Hanawalt, 1989). This efficient repair process in actively transcribed genes, termed transcription coupled repair (TCR), requires nearly all of the same enzymes as global

genome repair (GGR) of non-transcribed regions of DNA. Although TCR has not been directly shown in fish, it seems likely that it occurs since in goldfish cells, it was shown that excision repair of CPDs was more efficient in the ras sequence than in the genome overall (Komura et al., 1991; Komura et al., 1989). Although the overall rate of repair of photoproducts is lower in fish than in mammals, the repair phenotype observed (i.e preferential excision of CPDs in actively transcribing sequences and of 6-4PDs in genomic DNA) is similar to the one observed in mammalian cells.

2.4 Photoenzymatic repair

Photoreactivation or photoenzymatic repair (PER) is specific for both UV-induced CPDs and 6-4PDs. The enzyme responsible for photorepair is the photolyase, a monomeric protein containing two non-covalently bound chromophores. The photolyase binds to UV-DNA damage and uses UVA (320-400nm) and blue light (400-500 nm): from the excited singlet state, the chromophore initiates a reductive cleavage of the two major photodamages, CPD and 6-4PD by short distance electron transfer to the DNA lesion (Weber, 2005). PER is absent in placental mammals (Ley, 1993; Sancar, 2000) but is commonly found in microorganisms, plants and some animals including fish (Mano et al., 1982; Regan et al., 1982; Regan and Cook, 1967; Woodhead and Achey, 1979; Yasuhira et al., 1991). It is also widely used in aquatic invertebrates especially in gametes (Iverson and Giese 1954; Cook and Rieck 1962; Huebner et al. 2006; Reef et al. 2009).

The light-dependent induction of DNA repair enzyme is essential for the successful photoreactivation in zebrafish (Hirayama et al., 2009; Tamai et al., 2004). Photoreactivation increases the embryonic survival rate of fish exposed to UV radiations (Applegate and Ley, 1988; Park and Yi, 1989), increases cell survival and influences colony formation in cultured fish cells (Shima et al., 1981). Armstrong et al. (2002) showed a difference in photoreactivation capacities between different strains of medaka. Trout larvae are well equipped to remove DNA damage using PER after exposure to low doses of UV-B (i.e <41.8 kJ.m⁻²) but with increasing UV doses, PER declines in efficiency to remove CPDs (Mitchell et al., 2009).

2.4.1 NER versus Photorepair

It appears clearly that in fish, PER operates more quickly than NER and can repair damage on a scale of minutes, compared with hours or days for NER (Malloy et al., 1997; Regan et al., 1983). The hypothesis that fish uses both NER and PER to repair photodamage

extends to tropical (Setlow and Woodhead, 2001; Uchida et al., 1995), marine (Kouwenberg et al., 1999; Vetter et al., 1999) and temperate freshwater fish (Olson and Mitchell, 2006).

Some authors showed an apparent phylogenetic pattern in which organisms or tissues that display a high rate of PER have a low rate of NER, and vice versa (Mitchell et al., 1993; Regan et al., 1982; Regan and Cook, 1967; Regan et al., 1983; Woodhead et al., 1980). In *Xiphophorus* for example, skin exhibits low PER and high NER when fin shows high PER and low NER (one to two orders of magnitude slower) (Mitchell et al., 2001). Additionally, the relative contribution of PER and NER can vary with the level of DNA damage: the higher it is, the higher the proportion of damage repaired by NER, whereas the proportion of damage repaired by PER decreases. CPDs accumulation reached a steady-state in trout exposed at UVB doses above 41.8 kJ.m^{-2} suggesting that at a certain point, rates of damage induction and repair are equivalent and end with no further damage accumulation (Mitchell et al., 2009), which may emanate from the robust NER observed in this species (Olson and Mitchell, 2006). Thus, as shown in trout exposed to realistic high UV doses, a reduction of PER can be compensated by a less labile and more persistent NER. The underlying mechanism for this is not known yet, but could result from PER saturation or from damage to the repair machinery itself (Mitchell et al., 2009). Moreover, increasing UVB doses may induce hyperproliferation or melanization of the epidermal cells thus increasing the shielding of cells from UVB and photorepair radiations. A long exposure time may allow an increasing photoprotection, thus reducing both photorepair radiations and PER, whereas NER would not be affected by these factors.

Thus, light-dependent and dark-dependent repair processes are highly diverse with regard to the model studied, photoproduct affinities, kinetics rates, and the extent of damage removal. As shown in many studies, photorepair is very efficient in fish and is the probable “repair pathway of choice” for UV induced lesions, although to a lower extent, NER also can play a significant role in DNA repair.

2.5 Repair of double strand breaks

DNA double-strand breaks (DSBs) are highly potent inducers of mutations and cell death. There are two main pathways for DSB repair, homologous recombination (HR), which is error-free, and non-homologous end-joining (NHEJ), which is error-prone, the latter being the dominating pathway in mammals (Cromie et al., 2001; Haber, 2000). The first step in NHEJ is the recognition of the lesion and the binding of a heterodimeric complex to damaged DNA. Then, the recruitment of other repair proteins allows the activation of XRCC4-ligase

IV, which links the broken DNA ends together. HR starts with the nucleolytic resection of DSB in the 5'-3' direction, forming a 3' single-stranded DNA fragment to which Rad52 binds. Rad52 interacts with Rad51, causing a DNA strand exchange with the undamaged, homologous DNA molecule. After DNA synthesis, ligation and branch migration, the resulting structure is resolved.

If double strand break repair has gained a considerable attention in mammals, only a few studies have been realized up to now in fish. HR and NHEJ activity to a lesser extent, have been shown in early developmental stages of zebrafish (Hagmann et al., 1998). Homologous recombination has also been described in zebrafish embryonic stem cells (Fan et al., 2006). The kinetics of DSB repair has been studied in early embryonic cells and cells of adult medaka (Aizawa et al., 2004; Hidaka et al., 2010) after γ -irradiation: in the first study the majority of the lesions were repaired within 1h, the repair being almost complete within 2h, whereas in the second, the level of DSB reached the control level as soon as 30 min after irradiation, showing that early embryonic fish cells have high capacity of DSBs repair.

3. How to assess DNA repair in an ecotoxicological perspective

Aquatic genotoxicity studies can gain from a better knowledge of fish DNA repair in different ways. On a methodological point of view, the DNA repair specificities existing among fish species, developmental stages, tissues and in vitro models could be taken into account to optimize experimental protocols and to help in the development of normalized genotoxicity assays. It could also benefit to field monitoring studies through the choice of the most sensitive and relevant target species and/ or tissues for genotoxicity assessment in fish. Last but not least, DNA repair could constitute a promising field for the development of new genotoxicity biomarkers and could interestingly complement a panel of well-established DNA damage assessment tools (measurement of primary damage via the alkaline comet assay, chromosomal lesions via the micronucleus frequency assay, *etc...*). Up to now, DNA repair capacities per se have not been often included in a biomarker battery implemented in aquatic ecotoxicology but for a few years, increasing attention has been paid to field and laboratory studies using two main methodological approaches : (1) quantifying the expression of DNA damage genes, via the measurement of mRNA level or via a proteomic analysis and (2) assessing the overall DNA repair activities of the main repair systems (BER, NER...) by monitoring the removal of specific DNA lesions over the time using various analytical techniques.

In the first approach, DNA repair genes are often studied along with genes that play a key role in the regulation of both DNA repair and checkpoint activation. P53 is a key factor in the DNA damage checkpoint pathway, by acting as a transcription factor and regulating the transcription of genes involved in cell cycle arrest, (e.g. *p21*, *gadd45*, *cyclinG1*), DNA repair itself (e.g. *XCP*, *DDB2*, *gadd45a*, *MSH2*) and apoptosis (e.g. *bcl-2*, *bax*) (Ford, 2005; Latonen and Laiho, 2005). P53 expression has been characterized in rainbow trout (Liu et al., 2011), and in zebrafish (reviewed in Storer and Zon, 2010), in which it has been found to regulate the transcription of several of the same genes as in mammals. Rhee et al (2011b) identified 31 DNA repair related genes (NHEJ, HR, BER, MMR, and NER related genes) in the hermaphroditic fish, *K. marmoratus*.

3.1 Expression of DNA repair genes in response to genotoxics

Several studies have shown in fish that gene expression can be modulated by exposure to chemical or physical genotoxics. Exposure to UVB activates the DNA repair system in zebrafish hepatocytes (Sandrini et al., 2009b), mainly involving the participation of *p53*. Heavy metals have also been shown to modulate repair gene expression. Up-regulation of the *Rad51* gene expression was observed in zebrafish after exposure to methylmercury (Gonzalez et al., 2005), and exposure to copper induced a decrease in *p53* and *CDKI* genes expression and an increase in *gadd45a*, *CyclinG1* and *Bax* gene expression in ZFL cells (Sandrini et al., 2009a). In zebrafish, gold nanoparticles were also found to interfere with DNA repair gene expression (Geffroy et al., 2012), and uranium has been shown to both directly induce DSB and to disturb but not inhibit NHEJ pathway by altering the DNA-PK kinase activity, essential for NHEJ (Pereira et al., 2012).

Concerning organic pollutants, exposure to cypermethrin or fenvalerate down-regulated *Ogg1* expression in zebrafish embryo in a concentration-dependent manner (Gu et al., 2010; Shi et al., 2011) whereas the expression of the *p53* gene was significantly up-regulated by cypermethrin. Both *ATM* (activated in response to DSB), and *ATR* (triggered by regions of single stranded DNA), were activated after exposure to bleomycin and hydroxyurea in rainbow trout cell lines (Liu et al., 2011). Gagné et al (2012) conducted an ecotoxicogenomic study on trout hepatocytes exposed to extracts of oil sands process-contaminated water known to contain a mixture of light and heavy PAHs. Amongst the genes studied, the DNA ligase gene was specifically expressed after 48h of exposure. A low concentration of the fungicide

malachite green stimulated DNA repair (Pierrard et al., 2012) in primary cultures of peripheral blood mononuclear cells through the over-expression of two proteins implicated in various cellular processes including DNA repair and cell-cycle regulation, the transitional endoplasmic reticulum ATPase (VCP protein) and the RuvB-like 1 protein.

Moreover, several estrogenic or estrogenic-mimic compounds (17- β -estradiol, bisphenol A, tamoxifen, 4-tert-octylphenol) have been shown to suppress expression of O⁶-MGMT mRNA in many tissues, especially the liver of *K. marmoratus* (Rhee et al., 2011a).

The effect of environmentally relevant concentrations of 17 α -ethinylestradiol (EE2) on the hepatic NER gene expression was examined in adult male and female zebrafish (Notch et al., 2007). Transcript abundance of several genes including *XPC*, *XPA*, *XPD* and *XPF* significantly decreased in male, while female exhibited a four-fold decrease in XPC mRNA. Male showed greater decrease than female, which is consistent with the sexually dimorphic incidence of hepatocellular carcinoma in many species. The effect of EE2 exposure on the rate and magnitude of bulky DNA adduct repair on ZFL cells was also studied (Notch and Mayer, 2009a). After EE2 exposure, ZFL cells were only able to repair 14 to 17% of an UV-induced damage within 24h, whereas in control cells nearly 40% of the damage were repaired. Finally, exposure of ZFL cells to wastewater treatment plant effluent (often found to be a mix of estrogenic substances and various chemicals), also modulated both the level of XPC and XPA mRNA and their capacity of DNA adduct repair, what could potentiate the effect of environmental mutagens resulting in greater levels of DNA damage, higher mutation frequency and ultimately neoplasia (Notch and Mayer, 2009b).

However the modulation of gene expression seems to be tissue-specific and varies with time: the effect of prolonged exposure to Cd and methylmercury on several DNA repair gene expression was examined in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (Gonzalez et al., 2005; Gonzalez et al., 2006), and the regulation profile was very different from one tissue to another. After exposure to Cd, many genes were up-regulated at day 7 in skeletal muscle (*mt1*, *cyt*, *bax*, *gadd* and *rad51* genes), while in liver, only 2 genes displayed a differential induction after 21 days, although liver exhibited the highest cadmium concentration. In brain, only 3 genes were up-regulated after 21 days while in gills, the highest response was observed after 7 days. After an environmentally realistic dietary methylmercury exposure, the DNA repair gene *rad51* was up-regulated in liver between 21 and 63 days (up to 10 fold) but was repressed in skeletal muscles, as well as the *gadd* gene, with repression factors of 1/3 and 1/8 respectively. In brain, no modulation of any of the

genes studied was observed. The *rad51* gene expression increases in liver after a 2-month contamination suggesting an important need for DNA repair in the liver, which may be linked with the inorganic Hg content in this organ due to demethylation. Although toxicogenomics constitutes very promising tools, the complexity of the expression patterns obtained in the various studies gathered here emphasized the need for more work to be done in order to clearly establish the basal expression level in different fish tissues and to assess the time frame in which the measurement should be done. This is an absolute prerequisite to potentially use repair gene expression as a future biomarker of ecotoxicity.

3.2 Assessing DNA repair activity by monitoring DNA damage removal

DNA damage and kinetics of repair in rohu (*Labeo rohita*) liver after exposure to phorate, an organophosphate pesticide, was studied and a decrease in DNA damage was shown only after 72h of exposure (Mohanty et al., 2011). This might be due to DNA repair systems and could be explained by the threshold dependent repair theory. It suggests that the DNA repair enzymes get activated and that the rate of enzyme activity increases when a tissue accumulates toxicants above a threshold level (Ching et al., 2001), below which DNA repair operates only at a basal level (Siu et al., 2004, 2003). Banu et al. (2001) similarly showed a time-dependent decrease in DNA damage in erythrocytes of *Tilapia mossambica* exposed to various concentrations of monocrotophos: from 48 h post-treatment, there was a gradual decrease in DNA damage for all concentrations with a return to control level by 96 h. In the same way, the genotoxicity of arsenic in gill, liver and blood of the freshwater fish *Oreochromis mossambicus* was studied by Ahmed et al, (2011). Applying the comet assay, a significant increase in DNA damage was observed after 48h and 96h of exposure in a dose-dependent manner, followed by a decline in all tissues after 192h of exposure, which might refer to the DNA repairing ability of fish and/or the loss of heavily damaged cells. Jin et al, (2004) exposed carp in vivo for 7 days to MMNG and B[a]P, resulting in dose-and time dependent response in the liver cells, in which 24h-delayed responses for metabolizing activation and gradual repair after 48h were also observed.

3.3 Modulation of DNA repair activity following exposure to genotoxicant *in situ*

Espina and Weiss (1995) studied the activity level of O⁶-alkylGuanine transferase in two populations of the mummichog *Fundulus heteroclitus*, a cancer-resistant fish living in low or heavily polluted areas. The reference population had O⁶-AGT levels inversely correlated with size, which was expected since younger fish have more DNA synthesis in

their liver. O⁶-AGT levels in the polluted population did not exhibit a significant correlation with size, and showed generally less activity than the reference population, suggesting an environmental impact on the repair capacity.

Assessment of DNA adducts in feral fish populations is often used as a molecular dosimeter of exposure to environmental carcinogens (Stein et al., 1994). However differences found between populations could either indicate exposure to contrasted genotoxic contaminant levels, and/or contrasted repair capacities, since complex mixtures of pollutants can result in potentiation of toxicity via various pathways (Maier et al., 2002). Brown bullhead (*A. nebulosus*) from long term contaminated sites with PAHs had refractory CYP1A activity, as well as decreased DNA single strand breakage in comparison with fish obtained from recently PAHs contaminated sites (McFarland et al., 1999). Such a result could sign for an increased DNA repair and cell turnover rates in populations with a long exposure history. Jung et al (2009a) reared fish from two feral populations (one from a reference “clean” site and one from a polluted site) for at least four weeks in the laboratory for depuration purposes. The fish from the polluted site retained substantial levels of DNA damage well after removal from contaminant exposure; moreover the two populations showed different sensitivity to laboratory BaP exposure, the reference population being much more sensitive than the population coming from the polluted site. It would be interesting to explore how such an exposure history can affect the efficiency of DNA repair in these populations, and how this can be linked to the PAH-adducts types as well as to co-exposures with other chemicals, two factors known to affect repair efficiency (Lagerqvist et al., 2008; Maier et al., 2002). Moreover, specific cell types such as germinal cells have been shown to be sensitive to genotoxicants in aquatic invertebrates and fish, with effects on reproductive success and potential consequences at the population level (Lacaze et al., 2011a; Lewis and Galloway, 2009). It would be of particular interest to know more about the DNA repair capacities of such cells in fish (particularly spermatozoa) in order to validate the use of the DNA damage level in these cells as a relevant genotoxicity biomarker as suggested by Devaux et al. (2011).

4. Conclusion and perspectives

The early DNA repair studies in fish have led to a general belief that fish and fish cell lines globally repair DNA damage less efficiently than mammals often used as a reference. The rather exhaustive data collection made in this review reveals that this might not be the case for all DNA repair processes or developmental stages but also emphasizes the lack of

knowledge concerning some of the DNA repair mechanisms of particular interest in aquatic toxicology.

Surprisingly the BER system has been very poorly investigated in fish despite its central role in repair of base oxidative damage and of N- and O-alkylation damage, often mentioned as the direct or indirect genotoxic mode of action of a large array of environmental toxicants. Comparatively, the NER system has been quite extensively studied in fish but most of the data found in literature dealing with NER concern DNA repair after UV exposure, whereas only a few studies deal with the evaluation of NER and the removal of bulky chemical adducts. Though, from an ecotoxicological perspective, regarding the significant contamination with PAHs or other carcinogenic chemicals such as heterocyclic aromatic amines encountered in many aquatic ecosystems, the repair of bulky DNA adducts is also of first importance. Most of the studies of fish exposed to such chemicals have highlighted the persistence of bulky DNA adducts and a slower repair than in mammals. Such weak NER capacities make fish prone to accumulate highly mutagenic DNA adducts, and thus to further develop tumors. If confirmed by additional studies in order to better evaluate the most sensitive target species and tissues (i.e. with low NER activity), such a low NER activity toward bulky adducts, confirms the interest of the DNA adduct quantification as a valuable marker of exposure in environmental studies.

Nevertheless, UV lesions are also of environmental concern as they can induce very severe cellular and molecular damage in aquatic organisms particularly in early life stages and thus can have strong consequences at the population level. Although mainly studied in *Xiphophorus* as a fish model and dedicated to human cancer research, the NER mechanisms toward UV damage have been investigated in a few other fish species of higher ecological relevance. It appears from these studies that as for bulky adducts, the nucleotide excision repair of UV-lesions seems rather inefficient in adult fish when it can show a significant activity in embryo-larval stages. As it is the case for any living organism, the capacity of fish to cope with the predicted increase in UV radiation reaching the water surface in the future decades constitutes a very interesting research field in evolutionary ecology and among other parameters, UV damage repair in fish deserves to be further investigated (Bracchini et al., 2005; Häder et al., 2007).

Since several studies demonstrate that embryonic and larval stages show stronger NER capacities than adults, the choice of early development stages could be prioritized for studying NER capacities in fish. This rather efficient NER capacity in early life stages has been

proposed to be related to biological traits of fish: most of fish species spawn freely in shallow waters where UVA-B can penetrate. Limited mobility, sunscreens and high surface area to volume ratios make the gametes, embryos and larvae of aquatic organisms particularly vulnerable to UV (Dahms and Lee, 2010). Interspecies difference in UV sensitivity of adult fish could also be linked with behavioral and adaptative response of fish to UV, such as skin thickness and submersion capability (Groff et al., 2010). Thus, DNA repair capacity, which is directly linked to DNA integrity, is also worthwhile to investigate biological traits of organisms.

To counteract UV damage, it is noticeable that fish possess a rather efficient additional repair system named the photo enzymatic repair (PER) widely distributed in nature (but not in mammals). At least at environmentally relevant UV damage levels, PER seems able to compensate for the weakness of NER. When considering UV radiation as a prevalent environmental stressor, it would be of value to improve the understanding of factors that influence the balance between both repair systems, as well as interspecies and inter tissues specificities and to confirm the aptness of early developmental stages to perform PER.

Other aquatic environmental stressors that gain interest are radio elements and radiomimetic drugs (some anti-tumor agents), damaging DNA principally through double strand breaks. These strong cytotoxic agents in acute exposure conditions, can also be highly mutagenic at low doses and in chronic exposure situations. The environmental risk assessment for fish toward this class of contaminants would probably gain to better assess their ability to repair DSB since it is noteworthy that very few papers deal with HEJ, NHEJ and MMR in aquatic organisms and fish in particular. Moreover, knowing the importance of the germ cell DNA integrity in the reproductive success of aquatic organisms (Devaux et al., 2011; Lacaze et al., 2011b), it could also be interesting to study DNA repair capacity of such cells, exposed both during spermatogenesis and oogenesis in genitors and once discharged in water at reproduction sites.

Another point raised by this review is the paucity of knowledge concerning DNA repair capacities of established fish cell lines despite the fact that these biological tools arouse a growing interest in ecotoxicology studies. Besides their use with cytotoxicity endpoints as alternative methods to evaluate fish *in vivo* acute toxicity in regulatory procedures (Schirmer, 2006), fish cell lines have been proven to be useful models to screen for the genotoxic potential of contaminants or environmental matrixes and could also be used for mechanistic purposes. However, the interest in using fish cell lines in aquatic ecotoxicology studies

instead of using well established and characterized mammalian cell lines, remains to be proven through a better assessment of their cellular and functional properties such as specific metabolic and DNA repair capacities (Castaño et al., 2003). It arises from the limited amount of available data, that fish cell lines would have low/slow DNA repair processes compared with *in vivo* (Notch and Mayer, 2009a; Notch et al., 2007) or with mammalian cell lines. Of course this point merits urgently to be explored more deeply as past studies concerned exclusively the NER system and principally the UV-type damage. These results could be partly explained by intrinsic characteristics such as the low division rate and rather low growth temperature (Walter et al., 2001b) or by the fact that specific culture requirements of fish cell lines may have been insufficiently studied to allow for the full expression of their DNA repair capacities. Additionally, since *in vivo* some of the DNA repair systems appear more efficient in embryo larval stages than in adults, it would be of interest to consider embryonic cell lineages more closely regarding their DNA repair capacities and thus their use in genotoxicity studies especially when studying mechanisms. This point raises also the interest of the fish embryo test, another promising alternative technique to adult fish testing in genotoxicity assessment studies.

Although many ecotoxicogenomics studies have been done recently, it has not yet been clearly established whether gene expression is indicative of repair capacity (Khan et al., 2006; Köberle et al., 2006). However, decreased transcript levels of NER genes have been shown to be an important epidemiological marker for increased cancer risk and decreased repair capacity in humans and similar approach could be conceptualized in environmental studies in order to identify the differential susceptibility to genotoxicant of populations under contrasted anthropic pressures.

Numerous contaminants, including metals (uranium, cadmium) (Bertin and Averbek, 2006; Filipič, 2012) and some non genotoxicants such as endocrine disruptors (ethinylestradiol, nonylphenol, and TBT) (Ferraro et al., 2004; Frassinetti et al., 2011; Mekkawy et al., 2011; Micael et al., 2007; Rhee et al., 2011a) have been shown to interact with DNA structure and/or with DNA repair pathways through study of DNA repair gene expression in fish. Thus, the systematic study of the DNA repair genes should be included in toxicogenomics approaches when screening for the biological effects of pure compounds or of complex mixtures. Indeed, complex mixtures could contain chemicals acting in a synergistic way, through genotoxicity and DNA repair inhibition. Moreover, since all DNA repair processes are possible targets for ubiquitous environmental pollutants such as some

heavy metals, pesticides or endocrine disruptors, we can wonder at which extent such a modulation of repair capacities in fish could be the base for the development of new biomarkers of genotoxicity. For this, rather global approach such as the Base Excision Repair Comet assay (BERc) developed by Collins et al (2001) and its Nucleotide Excision Repair version (NERc) (Langie et al., 2006) could be adapted to fish cell lines. Also, repair activity assessment by following the removal of DNA lesions as already performed by some authors and the use of toxico genomic and/or proteomic approaches should be regarded as very promising to enrich this very challenging scientific field.

References

- Achey, P.M., Woodhead, A.D., Setlow, R.B., 1979. Photoreactivation of pyrimidine dimers in DNA from thyroid cells of the teleost, *Poecilia formosa*. Photochemistry and Photobiology 29, 305-310.
- Ahmed, F.E., Setlow, R.B., Grist, E., Setlow, N., 1993. DNA damage, photorepair, and survival in fish and human cells exposed to UV radiation. Environmental and Molecular Mutagenesis 22, 18-25.
- Ahmed, M.K., Habibullah-Al-Mamun, M., Hossain, M.A., Arif, M., Parvin, E., Akter, M.S., Khan, M.S., Islam, M.M., 2011. Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. Chemosphere 84, 143-149.
- Aizawa, K., Mitani, H., Kogure, N., Shimada, A., Hirose, Y., Sasado, T., Morinaga, C., Yasuoka, A., Yoda, H., Watanabe, T., Iwanami, N., Kunimatsu, S., Osakada, M., Suwa, H., Niwa, K., Deguchi, T., Hennrich, T., Todo, T., Shima, A., Kondoh, H., Furutani-Seiki, M., 2004. Identification of radiation-sensitive mutants in the medaka, *Oryzias latipes*. Mechanisms of Development 121, 895-902.
- Aoki, K., Nakatsuru, Y., Sakurai, J., Sato, A., Masahito, P., Ishikawa, T., 1993. Age dependence of O₆-methylguanine-DNA methyltransferase activity and its depletion after carcinogen treatment in the teleost medaka (*Oryzias latipes*). Mutation Research: DNA Repair 293, 225-231.
- Applegate, L.A., Ley, R.D., 1988. Ultraviolet radiation-induced lethality and repair of pyrimidine dimers in fish embryos. Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 198, 85-92.
- Armstrong, T.N., Reimschuessel, R., Bradley, B.P., 2002. DNA damage, histological changes and DNA repair in larval Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to ultraviolet-B radiation. Aquatic Toxicology 58, 1-14.
- Bailey, G.S., Selivonchick, D., Hendricks, J.D., 1987. Carcinogenesis in rainbow trout. Environmental Health Perspectives 71, 147-153.
- Bailey, G.S., William, D.E., Hendricks, J.D., 1996. Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. Environmental Health Perspectives 104, 5-21.
- Bailey, G.S., Williams, D.E., Wilcox, J.S., Loveland, P.M., Coulombe, R.A., Hendricks, J.D., 1988. Aflatoxin B1 carcinogenesis and its relation to DNA adduct formation and adduct persistence in sensitive and resistant salmonid fish. Carcinogenesis 9, 1919-1926.
- Banu, B.S., Danadevi, K., Rahman, M.F., Ahuja, Y.R., Kaiser, J., 2001. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. Food and Chemical Toxicology 39, 361-366.
- Bertin, G., Averbeck, D., 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie 88, 1549-1559.

- Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E.J., Schrimmer, K., 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* 6, 43-84.
- Bracchini, L., Cózar, A., Dattilo, A.M., Picchi, M.P., Arena, C., Mazzuoli, S., Loiséle, S.A., 2005. Modelling the components of the vertical attenuation of ultraviolet radiation in a wetland lake ecosystem. *Ecological Modelling* 186, 43-54.
- Browman, H.I., Vetter, R.D., Rodriguez, C.A., Cullen, J.J., Davis, R.F., Lynn, E., St Pierre, J.-F., 2003. Ultraviolet (280-400nm)-induced DNA damage in the eggs and larvae of *Calanus finmarchicus* G. (copepoda) and Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Photochemistry and Photobiology* 77, 397-404.
- Burtscher, H.J., Schneider, R., Klocker, H., Auer, B., Hirsch-Kauffmann, M., Schweiger, M., 1987. ADPrimosyltransferase is highly conserved: purification and characterization of ADPrimosyltransferase from a fish and its comparison with the human enzyme. *Journal of Comparative Physiology B* 157, 567-572.
- Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., 2003. The use of fish cells in ecotoxicology - The report and recommendations of ECVAM Workshop 47. *Alternative to Laboratory Animals* 31, 317-351.
- Ching, E.W.K., Siu, W.H.L., Lam, P.K.S., Xu, L., Zhang, Y., Richardson, B.J., Wu, R.S.S., 2001. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to Benzo[a]pyrene: dose- and time-dependent relationships. *Marine Pollution Bulletin* 42, 603-610.
- Christmann, M., Tomicic, M.T., Roos, W.P., Kaina, B., 2003. Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193, 3-34.
- Collins, A.R., Dušinská, M., Horvathova, E., Munro, E., Savio, M., Stetina, R., 2001. Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay. *Mutagenesis* 16, 297-301.
- Cook, J.S., Rieck, A.F., 1962. Studies on photoreactivation in gametes and zygotes of sand dollar, *Echinarachnius parma*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59 (1), 77-84.
- Cromie, G.A., Connelly, J.C., Leach, D.R.F., 2001. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Molecular Cell* 8, 1163-1174.
- Dahms, H.-U., Lee, J.-S., 2010. UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology* 97, 3-14.
- David, W.M., Mitchell, D.L., Walter, R.B., 2004. DNA repair in hybrid fish of the genus *Xiphophorus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 138, 301-309.
- Devaux, A., Fiat, L., Gillet, C., Bony, S., 2011. Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquatic Toxicology* 101, 405-411.
- Ericson, G., Balk, L., 2000. DNA adduct formation in northern pike (*Esox lucius*) exposed to a mixture of benzo[a]pyrene, benzo[k]fluoranthene and 7H-dibenzo[c,g]carbazole: time-course and dose-response studies. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 454, 11-20.
- Espina, N.G., Weis, P., 1995. DNA Repair in fish from polluted estuaries. *Marine Environment Research* 39, 309-312.
- Fan, L., Moon, J., Crodian, J., Collodi, P., 2006. Homologous recombination in zebrafish ES cells. *Transgenic Research* 15, 21-30.
- Ferraro, M.V.M., Fenocchio, A.S., Mantovani, M.S., Ribeiro, C.D., Cestari, M.M., 2004. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetic and Molecular Biology* 27, 103-107.

Filipič, M., 2012. Mechanisms of cadmium induced genomic instability. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 733, 69-77.

Ford, J.M., 2005. Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: Another role for p53. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 577, 195-202.

Fortier, S., Yang, X., Wang, Y., Benett, R.A., Strauss, P.R., 2009. Base excision repair in early zebrafish development: evidence for DNA polymerase switching and standby AP endonuclease activity. *Biochemistry* 48, 5396-5404.

Frassinetti, S., Barberio, C., Caltavuturo, L., Fava, F., Di Gioia, D., 2011. Genotoxicity of 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate mixtures by the use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 mutation assay and use of this text to evaluate the efficiency of biodegradation treatments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 253-258.

French, B.L., Reichert, W.L., Hom, T., Nishimoto, M., Sanborn, H.R., Stein, J.E., 1996. Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to a gradient of contaminated sediments. *Aquatic Toxicology* 36, 1-16.

Gagné, F., Douville, M., André, C., Debenest, T., Talbot, A., Sherry, J., Hewitt, L.M., Frank, R.A., McMaster, M.E., Parrott, J., Bickerton, G., 2012. Differential changes in gene expression in rainbow trout hepatocytes exposed to extracts of oil sands process-affected water and the Athabasca River. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 155, 551-559.

Geffroy, B., Ladhar, C., Cambier, S., Trequer-Delapierre, M., Brèthes, D., Bourdineaud, J.P., 2012. Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: the role of size, concentration and exposure time. *Nanotechnology* 6, 144-160.

Gonzalez, P., Dominique, Y., Massabuau, J.C., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2005. Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology* 39, 3972-3980.

Gonzalez, P., Baudrimont, M., Boudou, A., Bourdineaud, J.P., 2006. Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals* 19, 225-235.

Grafstrom, R.C., Pegg, A.E., Trump, B.F., Harris, C.C., 1984. O⁶-Alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in normal human tissues and cells. *Cancer Research* 44, 2855-2857.

Groff, A.A., da Silva, J., Nunes, E.A., Ianistcki, M., Guecheva, T.N., de Oliveira, A.M., de Oliveira, C.P.F., Val, A.L., Henriques, J.A.P., 2010. UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 99, 93-99.

Grombacher, T., Kaina, B., 1995. Constitutive expression and inducibility of O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurin-DNA glycosylase in rat-liver cells exhibiting different status of differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease* 1270, 63-72.

Gu, A., Shi, X., Yuan, C., Ji, G., Zhou, Y., Long, Y., Song, L., Wang, S., Wang, X., 2010. Exposure to fenvalerate causes brain impairment during zebrafish development. *Toxicology Letters* 197, 188-192.

Haber, J.E., 2000. Partners and pathways: repairing a double-strand break. *Trends in Genetics* 16, 259-264.

Häder, D.-P., Kumar, H.D., Smith, R.C., Worrest, R.C., 2007. Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change. *Photochemical and Photobiological Sciences* 6, 267-285.

Hagmann, M., Bruggmann, R., Xue, L., Georgiev, O., Schaffner, W., Rungger, D., 1998. Homologous recombination and DNA-end joining reactions in zygotes and early embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and *Drosophila melanogaster*. *Biological Chemistry* 379, 673-681.

Hall, J., Montesano, R., 1990. DNA alkylation damage: consequences and relevance to tumour production. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 233, 247-252.

Heater, S.J., Oehlers Jr, L.P., Rains, J.D., Walter, R.B., 2004. DNA polymerase β mRNA and protein expression in *Xiphophorus fish*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 138, 325-334.

Hidaka, M., Oda, S., Kuwahara, Y., Fukumoto, M., Mitani, H., 2010. Cell lines derived from a medaka radiation-sensitive mutant have defects in DNA double strand break responses. *Journal of Radiation Research* 51, 165-171.

Hirayama, J., Miyamura, N., Uchida, Y., Asaoka, Y., Honda, R., Sawanobori, K., Todo, T., Yamamoto, T., Sassone-Corsi, P., Nishina, H., 2009. Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish. *Cell Cycle* 8, 2794-2801.

Holth, T.F., Beylich, B.A., Sharpshédinsdottir, H., Liewenborg, B., Grung, M., Hylland, K., 2009. Genotoxicity of environmentally relevant concentrations of water-soluble oil components in cod (*Gadus morhua*). *Environmental Science and Technology* 43, 3329-3334.

Huebner, J.D., Young, D.L.W., Loadman, N.L., Lentz, V.J., Wiegand, M.D., 2006. Age-dependant survival, reproduction and photorepair activity in *Daphnia magna* (Straus, 1820) after exposure to artificial ultraviolet radiation. *Photochemistry and Photobiology* 82 (6), 1656-1661.

Ishikawa, T., Masahito, P., Takayama, S., 1984. Usefulness of the medaka, *Oryzias latipes*, as a test animal: DNA repair processes in medaka exposed to carcinogens. *National Cancer Institute Monographs* 1984, 35-43.

Iverson, R.M., Giese, A.C., 1954. Test for photoreactivation in gametes of *Urechis caupo*. *Science* 120 (3117), 504.

Jin, H.H., Lee, J.H., Hyun, C.E., 2004. Detection of DNA damage in carp using single-cell gel electrophoresis assay for genotoxicity monitoring. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 14, 268-275.

Jung, D., Cho, Y., Collins, L.B., Swenberg, J.A., di Giulio, R.T., 2009a. Effects of benzo[a]pyrene on mitochondrial and nuclear DNA damage in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated and reference site. *Aquatic Toxicology* 95, 44-51.

Jung, D., Cho, Y., Meyer, J.N., Di Giulio, R.T., 2009b. The long amplicon quantitative PCR for DNA damage assay as a sensitive method of assessing DNA damage in the environmental model, Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 149, 182-186.

Karentz, D., Cleaver, J.E., Mitchell, D.L., 1991. Cell survival characteristics and molecular responses of Antarctic phytoplankton to ultraviolet -B radiation. *Journal of Phycology* 27, 326-341.

Kator, K., 1984. Dynamic analysis of repair mechanisms of UV-induced damages in cultured fish cells. *Photomedicine and Photobiology* 6, 30-32.

Kelly, C.M., Latimer, J.J., 2005. Unscheduled DNA Synthesis - a functional assay for global genomic nucleotide excision repair. In: Keohavong, P., Stephen, G.G. (Eds.), *Molecular Toxicology Protocols- Methods in molecular biology*, vol. 291. Humana Press Inc, Totowa, pp. 303-320.

Khan, S.G., Oh, K.-S., Shahlavi, T., Ueda, T., Busch, D.B., Inui, H., Emmert, S., Imoto, K., Muniz-Medina, V., Baker, C.C., DiGiovanna, J.J., Schmidt, D., Khadavi, A., Metin, A., Gozukara, E., Slor, H., Sarasin, A., Kraemer, K.H., 2006. Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of *xeroderma pigmentosum* patients. *Carcinogenesis*, 27 (1), 84-94.

- Köberle, B., Roginskaya, V., Wood, R.D., 2006. XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. *DNA Repair* 5, 641-648.
- Komura, J.-I., Mitani, H., Nemoto, N., Ishikawa, T., Shima, A., 1991. Preferential excision repair and non-preferential photoreactivation of pyrimidine dimers in the *c-ras* sequence of cultured goldfish cells. *Mutation Research: DNA Repair* 254, 191-198.
- Komura, J.-I., Mitani, H., Shima, A., 1989. More efficient excision repair of pyrimidine dimers in the specific DNA sequence than in the genome overall in goldfish cells. *Photochemistry and Photobiology* 49, 419-422.
- Kouwenberg, J.H.M., Browman, H.I., Cullen, J.J., Davis, R.F., St-Pierre, J.F., Runge, J.A., 1999. Biological weighting of ultraviolet (280-400 nm) induced mortality in marine zooplankton and fish. I. Atlantic cod (*Gadus morhua*) eggs. *Marine Biology* 134, 269-284.
- Kuehl, D.W., Serrano, J., Naumann, S., 1994. Identification of potentially mutagenic contaminants in the aquatic environment by liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric characterization of *in vitro* DNA adducts. *Journal of Chromatography A* 684, 113-119.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O., 2011a. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution* 159, 1682-1691.
- Lacaze, E., Geffard, O., Goyet, D., Bony, S., Devaux, A., 2011b. Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. *Environmental Research* 111, 626-634.
- Lagerqvist, A., Håkansson, D., Prochazka, G., Lundin, C., Dreij, K., Jernström, B., Trönqvist, M., Seidel, A., Erixon, K., Jenssen, D., 2008. Both replication bypass fidelity and repair efficiency influence the yield of mutations per target dose in intact mammalian cells induced by benzo[a]pyrene-diol-epoxide and dibenzo[a,l]pyrene-diol-epoxide. *DNA Repair* 7, 1202-1212.
- Langie, S.A.S., Knaapen, A.M., Brauers, K.J.J., van Berlo, D., van Schooten, F.J., Godschalk, W.L., 2006. Development and validation of a modified comet assay to phenotypically assess nucleotide excision repair. *Mutagenesis* 21, 153-158.
- Latonen, L., Laiho, M., 2005. Cellular UV damage responses. Functions of tumor suppressor p53. *Biochimica et Biophysica Acta: Reviews on Cancer* 1755, 71-89.
- Laval, F., 1990. Induction of proteins involved in the repair of alkylated bases in mammalian cells by DNA-damaging agents. *Mut. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 233, 211-218.
- Laval, F., 1991. Increase of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase and N³-methyladenine glycosylase RNA transcripts in rat hepatoma cells treated with DNA-damaging agents. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 176, 1086-1092.
- Lewis, C., Galloway, T., 2009. Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. *Environmental Science and Technology* 43, 928-933.
- Ley, R.D., 1993. Photoreactivation in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 4337.
- Liu, M., Tee, C., Zeng, F., Sherry, J.P., Dixon, B., Bols, N.C., Duncker, B.P., 2011. Characterization of p53 expression in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 154, 326-332.
- Maier, A., Schuman, B.L., Chang, X., Talaska, G., Puga, A., 2002. Arsenic co-exposure potentiates benzo[a]pyrene genotoxicity. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 517, 101-111.
- Malloy, K.D., Holman, M.H., Mitchell, D.L., Detrich, H.W., 1997. Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in Antarctic zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 1259-1263.

- Mano, Y., Kator, K., Egami, N., 1982. Photoreaction and excision repair of thymine dimers in ultraviolet-irradiated cultured fish cells. *Radiation Research* 90, 501-508.
- Masahito, P., Aoki, K., Egami, N., Ishikawa, T., Sugano, H., 1989. Life-span studies on spontaneous tumor development in the medaka (*Oryzias latipes*). *Japanese Journal of Cancer Research* 80, 1058-1065.
- Masahito, P., Ishikawa, T., Sugano, H., 1988. Fish tumors and their importance in cancer research. *Cancer Science* 79, 545-555.
- McFarland, V.A., Inouye, L.S., Lutz, C.H., Jarvis, A.S., Clarke, J.U., McCant, D.D., 1999. Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 236-241.
- Meador, J.A., Walter, R.B., Mitchell, D.L., 2000. Induction, distribution and repair of UV photodamage in the Platyfish, *Xiphophorus signum*. *Photochemistry and Photobiology* 72, 260-266.
- Mekkawy, I.A., Mahmoud, U.M., Sayed, A.E.-D.H., 2011. Effects of 4-nonylphenol on blood cells of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Tissue and Cell* 43, 223-229.
- Mellon, I., Bohr, V.A., Smith, C.A., Hanawalt, P.C., 1986. Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 8878-8882.
- Mellon, I., Hanawalt, P.C., 1989. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* 342, 95-98.
- Micael, J., Reis-Henriques, M.A., Carvalho, A.P., Santos, M.M., 2007. Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin, triphenyltin) and a xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebrafish (*Danio rerio*). *Environment International* 33, 1035-1039.
- Miller, M.R., Blair, J.B., Hinton, D.E., 1989. DNA repair synthesis in isolated rainbow trout liver cells. *Carcinogenesis* 10, 995-1001.
- Mitchell, D.L., Adams-Deutsch, T., Olson, M.H., 2009. Dose dependence of DNA repair in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae exposed to UV-B radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences* 8, 75-81.
- Mitchell, D.L., Hartman, P.S., 1990. The regulation of DNA repair during development. *BioEssays* 12, 74-79.
- Mitchell, D.L., Meador, J.A., Byrom, M., Walter, R.B., 2001. Resolution of UV-induced DNA damage in *Xiphophorus* fishes. *Marines Biotechnology* 3, 61-71.
- Mitchell, D.L., Nairn, R.S., Johnston, D.A., Byrom, M., Kazianis, S., Walter, R.B., 2004. Decreased levels of (6-4) photoproduct excision repair in hybrid fish of the genus *Xiphophorus*. *Photochemistry and Photobiology* 79, 447-452.
- Mitchell, D.L., Scoggins, J.T., Morizot, D.C., 1993. DNA repair in the variable platyfish (*Xiphophorus variatus*) irradiated *in vivo* with ultraviolet B light. *Photochemistry and Photobiology* 58, 455-459.
- Mohanty, G., Mohanty, J., Nayak, A., Mohanty, S., Dutta, S., 2011. Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. *Ecotoxicology* 20, 283-292.
- Nakatsuru, Y., Aoki, K., Ishikawa, T., 1989. Age and strain dependence of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase activity in mice. *Mutation Research: DNA aging* 219, 51-56.
- Nakatsuru, Y., Nemoto, N., Nakagawa, K., Masahito, P., Ishikawa, T., 1987. O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase activity in liver from various fish species. *Carcinogenesis* 8, 1123-1127.
- Nakatsuru, Y., Qin, X., Masahito, P., Ishikawa, T., 1990. Immunological detection of *in vivo* aflatoxin B1-DNA adduct formation in rats, rainbow trout and coho salmon. *Carcinogenesis* 11, 1523-1526.

- Notch, E.G., Mayer, G.D., 2009a. 17 α -Ethinylestradiol hinders nucleotide excision repair in zebrafish liver cells. *Aquatic Toxicology* 95, 273-278.
- Notch, E.G., Mayer, G.D., 2009b. Wastewater treatment effluent alters nucleotide excision repair in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 150, 307-313.
- Notch, E.G., Miniutti, D.M., Mayer, G.D., 2007. 17 α -Ethinylestradiol decreases expression of multiple hepatic nucleotide excision repair genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* 84, 301-309.
- Oehlers Jr, L.P., Heater, S.J., Rains, J.D., Wells, M.C., David, W.M., Walter, R.B., 2004. Gene structure, purification and characterization of DNA polymerase β from *Xiphophorus maculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 138, 311-324.
- Olson, M.H., Mitchell, D.L., 2006. Interspecific variation in UV defense mechanisms among temperate freshwater fishes. *Photochemistry and Photobiology* 82, 606-610.
- Olsson, M., Lindahl, T., 1980. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O⁶-methylguanine to a protein cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry* 255, 10569-10571.
- Park, E.-H., Yi, A.-K., 1989. Photoreactivation rescue and dark repair demonstrated in UV-irradiated embryos of the self-fertilizing fish *Rivulus ocellatus marmoratus* (Teleostei; Aplocheilidae). *Mutation Research: DNA Repair* 217, 19-24.
- Pegg, A.E., Dolan, M.E., Scicchitano, D., Morimoto, K. 1985. Studies of the repair of O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine in DNA by alkyltransferase from mammalian cells and bacteria. *Environmental Health Perspective* 62, 109-114.
- Pereira, S., Camilleri, V., Floriani, M., Cavalié, I., Garnier-Laplace, J., Adam-Guillermin, C., 2012. Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. *Aquatic Toxicology* 109, 11-16.
- Pierrard, M.-A., Kestemont, P., Delaive, E., Dieu, M., Raes, M., Silvestre, F., 2012. Malachite green toxicity assessed on Asian catfish primary cultures of peripheral blood mononuclear cells by a proteomic analysis. *Aquatic Toxicology* 114-115, 142-152.
- Pourquier, P., 2006. La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie. *Bulletin du Cancer* 93, 214-244.
- Ravanat, J.-L., Douki, T., Cadet, J., 2001. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 63, 88-102.
- Reef, R., Dunn, S., Levy, O., Dove, S., Shemesh, E., Brickner, I., Leggat, W., Hoegh-Guldberg, O., 2009. Photoreactivation is the main repair pathway for UV-induced DNA damage in coral planulae. *Journal of Experimental Biology* 212 (17), 2760-2766.
- Regan, J.D., Carrier, W.L., Samet, C., Olla, B.L., 1982. Photoreactivation in two closely related marine fishes having different longevities. *Mechanisms of Ageing and Development* 18, 59-66.
- Regan, J.D., Cook, J.S., 1967. Photoreactivation in an established vertebrate cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 58, 2274-2279.
- Regan, J.D., Snyder, R.D., Francis, A.A., Olla, B.L., 1983. Excision repair of ultraviolet- and chemically-induced damage in the DNA of fibroblasts derived from two closely related species of marine fishes. *Aquatic Toxicology* 4, 181-188.
- Rhee, J.-S., Kim, R.-O., Chang, H.-H., Lee, J., Lee, Y.-M., Lee, J.-S., 2011a. Endocrine disrupting chemicals modulate expression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (O⁶-MGMT) gene in the hermaphrodite fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 153, 141-149.
- Rhee, J.S., Kim, B.M., Kim, R.O., Choi, B.S., Choi, I.Y., Lee, Y.M., Lee, J.S., 2011b. Analysis of expressed sequence tags from the liver and ovary of the euryhaline hermaphroditic fish,

Kryptolebias marmoratus. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics 6, 244-255.

Sancar, G.B., 2000. Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 451, 25-37.

Sandrini, J.Z., Bianchini, A., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F.F., 2009a. Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. Aquatic Toxicology 95, 285-291.

Sandrini, J.Z., Trindade, G.S., Nery, L.E.M., Marins, L.F., 2009b. Time-course expression of DNA repair-related genes in hepatocytes of zebrafish (*Danio rerio*) after UV-B exposure. Photochemistry and Photobiology 85, 220-226.

Schirmer, K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. Toxicology 224, 163-183.

Sekar, D., Falcioni, M.L., Barucca, G., Falcioni, G., 2011. DNA damage and repair following *in vitro* exposure to two different forms of titanium dioxide nanoparticles on trout erythrocyte. Environmental Toxicology, In press.

Setlow, R.B., Woodhead, A.D., 2001. Three unique experimental fish stories: *Poecilia* (the past), *Xiphophorus* (the present), and medaka (the future). Marine Biotechnology 3, S017-S023.

Shi, X., Gu, A., Ji, G., Li, Y., Di, J., Jin, J., Hu, F., Long, Y., Xia, Y., Lu, C., Song, L., Wang, S., Wang, X., 2011. Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. Chemosphere 85, 1010-1016.

Shima, A., Kenaga, M., Nikaido, O., Takebe, H., Egami, N., 1981. Photoreactivation of ultraviolet light-induced damage in cultured fish cells as revealed by increased colony forming ability and decreased content of pyrimidine dimers. Photochemistry and Photobiology 33, 313-316.

Siu, W.H.L., Cao, J., Jack, R.W., Wu, R.S.S., Richardson, B.J., Xu, L., Lam, P.K.S., 2004. Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). Aquatic Toxicology 66, 381-392.

Siu, W.H.L., Hung, C.L.H., Wong, H.L., Richardson, B.J., Lam, P.K.S., 2003. Exposure and time dependent DNA strand breakage in hepatopancreas of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to Aroclor 1254, and mixtures of B[a]P and Aroclor 1254. Marine Pollution Bulletin 46, 1285-1293.

Soares, J., Filipe, L., Castro, C., Reis-Henriques, M.A., Monteiro, N.M., Santos, M.M., 2012. Zebrafish (*Danio rerio*) life-cycle exposure to chronic low doses of ethinylestradiol modulates p53 gene transcription within the gonads, but not NER pathways. Ecotoxicology 21, 1513-1522.

Stein, J.E., Reichert, W.L., Varanasi, U., 1994. Molecular epizootiology: assessment of exposure to genotoxic compounds in teleosts. Environmental Health Perspectives 102, 19-23.

Storer, N.Y., Zon, L.I., 2010. Zebrafish models of p53 functions. Cold Spring Harb. Perspectives in Biology 2, a001123.

Sussman, R., 2007. DNA repair capacity of zebrafish. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 13379-13383.

Tamai, T.K., Vardhanabhuti, V., Foulkes, N.S., Whitmore, D., 2004. Early embryonic light detection improves survival. Current Biology 14, R104-R105.

Troxel, C.M., Reddy, A.P., O'Neal, P.E., Hendricks, J.D., Bailey, G.S., 1997. *In vivo* aflatoxin B1 metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*). Toxicology and Applied Pharmacology 143, 213-220.

Uchida, N., Mitani, H., Shima, A., 1995. Multiple effects of fluorescent light on repair of ultraviolet-induced DNA lesions in cultured goldfish cells. Photochemistry and Photobiology 61, 79-83.

Vetter, R.D., Kurtzman, A., Mori, T., 1999. Diel cycles of DNA damage and repair in eggs and larvae of northern anchovy, *Engraulis mordax*, exposed to solar ultraviolet radiation. *Photochemistry and Photobiology* 69, 27-33.

Walter, R.B., Sung, H.-M., Intano, G.W., Walter, C.A., 2001a. Characterization of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (O⁶-MGMT) activity in *Xiphophorus* fishes. *Mutation Research: Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 493, 11-22.

Walter, R.B., Sung, H.-M., Obermoeller, R.D., Mitchell, D.L., Intano, G.W., Walter, C.A., 2001b. Relative base excision repair in *Xiphophorus* fish tissue extracts. *Marine Biotechnology* 3, 50-60.

Walton, D.G., Acton, A.B., Stich, H.F., 1983. DNA repair synthesis in cultured mammalian and fish cells following exposure to chemical mutagens. *Mutation Research: Genetic Toxicology* 124, 153-161.

Walton, D.G., Acton, A.B., Stich, H.F., 1984. Comparison of DNA-repair synthesis, chromosome aberrations and induction of micronuclei in cultured human fibroblast, Chinese hamster ovary and central mudminnow (*Umbra limi*) cells exposed to chemical mutagens. *Mutation Research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 129, 129-136.

Walton, D.G., Acton, A.B., Stich, H.F., 1987. DNA repair synthesis in cultured fish and human cells exposed to fish S9-activated aromatic hydrocarbons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* 86, 399-404.

Weber, S., 2005. Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *Biochimica and Biophysica Acta: Bioenergetics* 1707, 1-23.

Weimer, T.L., Reddy, A.P., Harttig, U., Alexander, D., Stamm, S.C., Miller, M.R., Baird, W., Hendricks, J., Bailey, G., 2000. Influence of β -naphthoflavone on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene metabolism, DNA adduction, and tumorigenicity in rainbow trout. *Toxicological Sciences* 57, 217-228.

Willett, K.L., Lienesch, L.A., Di Giulio, R.T., 2001. No detectable DNA excision repair in UV-exposed hepatocytes from two catfish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 128, 349-358.

Woodhead, A.D., Achey, P.M., 1979. Photoreactivating enzyme in the blind cave fish, *Anoptichthys jordani*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 63, 73-76.

Woodhead, A.D., Grist, E., Carlson, C., White, T.E., Waldstein, E., Cao, E.-H., 1986. Presence of O⁶-methylguanine acceptor protein in tissues of different classes of vertebrates and invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology* 85B, 125-130.

Woodhead, A.D., Setlow, R.B., Grist, E., 1980. DNA repair and longevity in three species of cold-blooded vertebrates. *Experimental Gerontology* 15, 301-304.

Yasuhira, S., Mitani, H., Shima, A., 1991. Enhancement of photorepair of ultraviolet-damage by preillumination with fluorescent light in cultured fish cells. *Photochemistry and Photobiology* 53, 211-215.

Chapitre II - Evaluation génotoxique

1 Définition et utilisation des biomarqueurs de génotoxicité

Un biomarqueur se définit comme un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire ou physiologique, qui révèle soit l'exposition présente ou passée d'un organisme à un polluant (biomarqueur d'exposition), soit ses effets sur l'organisme (biomarqueur d'effet ou indice de stress). Le principe de l'utilisation d'un biomarqueur est donc de rechercher une signature biologique de l'exposition ou de l'impact d'un polluant sur l'organisme. Les efforts de recherche sur les biomarqueurs visent d'une part à mettre au point des indicateurs précoces et sensibles de toxicité mesurables à l'échelle de la cellule ou du tissu et, d'autre part, à les relier à des effets observés à des niveaux d'organisation biologique supérieurs (individu, population). Cependant, si l'utilité des biomarqueurs comme marqueurs d'exposition et outils d'investigation des mécanismes d'action des toxiques au niveau de l'organisme est indéniable, leur utilité comme prédicteurs d'effets à long terme sur la santé et la dynamique des populations fait débat (Mc Carthy et Shugart 1990; Allen et Moore 2004; Forbes et al. 2006). Ainsi, Forbes et al (2006) préconisent une utilisation des biomarqueurs essentiellement en laboratoire, afin de fournir des hypothèses et des explications mécanistiques des effets d'un contaminant chimique sur l'organisme, et considèrent que les biomarqueurs ne sont pas des indicateurs suffisants et exhaustifs pour l'évaluation de la qualité d'un milieu.

Au laboratoire, les biomarqueurs ont pour vocation claire de fournir des informations permettant d'évaluer la dangerosité de substances chimiques ou de matrices environnementales contaminées. Dans un contexte d'évaluation du risque environnemental, diverses applications ont été proposées à des fins pronostiques et diagnostiques. En plus d'être aujourd'hui des outils de choix pour répondre aux exigences réglementaires en matière d'évaluation du risque et de sécurité sanitaire des produits chimiques (REACH pour « Enregistrement, évaluation et Autorisation des substances Chimiques » ; règlement phytosanitaires ou directive biocides), les biomarqueurs peuvent être utilisés dans le cadre du suivi de la qualité des eaux et des milieux, ou pour déterminer en conditions contrôlées le type de toxicité d'un contaminant (neurotoxique, génotoxique, immunotoxique, reprotoxique...), aidant ainsi à l'établissement d'un lien entre exposition et effet afin de mieux caractériser les risques (Peakall 1994) (Figure 16).

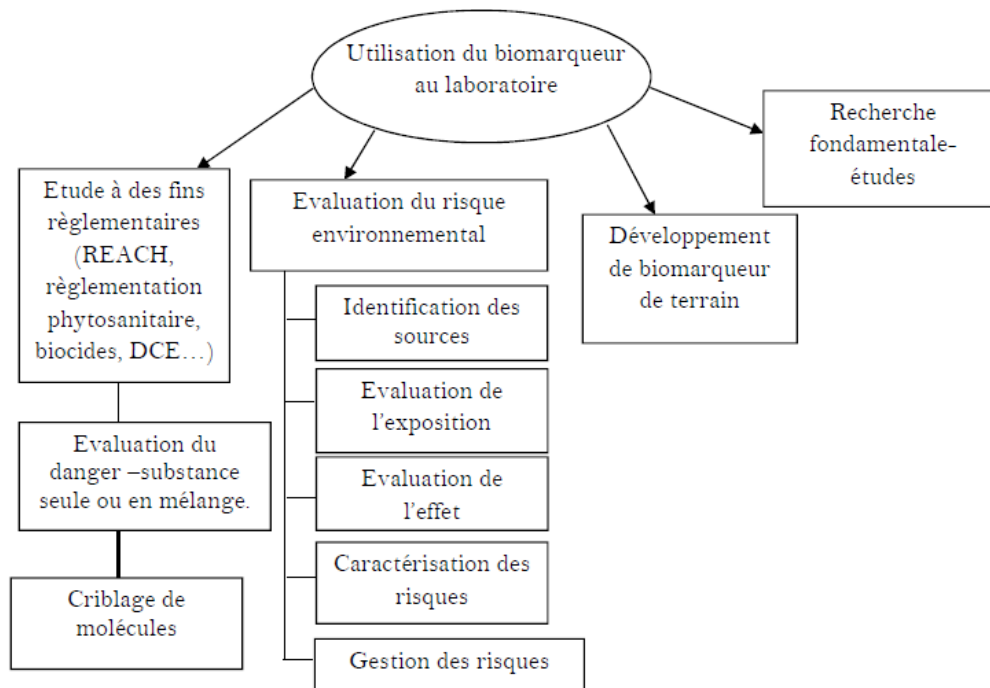


Figure 16 : Applications possibles des biomarqueurs au laboratoire
(d'après Jemec et al. 2010), modifié

Pour être opérationnel, un biomarqueur doit répondre à plusieurs critères :

➤ Il doit être **sensible**, c'est-à-dire révéler l'exposition ou ses effets, ceci à des concentrations de contaminants réalistes sur le plan environnemental, et **spécifique** d'un certain type de contaminant.

➤ Il doit être **signifiant** en termes d'effets délétères pour l'individu.

➤ Il doit être **parfaitement caractérisé**, ce qui implique la connaissance de la variabilité naturelle de la réponse et de l'influence des facteurs confondants permettant l'établissement d'un niveau de base ; ceci vaut au laboratoire mais surtout pour les biomarqueurs de terrain pour lesquels la variabilité naturelle due aux facteurs environnementaux peut être importante (température, pH, salinité...).

➤ Enfin, dans l'idéal, il doit être **prédictif**, c'est-à-dire permettre un changement d'échelle biologique et/ou spatio-temporelle. Pourtant, si la valeur prédictive du biomarqueur est un aspect essentiel, c'est aussi le plus polémique. Le pouvoir prédictif du biomarqueur tient au fait que la réponse sub-individuelle, plus précoce et sensible que la réponse individuelle ou populationnelle, pourrait avoir des conséquences à des niveaux biologiques supérieurs; mais le caractère même de ce lien entre les différents niveaux d'organisation est

ambigu. S'agit-il de liens empiriques, mécanistiques, ou de corrélations utilisant un faisceau d'évidence pour appuyer la signification du biomarqueur en termes d'effets ? Pour répondre à ces critiques, de nouvelles approches sont proposées, reposant sur l'établissement de liens mécanistiques quantifiables, permettant de vérifier les hypothèses sur lesquelles se fondent le changement d'échelle et de plus en plus sur des modèles statistiques et numériques prédictifs (Allen et Moore 2004).

Répondant à un bon nombre de ces critères, les biomarqueurs de génotoxicité et en particulier l'évaluation des dommages à l'ADN sont particulièrement adaptés à l'évaluation du risque environnemental posé par les contaminants à potentiel génotoxique rencontrés dans les écosystèmes aquatiques (Anderson et Wild 1994; Hebert et Luiker 1996; Shugart 2000). Le caractère sensible des biomarqueurs de génotoxicité tient au fait que la génotoxicité est généralement détectable à des doses d'exposition très faibles. Leur prédictivité est liée aux conséquences possibles des mutations et des effets délétères à long terme qu'elles peuvent engendrer et varie en fonction des types cellulaires considérés. Ainsi, au niveau des cellules somatiques la survenue de mutations peut induire l'initiation d'un processus de cancérogénèse et une diminution de la survie ou de la croissance au niveau de l'individu. Si la génotoxicité s'exprime au niveau des cellules germinales, elle peut induire une infertilité et des défauts de développement à toute la descendance de l'individu. De plus, les mutations au niveau de l'ADN des gamètes pourront être transmises à plusieurs générations, ne restreignant pas leurs effets à la durée de vie de l'organisme atteint initialement. Ainsi, une augmentation importante des fréquences de mutation peut avoir des conséquences sur la physiologie des organismes et sur leur fitness en terme de succès reproducteur, conditionnant à terme la dynamique des populations (Würgler et Kramers 1992).

2 Tests et biomarqueurs de génotoxicité mis en œuvre en écotoxicologie aquatique

L'évaluation de la génotoxicité des eaux de surface repose essentiellement sur deux approches : la première fait appel à des mesures de mutagénèse ou de réparation chez des modèles procaryotes, tels que le test d'Ames, le SOS Chromotest, le SOS/Umu test ou le test MutatoxTM ; la deuxième fait appel à l'utilisation de biomarqueurs sur organismes aquatiques et plantes, tels que la formation d'adduits volumineux, de bases oxydées, de micronoyaux, de dommages primaires à l'ADN, d'aberrations chromosomiques (Ohe et al. 2004), ou la recherche de mutations sur gènes cibles.

Les principes des tests mis en œuvre pour mesurer ces biomarqueurs sont détaillés ci-dessous en fonction du type de lésion mise en évidence (lésion primaire, lésion chromosomique). Le Tableau 3 présente leurs principaux avantages et inconvénients, ainsi que leur niveau d'utilisation dans l'évaluation de la génotoxicité des eaux de surface et quelques exemples d'application. Ces données sont issues de l'analyse de 128 publications scientifiques parues depuis 1990 (Ohe et al. 2004). L'essai des comètes fait l'objet d'un paragraphe spécifique puisque cette technique est centrale dans le travail expérimental réalisé au cours de cette thèse.

➤ Test de mutagénèse bactérienne

Test bioluminescent : (i.e Test MutatoxTM ou autre application commerciale). Ce test utilise un mutant lum⁻ de *Vibrio fischeri*, une bactérie marine luminescente. Il s'agit d'un test de mutation reverse, la luminescence étant restaurée suite à des mutations après culture dans un milieu contenant les agents à tester.

Test d'Ames : il est basé comme le test précédent sur la mise en évidence de mutations reverses de plusieurs souches de *Salmonella thyphimurium* his⁻ (Ames et al. 1975; Maron et Ames 1983). Après culture en présence du contaminant ou de la matrice contaminée, les mutations reverses se traduisent par le développement de colonies his⁺ sur un milieu dépourvu d'histidine. L'incorporation d'un système d'activation métabolique hépatique (fraction S9) augmente la sensibilité du test vis-à-vis des molécules nécessitant une métabolisation pour exprimer pleinement leur potentiel génotoxique, et permet son utilisation vis-à-vis d'un plus large spectre de génotoxines. Cet essai normalisé (OCDE 471) a été utilisé à de nombreuses reprises pour révéler le potentiel génotoxique d'eaux de surface et d'effluents (Černá et al. 1996; Lindström-Seppä et al. 1997; Siddiqui et Ahmad 2003; Ohe et

al. 2004; Li et al. 2012). Différentes souches de *Salmonella typhimurium* peuvent être utilisées pour ce test, permettant de distinguer différents types de dommages à l'ADN : ainsi la souche TA98 est plus sensible aux mutations qui affectent le cadre de lecture, alors que la souche TA100 est une souche plus sensible aux mutations de substitutions. Du fait de sa plus grande sensibilité et de sa capacité à distinguer plusieurs types de mutations, il est plus performant que le test bioluminescent.

SOS chromotest (*E.coli*) : ce test sur procaryote utilise l'une des premières réponses d'une cellule suite à une altération de son ADN par des génotoxiques : l'activation du système de réparation SOS (Quillardet et al. 1982). Un gène rapporteur codant pour une enzyme, la β -Galactosidase, est inséré dans un gène opérateur du système SOS. Quand ce système est activé, on observe avec l'induction du gène *SfiA* une production de l'enzyme β -Galactosidase, mesurable par une simple réaction colorimétrique. Il suffit donc de mesurer l'activité de l'enzyme pour déterminer le niveau d'induction du mécanisme de réparation SOS. Ce test est fréquemment utilisé pour la surveillance en routine de la qualité des eaux, de par la rapidité d'obtention des résultats et le peu de préparation nécessaire (Reifferscheid et Heil 1996; Hamer et al. 2000; Ohe et al. 2004).

➤ **Test de mutations chromosomiques :**

Dès 1982, les aberrations mitotiques ont été utilisées pour la biosurveillance environnementale (Kocan et al. 1979). Aujourd'hui, un ensemble de tests cytogénétiques sont utilisés pour la détection du potentiel génotoxique en milieu aquatique.

Aberrations chromosomiques : par l'analyse de la métaphase, on recherche après exposition des cellules au génotoxique étudié et blocage des mitoses, les anomalies de nombre et de structure des chromosomes (aberration de métaphase) (Natarajan et Obe 1982). On peut également visualiser la ségrégation des chromosomes précédant la télophase, car la cassure des chromosomes, le dysfonctionnement du fuseau achromatique et l'adhérence des chromosomes font partie des facteurs pouvant conduire à la production de fragments, de ponts et de figures multipolaires observables à l'anaphase (aberration d'anaphase). Quelques études en milieu marin montrent une augmentation des aberrations chromosomiques chez des organismes provenant de sites contaminés, et suggèrent l'utilisation de ce type de lésion comme un outil adapté à la détection d'une pollution génotoxique *in situ* (Hose 1994).

Echange de chromatides sœurs : suite à l'incorporation d'un analogue de la thymidine (bromodéoxyuridine, BrdU) dans l'ADN cellulaire, une coloration spéciale permet la

visualisation des échanges de matériel génétique entre deux chromatides sœurs d'un chromosome donné (Latt et Allen 1977). Cet essai est utilisé pour évaluer la génotoxicité des eaux de surface (Parveen et Shadab 2012; Penders et al. 2012). Cet essai est toutefois peu sensible, et l'observation de ce type de lésion étant techniquement fastidieuse, ceci limite son utilisation en biomonitoring environnemental (Dixon et Wilson 2000; Ohe et al. 2004).

Test des micronoyaux : le test des micronoyaux a été mis au point dans les années 70 et reste une méthode de choix en évaluation génotoxique (Heddle 1973; Schmid 1975). Les micronoyaux sont générés par la perte de matériel génétique au cours de la division cellulaire, lors de la transition métaphase/anaphase. Ils sont formés des fragments chromosomiques et/ou des chromosomes entiers non intégrés dans les noyaux fils au cours de la mitose. Ces deux types de contenu correspondent à des mécanismes de formation différents : les fragments chromosomiques acentromériques (micronoyaux acentromériques) sont issus de cassures double brin de l'ADN et ne peuvent pas se rattacher au fuseau mitotique, du fait de l'absence de centromères. Ils traduisent alors un évènement clastogène. Les chromosomes entiers (micronoyaux centromériques) proviennent essentiellement d'altérations et de dysfonctionnement des fuseaux mitotiques impliquées dans la ségrégation et la migration des chromosomes et on parle alors d'évènement aneugène. Les micronoyaux, par conséquent, offrent un indice d'évaluation des cassures et des pertes de chromosomes pratique et fiable et le test est applicable aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*.

In vitro, l'utilisation d'une version du test avec blocage de la cytotélière par utilisation de la cytochalasine B permet d'améliorer sensiblement la fiabilité des résultats. En effet, la recherche des micronoyaux uniquement dans les cellules binucléées permet de s'affranchir des faux négatifs consécutifs à une possible inhibition de la division cellulaire (Fenech et Morley 1985). Le test peut aussi être complété par l'immunomarquage des protéines du kinétochore ou l'hybridation *in situ* de sondes centromériques et télomériques fluorescentes (Degrassi et Tanzarella 1988; Farooqi et al. 1993) qui permettent de différencier les micronoyaux provenant d'évènements clastogènes ou aneugènes (Decordier et Kirsch-Volders 2006).

Il faut souligner que le micronoyau est un dommage post-mitotique non réparable. Il signe à ce titre un dommage génotoxique grave et confère à ce test un intérêt marqué pour l'évaluation de la génotoxicité en milieu aquatique (Al Sabti et Metcalf 1995; Gravato et Santos 2003b; Kim et Hyun 2006; Çavas et Könen 2008). Le test des micronoyaux présente cependant quelques limites : il manque parfois de sensibilité vis-à-vis de certains types de

pollutions organiques ou métalliques (Tuvikene et al. 1999 ; Sanchez-Galan et al. 2001) ; son application n'est possible que sur des populations cellulaires en division, et la proportion de micronoyaux observés dépend de la proportion de cellules qui se divisent réellement, du cycle cellulaire, de la réplication de l'ADN (espèce-spécifique), et par conséquent des espèces utilisées (Belpaeme et al. 1996; Russo et al. 2004). C'est de plus un événement rare qui nécessite une recherche sur un grand nombre de cellules qui peut s'avérer très fastidieuse même si des outils comme la cytométrie en flux ou l'analyse d'images automatisée permettent aujourd'hui de pallier ce problème (Marabini et al. 2011).

➤ **Révélation des dommages primaires à l'ADN.**

Élution alcaline et déroulement alcalin (alkaline unwinding) : dans ce test, après extraction et dénaturation de l'ADN en conditions alcalines, l'ADN est soit élué sur une colonne d'hydroxyapatite pour séparer les formes simple et double brins (élution alcaline), soit les deux formes d'ADN sont quantifiées par mesure de fluorescence après séparation dans des conditions précises de pH et de température (déroulement alcalin) (Shugart 1988). Ces tests ont fait l'objet de nombreuses applications pour la détection des cassures à l'ADN en milieu aquatique contaminé (Everaarts 1995; Bolognesi et al. 1996; Mitchelmore et Chipman 1998; Gravato et Santos 2003b).

Détection des adduits volumineux: la méthode du post-marquage au phosphore³², basée sur le marquage du phosphate des désoxyribonucléosides 3'-monophosphate des adduits (Gupta et al. 1982) après digestion de l'ADN, puis séparation et quantification des adduits marqués, est sans doute la méthode qui a été la plus utilisée en écotoxicologie génétique (Stein et al. 1994; Shugart 2000). Ces adduits sont utilisés en particulier comme biomarqueur d'exposition aux polluants de type HAPs. Cette technique de marquage au phosphore³² nécessite toutefois un laboratoire équipée pour l'utilisation de molécules radiomarquées ; dans le cas contraire, le dosage HPLC est également une méthode de détection des adduits très sensible et relativement simple à mettre en œuvre (Marie et al. 2008).

Synthèse non programmée d'ADN (UDS pour « Unscheduled DNA Synthesis ») : c'est une des rares méthodes qui met indirectement en évidence les dommages à l'ADN par la mesure de leur réparation. Les cellules étudiées sont maintenues en phase non proliférative en présence d'un nucléoside marqué (³H thymidine). L'incorporation des nucléosides marqués dans l'ADN atteste de la présence de lésions par la mesure de leur réparation. Un agent est considéré génotoxique si on observe une augmentation significative de l'incorporation, s'il

existe une relation dose-effet et si le résultat est reproductible. Ce test a en outre été très utilisé dans les années 80, pour l'étude des capacités de réparation de l'ADN chez les poissons (Walton et al. 1983; Ishikawa et al. 1984; Walton et al. 1987).

Essai des Comètes : Ce test, permettant également la mise en évidence de dommage primaire à l'ADN, sera abordé de façon plus détaillée dans le chapitre suivant, du fait de son importance dans ce travail.

Synthèse Bibliographique - Ch. II : Evaluation génotoxique

Type de lésions	Test	Principe
Génotoxicité		
<i>Mesure des cassures simple et double brins, sites alcali labiles</i>	Essai des Comètes (10%)	Test rapide, sensible (comète sensible à partir d'environ 100 cassures d'ADN/cellule), simple et reproductible, utilisable sur toutes cellules eucaryotes nucléées, à un faible coût; versions modifiées pour qualifier certains types de dommages
	Elution alcaline (7%)	Nécessite beaucoup d'ADN ; peu sensible et risque d'artefact lié à l'extraction de l'ADN
<i>Adduits</i>	Post-marquage au ³²P (13%)	Nécessite peu d'ADN mais utilisation d'un radioisotope de haute énergie (P ³²)
<i>Mise en évidence d'activités de réparation</i>	Synthèse non programmée de l'ADN – UDS	Technique fastidieuse, sensibilité limitée, et qui requiert l'utilisation de la radioactivité (Tice et al. 2000), mais peu coûteuse
Mutagenicité		
Mutation génique (Autres tests bactériens 6%)	Test d'Ames (37%)	Test standardisé, rapide, peu cher, sensible et qui met en évidence des mutations bien définies. Mais il est réalisé sur des procaryotes et la capacité de réparation de l'ADN est différente des eucaryotes.
	Test Mutatox	Bonne sensibilité, rapidité, simple d'utilisation et d'interprétation, test standardisé. Le test ne requiert pas de conditions aseptiques strictes, et dure 16 à 24 h au maximum, ce qui le rend intéressant pour le screening d'échantillons environnementaux. Modèle procaryote.
	Test SOS chromotest (6%)	Test rapide, peu cher et sensible mais c'est un test sur procaryote.
Mutations chromosomiques		
Clastogénie Mutations chromosomiques qualitatives	Dommages chromosomiques (3%) : Aberrations chromosomiques, Echange de chromatides sœurs	L'observation de ce type de lésions est techniquement fastidieuse (particulièrement chez le poisson qui présente souvent un nombre élevé de chromosomes et de la polyploïdie), ce qui limite leurs utilisations en biomonitoring environnemental.
	Test des micronoyaux (±FISH) (17%)	Le test des micronoyaux <i>in vivo</i> est coûteux et long à réaliser ; test <i>in vitro</i> très attractif du fait de sa simplicité de comptage et de son applicabilité à de très nombreux types cellulaires. Test standardisé ; reconnu par l'ECVAM comme alternative au test des aberrations chromosomiques, avec l'avantage de détecter les défauts de ségrégation des chromosomes induits par les aneugènes, et de détecter simultanément retard mitotique, apoptose, cassures ou pertes de chromosomes. Ce test peut également être automatisé.
Aneugénie Mutations chromosomiques quantitatives		

Tableau 3 : Principaux tests utilisés pour évaluer la mutagenicité et la génotoxicité des eaux de surface, avantages et inconvénients.

(%) : pourcentage d'utilisation pour évaluer la mutagenicité et la génotoxicité des eaux de surface, calculé sur 128 publications scientifiques parues depuis 1990 (d'après Ohe et al. 2004)

3 L'essai des comètes

Les lésions primaires directes sur l'ADN suite à l'action de radiations ou de génotoxiques chimiques sont essentiellement des changements au niveau des bases et des cassures de la chaîne nucléotidique. Par ailleurs, les deux principaux mécanismes de réparation (BER et NER) comprennent une étape d'ouverture transitoire des brins d'ADN. Par conséquent, la mesure de la fragmentation de l'ADN permet d'identifier un grand nombre d'agents génotoxiques, et peut être appliquée à l'étude de certains mécanismes de réparation. Outre la méthode d'élution alcaline déjà citée, la fragmentation de l'ADN peut être réalisée de manière simple et très sensible par la méthode de l'essai des comètes (Singh et al. 1988). Cet outil d'évaluation des dommages primaires à l'ADN s'est très rapidement généralisé pour évaluer la génotoxicité des polluants au laboratoire et sur le terrain, dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique (Devaux et al. 1997; Devaux et al. 1998; Mitchelmore et Chipman 1998; Ohe et al. 2004; Jha 2008; Devaux et Bony 2013, In press).

3.1 Principe et intérêts de l'essai

Cette méthode est basée sur la mesure de la migration différentielle des brins d'ADN selon leur taille dans un champ électrique. Dans cet essai, des cellules isolées en suspension sont incluses dans un gel d'agarose, puis lysées par des sels et des détergents en conditions alcalines pour permettre l'élimination du matériel extranucléaire (Figure 17A). L'ADN des nucléoïdes libres est ensuite soumis à un déroulement puis à une électrophorèse soit en condition neutre (Olive et Banath 1993) permettant de mesurer majoritairement les cassures double brins; soit en diverses conditions alcalines (Tice et al. 2000), permettant en sus la lecture des cassures simple brins ($\text{pH} > 12$) et des sites alcali-labiles ($\text{pH} > 12.6$). Après neutralisation, l'ADN est mis en évidence par coloration avec des agents intercalants chromophores tels que le bromure d'éthidium (BET), le Sybr Green, ou le 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Un ADN intègre apparaîtra comme une sphère fluorescente, mais en cas de cassures, une migration différentielle des fragments d'ADN selon leur nombre et leur taille se traduira par une image de type comète avec une « tête » contenant l'ADN non fragmenté et une « queue » contenant l'ADN fragmenté. La quantification du niveau de cassures peut se faire visuellement en classant les comètes selon 5 stades comme le montre la Figure 18 (Collins et al. 1995; Garcia et al. 2004), ou plus fréquemment de manière automatisée grâce à des logiciels d'analyse d'images.

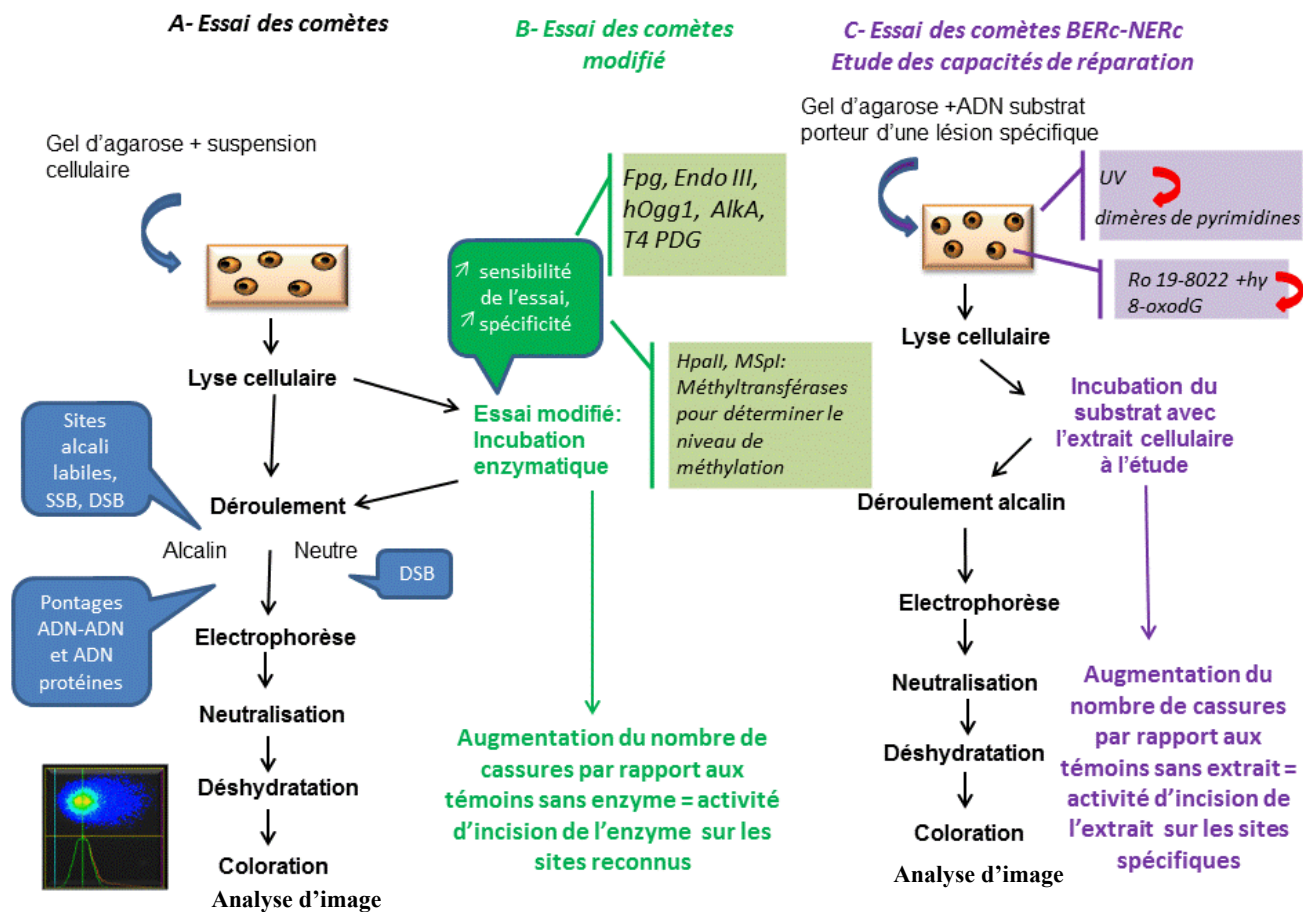


Figure 17 : Principe de l'essai des comètes en conditions alcalines et de ses variantes.

A : Essai des comètes en conditions alcalines standard. B : essai des comètes modifié, avec ajout d'une étape de digestion enzymatique par une ADN glycosylase ou une méthyl transférase. C : Essai des comètes BERc-NERc : les enzymes d'excision contenues dans l'extrait cellulaire agissent sur un ADN substrat porteur d'une lésion spécifique du système de réparation étudié.

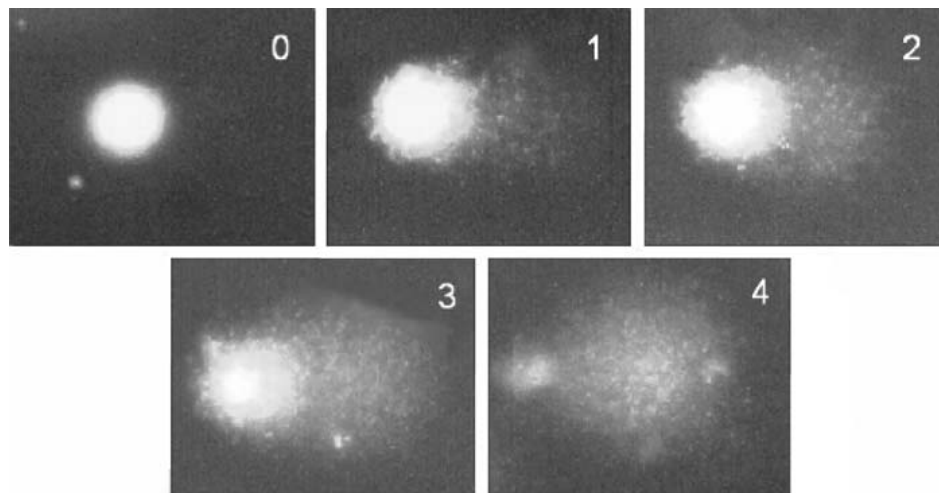


Figure 18 : Classification des comètes en 5 stades selon l'intensité de la migration utilisée en quantification manuelle du niveau de dommages à l'ADN
(d'après Collins et al. 1995)

Ces derniers proposent de nombreuses métriques, sachant que les trois principalement rencontrées dans la littérature sont : la longueur de la queue de la comète, la proportion de fluorescence dans la queue, et le tail moment, produit des deux premiers. Ce dernier paramètre, introduit par Olive et al. (1990), n'a toutefois pas abouti à un consensus quant à son calcul et son utilisation peut être problématique lorsqu'il s'agit de comparer des données inter-laboratoires (Burlinson et al. 2007; Kumaravel et al. 2009). L'intensité de fluorescence dans la queue ou « tail intensity » en anglais exprimée en pourcentage est un paramètre directement lié au niveau de dommages dont le pouvoir discriminant élevé fait aujourd'hui l'unanimité au sein de la communauté scientifique (Collins 2004). L'analyse de 50 noyaux au minimum par échantillon et de deux lames par essai est recommandée (Tice et al. 2000). Les comètes doivent être choisies de manière aléatoire sur l'ensemble du gel (en évitant cependant les bords) en excluant les noyaux très endommagés (HDC : highly damaged cells), présentant un aspect pycnotique (tête d'épingle et pulvérisation complète de l'ADN dans la queue).

Nécessitant peu de cellules (quelques centaines suffisent) l'essai des comètes permet d'étudier les dommages à l'ADN de cellules en culture ou de cellules provenant de prélèvements réalisés sur organisme entier. Ses avantages majeurs sont sa facilité d'application à tous les tissus d'intérêt à cellules nucléées, à partir du moment où l'obtention d'une suspension cellulaire de bonne qualité est possible (Brendler-Schwaab et al. 2005), et la détection de différents types de dommages à l'ADN. En effet, les cassures à l'ADN peuvent provenir de l'effet direct d'agents génotoxiques, de sites apuriques ou apyrimidiques convertis

en cassures en conditions alcalines (sites alcali labiles), et du processus d'excision-réparation qui peut transitoirement augmenter la migration de l'ADN, avec une contribution aux effets observés variable en fonction du type de dommages primaires induits et du moment de l'analyse après exposition (Brendler-Schwaab et al. 2005). L'essai des comètes permet également de détecter des liaisons croisées (ou pontages) ADN-ADN et ADN-protéines. Dans ce cas, ces liaisons auront tendance à stabiliser l'ADN et à inhiber la migration. Par conséquent, une réduction de la migration de l'ADN peut indiquer l'induction de liaisons croisées (Pfuhrer et Wolf 1996; Merk et Speit 1999). L'essai des comètes est une méthode sensible qui permet de détecter de faibles niveaux de dommage à l'ADN (une centaine de cassures/génome). Peu coûteux et relativement rapide, il possède un avantage par rapport à d'autres tests d'évaluation des cassures à l'ADN : le dommage à l'ADN est évalué au niveau de chaque cellule individuelle, ce qui permet d'écarter de l'analyse les cellules nécrotiques ou apoptotiques et ainsi de s'affranchir d'un éventuel effet positif dû à un mécanisme indirect lié à la cytotoxicité. Il faut toutefois souligner que les lésions primaires à l'ADN mises en évidence par le test des comètes peuvent être réparées par la machinerie cellulaire sans engendrer des altérations génétiques permanentes, par opposition au test des micronoyaux par exemple.

Ce test trouve des applications dans de nombreux secteurs : évaluation de la génotoxicité des produits chimiques, surveillance de la contamination environnementale, biomonitoring humain et épidémiologie moléculaire, ou encore pour des études mécanistiques (Collins 2004). Bien que largement utilisé, et considéré acceptable comme second test à des fins réglementaires en évaluation du risque mutagène, il n'existe pas à l'heure actuelle de ligne directrice officielle (COM 2000; FDA 2006) pour ce test même s'il est mentionné dans le TGD (Technical Guidance Document) de la Commission Européenne comme une alternative pertinente au test *in vivo* des micronoyaux et de l'UDS, dans certains cas (TGD 2003). Le 'United Kingdom Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment' (COM 2000) souligne également l'intérêt de l'essai des comètes pour l'évaluation des génotoxiques agissant directement à leur site initial de contact. Bien qu'il n'y ait pas encore de ligne directrice pour l'essai des comètes, un groupe de travail s'est constitué pour formaliser des recommandations générales afin de donner une plus grande rigueur réglementaire à l'application de ce test *in vivo* très utilisé (Tice et al. 2000; Hartmann et al. 2003; Burlinson et al. 2007) et il a été soumis à un processus de validation internationale

permettant de prouver sa fiabilité et sa reproductibilité intra et inter-laboratoires (Forchhammer et al. 2009).

3.2 Versions modifiées de l'essai des comètes

Un autre intérêt de ce test réside dans les modifications possibles de la version de base qui permettent d'autres applications que de signer un dommage primaire. Pour exemple, l'essai des comètes combiné à un marquage à la bromodéoxyuridine (BrdU) de l'ADN en réplication, puis à sa visualisation avec des anticorps anti-BrdU, permet d'évaluer l'intégrité de l'ADN répliqué au niveau cellulaire, et d'y détecter d'éventuelles discontinuités de brins nouvellement répliqués (McGlynn et al. 1999; McGlynn et al. 2003). La technique d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH), utilisant des sondes de cDNA ou des oligonucléotides marqués par un fluorochrome, permet de mesurer l'endommagement de séquences d'intérêt (Collins 2004; Gleib et al. 2009). Enfin, l'ajout d'inhibiteurs de synthèse de l'ADN tels que l'hydroxyurée ou la cytosine arabinoside, bloquant la resynthèse de l'ADN lors des processis BER et NER, permet d'accumuler les lésions dues à ces processis et a été utilisé pour augmenter la sensibilité de l'essai (Gedik et al. 1992; Martin et al. 1999; Speit et al. 2003; Speit et al. 2004b).

Par ailleurs, pour rendre l'essai des comètes plus spécifique, une digestion de l'ADN des nucléoïdes avec des endonucléases spécifiques de certains types de dommage en préalable à l'étape d'électrophorèse crée des cassures additionnelles (Figure 17B). Combiner l'essai des comètes avec de telles enzymes permet ainsi la détection de lésions qui ne sont ni des cassures franches, ni des sites alcali-labiles, ce qui permet d'augmenter à la fois la sensibilité de l'essai (détection d'un plus large spectre de dommages) et sa spécificité (Collins et al. 1995; Collins et al. 1996; Sauvaigo et al. 1998; Collins et al. 2001a; Decome et al. 2005). Les endonucléases les plus fréquemment utilisées lors de l'essai des comètes modifié, ainsi que les lésions reconnues sont détaillées dans le Tableau 4.

Enzyme	Caractéristiques	Type de lésions reconnues
Fpg , ou MutM (Fapy-DNA glycosylase) (<i>E. coli</i>)	Contient un motif cystéine-zinc à 4 doigts essentiel à sa liaison à l'ADN et à l'activité enzymatique. Glycosylase trifonctionnelle	Spécifique des lésions dérivées des purines Purines oxydées : 8-oxoGua, FaPyGua, FaPyAde, 8-OH-Ade (faible activité) - Pyrimidines oxydées : 5-OH-Cyt, 5-OH-Ura Dérivés puriques à cycle imidazole ouvert Sites AP -Alkylation : Me-FapyGua
Endonucléase III ou Nth (<i>E. coli</i>)	Contient un noyau 4Fe-4S Glycosylase bifonctionnelle	Spécifique des lésions dérivées des pyrimidines -Pyrimidines oxydées : ThyGly, 5-OH-Cyt, Alloxan, 5-OH-Hyd 5,6-diHThy, 5-OH-6-HThy, 5-OH-5-MeHyd, 5-OH-6-HThy, 5,6-diOH-Cyt Dérivé de l'uracile: UraGly, 5-OH-Ura, 5,6-diHUra, 5-OH-6-HUra, 6-OH-5-HUra, acide isodialurique, 6-OH-5-HCyt, } <i>proviennent de la déamination des produits de la cytosine</i> - Purines oxydées: FapyAde - Alkylation N7 et O6-guanine (faible activité)
Protéine Nei ou endonucléase VIII (<i>E. coli</i>)	Glycosylase bifonctionnelle.	Spécifique des lésions dérivées des pyrimidines, redondante avec Nth : partage quelques spécificités de substrat mais ne présente pas la même cinétique d'excision -Pyrimidines oxydées : ThyGly, 5-OH-6-HThy, 5-OH-6-HUra, 5-OH-5-MeHyd, 5,6-diOH-Cyt, 5,6-diHThy UraGly, 5-OH-Ura, acide isodialurique, 5,6-diHUra -Purines oxydées : FapyAde
AlkA (3-méthyladenine DNA glycosylase II)	Pas d'activité AP lyase	Alkylations : 3-méthylpurines, 7-méthylpurines, 3 et 7-éthylpurine, éthénoadénine, O ² -méthylpyrimidine Adduits cycliques à l'ADN, -N2,3-ethano et N2,3-éthanoguanine, hypoxanthine. Rares lésions oxydatives dont 5-formyluracil
OGG1 (8-oxoGua DNA-glycosylase) : yOgg1 (<i>S.cerevisiae</i>) hOgg1 (homme) dOgg1 (<i>Drosophila melanogaster</i>)	Homologue fonctionnel de Fpg d' <i>E. coli</i> , mais homologue structurel d'EndoIII. Possède une activité AP-lyase 33 et 37% d'identité avec yOgg1 et hOgg1	Bases oxydées : -Requiert un ADN double brin pour exciser la 8-OxoGua; excise 8-OHGua en paire avec cytosine ou thymine, pas d'activité si en paire avec adénine ou guanine -FappyGua -8-OH-Ade, si en paire avec une cytosine Catalyse également la coupure d'un brin d'ADN en 3' d'un site AP
T4 endonucléase V	Glycosylase et AP lyase	Dimères de pyrimidine cyclobutane

Tableau 4 : Principales ADN glycosylases utilisées en essai des comètes modifié.

Glycosylase bifonctionnelle : Possède une activité AP-lyase sur l'extrémité 3' des sites AP.
Glycosylase trifonctionnelle : Possède une activité AP-lyase sur les sites AP aux extrémités 3' et 5'.

3.2.1 Cas particulier de l'essai des comètes Fpg-modifié

Au sein du groupe des endonucléases utilisées en combinaison avec l'essai des comètes, la Fpg tient une place prépondérante (Epe et al. 1993; Tchou et al. 1994; Collins 2004; Collins 2009). C'est l'enzyme recommandée par l'European Standards Committee on Oxidative DNA Damage (ESCODD) pour détecter les dommages oxydatifs à l'ADN. Pourtant, sa spécificité est relativement large : elle agit sur les dérivés des purines à cycle ouvert, ou formamidopyrimidines, tels que la 2,6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine (FaPyGua) et la 4,6-diamino-5-formamidopyrimidine (FaPyAde), et sur les sites AP (apurique/apyrimidique) formés lors du processus BER, de même qu'elle reconnaît certains types d'alkylations (Speit et al. 2004a). D'ailleurs, une comparaison de trois glycosylases Fpg, EndoIII et hOGG1 a montré hOGG1 comme étant la plus spécifique du dommage oxydatif des bases (Smith et al. 2006). En fait, il semble que son large spectre de reconnaissance prédispose la Fpg à être utilisée dans l'essai des comètes modifié pour améliorer la sensibilité de détection d'un panel varié de lésions qui sont rencontrées chez les organismes soumis à des multicontaminations.

3.2.2 Essai des comètes et mesure du niveau de méthylation des cytosines

L'utilisation d'une étape de digestion de l'ADN par des enzymes de restriction ayant une spécificité vis-à-vis des zones à îlots CpG peut théoriquement être mise à profit pour évaluer indirectement le niveau de méthylation en C5 des cytosines du génome qui est une des trois principales marques épigénétiques de l'ADN (cf. § I.1.3.2.2). Deux tandems d'enzymes, HpaII (pour *Haemophilus parainfluenzae*, dont il est issu) et MspI (pour *Moraxella species*), d'une part, (Wentzel 2010) et HpaII et HhaI (pour *Haemophilus haemolyticus*) d'autre part (Wasson et al. 2006) ont déjà été utilisés avec succès.

Les enzymes MspI et HpaII sont des isoschizomères : elles reconnaissent le même site non méthylé ; le niveau de méthylation du génome est donc inversement proportionnel aux niveaux de fragmentation de l'ADN détecté lors de l'essai. En cas de méthylation des cytosines sur ce site, leur activité est modulée (Figure 19) : quand la cytosine interne de la séquence tétranucléotidique 5'-CCGG-3' est méthylée, HpaII est inactive mais l'activité de MspI n'est pas affectée ; quand c'est la cytosine externe, MspI est inactive, et l'activité de HpaII diminuée (Figure 19).

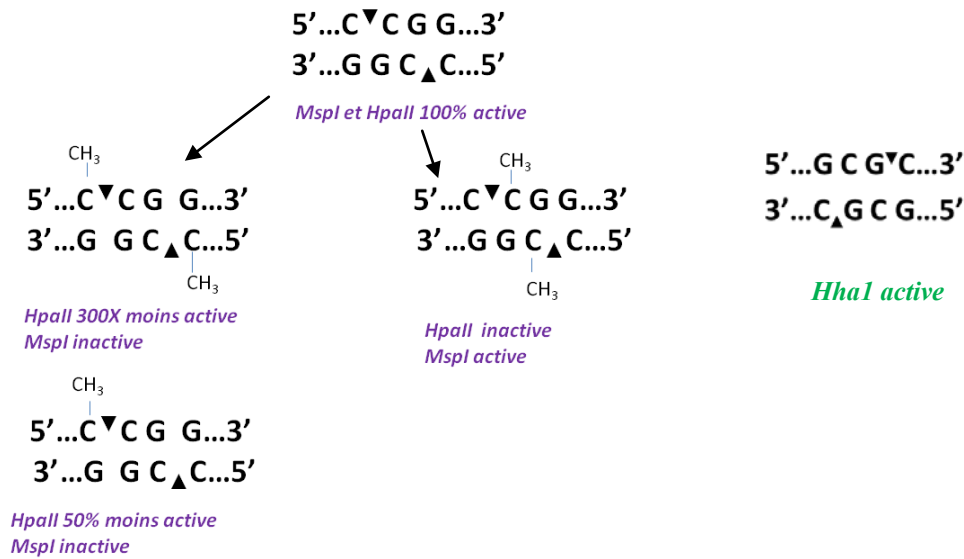


Figure 19 : Sites de reconnaissance et activité d'incision des enzymes HpaII, MspI (gauche) et HhaI (droite)

Avec ces deux enzymes, Wentzel et al. (2010) ont montré qu'il était possible *via* l'essai des comètes modifié d'évaluer le niveau de méthylation globale de l'ADN de cellules HepG2 et de mettre en évidence une modulation de ce niveau de méthylation globale suite à une exposition à deux agents déméthylants modèles (Figure 17B).

L'enzyme HhaI quant à elle reconnaît la séquence nucléotidique 5'-GCCGC-3' non méthylée. Son utilisation conjointe avec HpaII permet donc de reconnaître et de cliver à la fois les deux séquences 5'-CCGG-3' et 5'-GCCGC-3' non méthylées. Des méthylations de ces séquences aboutissent respectivement à une diminution de l'activité de HpaII ou HhaI, donc à une diminution des cassures à l'ADN mises en évidence par l'essai des comètes modifié. En utilisant ces deux enzymes HhaI et HpaII, Wasson et al. (2006) ont mis en évidence une hypométhylation réversible induite par une privation en folate chez la lignée CaCo2.

3.2.3 Essai des comètes et mesure des activités de réparation de l'ADN

Les deux principaux systèmes de réparation de l'ADN (BER et NER) comportent une phase de coupure de l'ADN. L'évaluation de cette activité d'incision dans des cellules d'intérêt peut s'effectuer au moyen de l'essai des comètes. Le principe est alors d'appliquer une étape de digestion enzymatique par un extrait cellulaire (préparé à partir des cellules étudiées) sur un ADN porteur de lésions spécifiques des systèmes BER (8-oxoGua) ou NER (adduits BPDE-DNA, ou dimères de pyrimidines) inclus dans le gel d'agarose. Ici, les enzymes des processus BER ou NER présents dans l'extrait cellulaire vont reconnaître et exciser les lésions de l'ADN substrat, générant des cassures simple brin ensuite révélées par

l'essai des comètes en conditions alcalines. Les étapes de resynthèse pouvant conduire à la réparation totale des lésions n'étant pas opérationnelles dans les conditions du test (absence de dNTP), le niveau de fragmentation de l'ADN substrat est uniquement lié aux activités de reconnaissance et d'incision des dommages (glycosylase et AP lyase) soit les premières étapes des processus de réparation, connues comme étant les plus limitantes (Figure 17C). Cette version modifiée de l'essai des comètes a été proposée à l'origine pour la mesure de l'activité d'incision d'extraits cellulaires de lymphocytes humains et nommée le « Base Excision Repair comet assay » (BERc) (Collins et al. 2001b). Une autre version modifiée, le « Nucleotid Excision Repair comet assay » (NERc) a été développée quelques années plus tard pour évaluer la capacité d'un extrait cellulaire de lymphocytes humains à mener à bien les premières étapes du processus NER (Langie et al. 2006). Les variations interindividuelles de ces capacités de réparation étaient alors proposées comme biomarqueur épidémiologique de prédisposition au cancer chez l'homme.

De telles versions de l'essai pourraient sans doute trouver des applications en écotoxicologie aquatique comme biomarqueur d'activité de réparation, à condition que l'essai soit transposable sur des types cellulaires d'espèces aquatiques connus ou préalablement caractérisés pour leurs activités de réparation BER et/ou NER.

3.3 Place de l'essai des comètes en évaluation écotoxicologique et dans une approche multibiomarqueurs

La démarche d'évaluation des risques en écotoxicologie (EDREcotox) porte essentiellement sur la caractérisation de l'écotoxicité intrinsèque des sources de pollution (effluents, déchets, sédiments contaminés...), et se base sur trois grandes étapes : 1) la formulation du problème, 2) la caractérisation des expositions et la caractérisation des effets écologiques 3) la caractérisation du risque lui-même. Cette démarche n'impose actuellement aucun test de génotoxicité. De même, dans le cadre de l'évaluation des produits chimiques, la génotoxicité étant abordée dans le volet « Toxicologie » de l'évaluation du risque, elle ne l'est pas dans le volet « Ecotoxicologie ». Pourtant, la pertinence des biomarqueurs de génotoxicité et leur signification écotoxicologique est maintenant avérée, plusieurs études ayant fait le lien entre génotoxicité et altération de la « fitness » des organismes (cf. § II.1). Il y a donc un réel intérêt à intégrer plus largement cet aspect de la toxicité des polluants environnementaux dans les démarches d'évaluation du risque environnemental.

Même si l'essai des comètes reste le test le plus employé pour détecter les lésions primaires à l'ADN en éco-génotoxicologie (Ohe et al. 2004; Jha 2008; Frenzilli et al. 2009; Devaux et Bony 2013. In press.), la question de la signification biologique et écologique des dommages primaires est souvent posée car ces derniers sont potentiellement réparables et ne portent donc pas forcément à conséquence sur le long terme. A l'opposé, le test des micronoyaux par exemple témoigne d'une perte de matériel génétique fixée et transmise aux cellules filles. C'est pourquoi ces deux tests complémentaires sont fréquemment utilisés en tandem (Russo et al. 2004; Pellacani et al. 2006; Ali et al. 2009; Bony et al. 2010; Ahmed et al. 2011), afin de mettre simultanément en évidence d'éventuels dommages primaires à l'ADN et des mutations chromosomiques. De ces études, il ressort d'ailleurs une forte corrélation entre les effets génotoxiques détectés par l'essai des comètes et ceux détectés par le test des micronoyaux (Kim et Hyun 2006; Ali et al. 2009; Rocha et al. 2009; Boettcher et al. 2010; Ahmed et al. 2011). Souvent une sensibilité supérieure de l'essai des comètes a pu être démontrée (Mouchet et al. 2005; Kim et Hyun 2006), ce qui confirme son intérêt en écotoxicologie.

Au-delà des paramètres classiquement admis de génotoxicité que sont les dommages primaires et les mutations, d'autres cibles cellulaires que l'ADN lui-même peuvent être atteintes, comme décrit plus tôt, à savoir les activités de réparation des dommages à l'ADN et/ou des mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression des gènes. Ces cibles pertinentes en matière d'évaluation du risque génotoxique pourraient faire l'objet de développement de biomarqueurs. L'essai des comètes de par sa versatilité méthodologique représente un outil commun, qui permettrait de mettre en œuvre sur le même prélèvement des évaluations du niveau de dommage primaire à l'ADN, des capacités de réparation par excision de base ou de nucléotides et du niveau de méthylation de l'ADN génomique, élargissant ainsi la palette de biomarqueurs de génotoxicité. Palette qui pourrait à terme trouver sa place dans une combinaison bien plus large de biomarqueurs incluant génotoxicité, mais également cytotoxicité, métabolisme des xénobiotiques, perturbation endocrinienne, embryotoxicité et tératogénicité (Flammarion et al. 2002; Keiter et al. 2006; Sanchez et al. 2007).

L'intérêt des approches multi biomarqueurs en évaluation du risque écotoxicologique est démontré dans les contextes de pluricontaminations qui engendrent des situations complexes où des phénomènes d'additivité, de synergie ou d'antagonisme peuvent être observés. De plus il n'est pas rare d'identifier pour un seul et même contaminant, plusieurs

niveaux d'effets. A titre d'illustration il nous semble intéressant de rappeler ici le cas du cadmium dont la génotoxicité a fait l'objet de nombreuses études mécanistiques et pour lequel plusieurs niveaux d'effets ont clairement été démontrés, cas synthétisé récemment par Filipič et al (2012) (Figure 20).

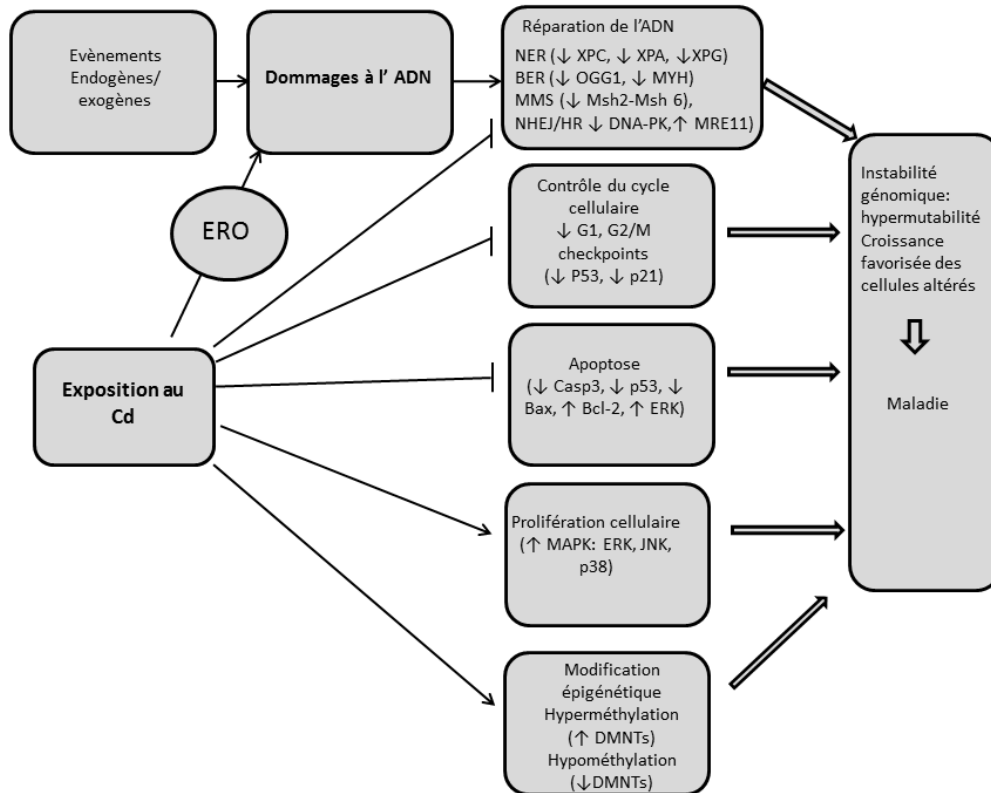


Figure 20 : Mécanismes proposés des différentes formes de génotoxicité exercées par le cadmium (d'après Filipič 2012)

Par ailleurs, soulignons que mis à part le test de synthèse non programmé de l'ADN, aucun des outils d'évaluation de la génotoxicité décrit précédemment ne s'intéresse aux capacités de réparation de l'ADN de l'organisme exposé. Sachant que l'analyse de l'expression génotoxique, et plus globalement des conséquences d'une pression chimique ou physique sur le génome, doit prendre en compte les modifications structurales mais aussi fonctionnelles du génome telles que les capacités de réparation des organismes, ou encore la part imputable aux effets épigénétiques, il nous a semblé nécessaire dans notre travail de nous orienter vers des essais permettant d'évaluer cette génotoxicité de manière plus complète, ce que l'essai des comètes et ses différentes variantes pourraient permettre de faire.

Chapitre III - Intérêt et utilisation des lignées cellulaires de poisson en écotoxicologie

1 Modèles *in vitro*, une alternative aux essais d'écotoxicité *in vivo*

Il n'est plus à démontrer que l'augmentation croissante des contaminations d'origine anthropique dans les milieux aquatiques nécessite le développement de concepts et de méthodes pour évaluer les effets des pollutions environnementales sur les organismes aquatiques. A ce titre les poissons représentent parmi les vertébrés une super classe d'espèces importante au plan écologique, car occupant notamment le haut de la chaîne trophique ; et si leur utilisation en écotoxicologie a toujours été significative, les études *in vivo* ont été jusqu'à présent largement privilégiées. En effet, les modèles cellulaires *in vitro* ont été relativement négligés jusqu'à présent en écotoxicologie comparativement à ce qui a été mis en œuvre depuis des dizaines d'années en toxicologie humaine. Il apparaît cependant que la demande d'études sur poissons en écotoxicologie va grandissante et s'applique à tous les champs de la discipline : études mécanistiques, évaluation de l'écotoxicité au titre de la réglementation, surveillance et biomonitoring environnemental, etc... Les nombreuses contraintes éthiques, scientifiques et économiques résultant de cette demande exigent aujourd'hui le développement de nouvelles méthodes en écotoxicologie basées sur des systèmes *in vitro* avec deux grands axes concernant les poissons : les tests embryo-larvaires et ceux sur lignées cellulaires pisciaires (primaires ou permanentes).

Les **stades embryo-larvaires** de poisson représentent un organisme entier, pluri-organes, intégrant une partie des événements dynamiques en interaction avec le milieu tels que l'absorption ou la métabolisation. Des différences notoires existent avec les stades adultes au plan de la sensibilité vis-à-vis des contaminants chimiques, mais généralement la plus grande sensibilité des stades précoces est considérée comme un point positif (Lange et al. 1995). Ainsi le test de létalité sur embryon de poisson est proposé comme une alternative au test *in vivo* de toxicité aiguë en Allemagne (Braunbeck et al. 2005; Lammer et al. 2009). Il existe également depuis de nombreuses années une ligne directrice OCDE (Fish early life stage OCDE 210) proposée comme alternative aux tests chroniques sur poisson dans le cadre des évaluations de toxicité réglementaire (Volz et al. 2011). De fait, ces méthodes alternatives sont de plus en plus utilisées en écotoxicologie, y compris en matière d'évaluation de la génotoxicité *via* l'essai des comètes (Kosmehl et al. 2008; Morin et al. 2011; Vicquelin et al. 2011). Cependant, ce type d'approches sur stades embryo-larvaires ne s'affranchit pas de la nécessité de disposer d'un élevage de géniteurs à proximité.

Les approches sur modèles cellulaires de poisson sont plus anciennes et plus répandues que cette dernière. Les cellules peuvent être utilisées sous forme de cultures primaires ou sous forme de lignées permanentes.

Les cellules en culture primaire sont intéressantes car généralement très représentatives du tissu d'origine en terme de caractéristiques fonctionnelles. De ce fait, elles sont particulièrement bien adaptées à l'étude du mode d'action des toxiques. Les cellules en culture primaire présentent toutefois quelques inconvénients tels qu'une durée de vie courte, de l'ordre de quelques divisions, une hétérogénéité parfois importante et sont souvent utilisées alors qu'elles n'ont pas récupéré du stress de l'isolement (Bols et al. 2005). Par ailleurs, une forte variabilité peut être observée dans leurs réponses, provenant de la variabilité entre individus donneurs, similaire à la variabilité interindividuelle existant *in vivo*, mais également du fait de la qualité de la préparation de la culture, étape délicate difficilement contrôlable. Enfin, comme pour les tests sur les stades embryo-larvaires, l'utilisation de cellules en culture primaire nécessite la proximité d'un élevage d'individus donneurs.

Les lignées cellulaires permanentes de poisson font l'objet d'un intérêt accru depuis une vingtaine d'années au sein de la communauté des écotoxicologues aquatiques en particulier du fait de leur praticité et de leur faible coût d'utilisation. Des revues très documentées ont été produites sur le sujet (Castaño et al. 2003; Bols et al. 2005; Schirmer 2006; Fent 2007; Lakra et al. 2011). Elles offrent de nombreux avantages car elles conservent, au moins pour partie, d'importantes spécificités du modèle poisson, telles que leur nature ectotherme et des capacités de biotransformation et de réparation de l'ADN, bien que ces dernières aient été très peu étudiées jusqu'à présent (Bols et al. 2005; Schirmer 2006). La rapidité des tests *in vitro* sur lignées cellulaires et la bonne corrélation entre les données de cytotoxicité obtenues *in vitro* et sur organismes entiers *in vivo* sont autant d'avantages. Cependant, une moindre sensibilité par rapport aux organismes entiers, d'environ 1 à 2 ordres de grandeur (Castaño et al. 2003; Segner 2004), et la perte potentielle de certaines fonctions, en ce qui concerne notamment le métabolisme des xénobiotiques (Wortelboer et al. 1991; Pfaller et al. 2001; Coecke et al. 2006), constituent les principales limites à l'utilisation des lignées cellulaires, ce point n'étant évidemment pas spécifique aux lignées issues de poissons. Il est donc indispensable d'avoir une connaissance approfondie des caractéristiques des lignées cellulaires pisciaires (physiologie cellulaire, croissance, compétences métaboliques...) afin d'orienter le choix de celle(s) à utiliser pour une problématique donnée et de pouvoir interpréter correctement les résultats obtenus.

Plus de 280 lignées cellulaires continues de poisson ont été établies à ce jour (Lakra et al. 2011) mais seulement une trentaine d'entre elles sont déposées à l'ATCC (American Type Culture Collection). La plupart sont d'origine fibroblastique ou épithéliale, proviennent de cyprinidés ou de salmonidés et sont très majoritairement non cancéreuses. Les principales lignées utilisées en écotoxicologie sont présentées dans le Tableau 5. Elles ont pour origine une très grande variété de tissus et pour certaines espèces telle que la truite arc en ciel, plus de 10 tissus différents sont aujourd'hui disponibles sous formes de lignées continues non transformées.

Ces lignées cellulaires sont adhérentes pour la plupart et poussent en monocouche, en conservant le caractère ectotherme des poissons. Elles sont donc cultivées à des températures moyennes comprises entre 15 et 30°C, en fonction du préférendum thermique de l'espèce dont elles sont issues. Ceci permet de réaliser des tests dans des conditions de températures représentatives de nos écosystèmes, celles-ci influant sur la biodisponibilité et le comportement physico-chimique des polluants. Elles sont pour la plupart peu exigeantes et assez simples à cultiver, poussent sur des milieux de culture de base supplémentés en sérum de veau fœtal (5 à 10%).

Certaines ont pu être adaptées et sont capables de pousser 24 à 48 h (RTG-2 et PLHC-1) dans un milieu sans sérum ou de se maintenir dans un milieu minimal ne renfermant que des sels minéraux, du galactose et du pyruvate (milieu L-15 ex) (Schirmer et al. 1997; Ackermann et Fent 1998). Ces conditions de culture simplifiées permettent de s'affranchir des nombreuses interactions possibles entre le sérum du milieu et les contaminants testés, qui peuvent moduler leur biodisponibilité et donc leur activité. La présence de sérum dans le milieu de culture reste cependant indispensable lorsqu'il s'agit de mesurer l'effet des contaminants sur certaines activités enzymatiques telles que l'induction des enzymes à cytochromes P450 (Fent 2001).

Page suivante :

Tableau 5 : Principales lignées cellulaires utilisées en écotoxicologie aquatique
(d'après Bols et al., 2005, Lee et al., 2009)

Désignation	Espèces	Tissu d'origine	Type cellulaire /Morphologie	Collection
BG/G	<i>Lepomis macrochirus</i>	Branchie	Fibroblaste	Non déposée
FG-9307	<i>Paralichthys olivaceus</i>	Branchie	?	Non déposée
G1B	<i>Clarias batrachus</i>	Branchie	Pléomorphique	ATCC CRL 2536
Rtgill-W1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Branchie	Epithélium	ATCC CRL-2523
PLHC-1	<i>Poeciliopsis lucida</i>	Carcinome hépatocellulaire de foie	Hépatocyte	ATCC CRL-2406
G14D	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cellules sanguines	T-Lymphocytes	ATCC CRL-2760
IG8	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cellules sanguines	Lymphoblaste	ATCC CRL-2756
28S.3	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cellules sanguines	T-Lymphoblastes	ATCC CRL-2758
3B11	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cellules sanguines	Lymphoblaste	ATCC CRL-2759
42TA	<i>Ictalurus punctatus</i>	Cellules sanguines	Macrophage	ATCC CRL-2758
CHH-1	<i>Oncorhynchus keta</i>	Cœur	Fibroblaste	ATCC CRL-1680
GFS	<i>Carassius auratus</i>	Ecaille	Fibroblaste	Non déposée
CHSE-214	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Embryon	Mélange	ATCC CRL-1681
CHSE-sp	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	Embryon	Suspension	Non déposée
STE-137	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Embryon	Epithélium	ECACC 95122020
WBE	<i>Morone chrysops</i>	Embryon	Epithélium	ATCC CRL-2297
ZEM2S	<i>Brachydanio rerio</i>	Embryon	Fibroblaste	ATCC CRL-2147
ZF4	<i>Brachydanio rerio</i>	Embryon	Fibroblaste	ATCC CRL-2050
EPC	<i>Cyprinus carpio</i>	Epithelioma papulosum	Epithélium	ECACC- 93120820
R1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Foie	Fibroblaste	DSMZ ACC 56
RTL-W1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Foie	Epithélium	Non déposée
SOB15	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Foie	Epithélium	ATCC CRL-2301
ZFL	<i>Brachydanio rerio</i>	Foie	Epithélium	ATCC CRL-2643
Fugu fry	<i>Fugu niphobles</i>	Fretin	Fibroblaste	ATCC CRL-2642
RTP-2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Glande pituitaire (femelle)	Epithélium	Non déposée
RTP-91E	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Glande pituitaire (mâle)	Epithélium	Non déposée
RTP-91F	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Glande pituitaire (mâle)	Fibroblaste	Non déposée
RTG-P1	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Gonades	Fibroblaste	ATCC CRL-2829
RTG-2	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Gonades	Fibroblaste	ATCC CCL-55
RTH-149	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Hépatome	Epithélium	ATCC CRL-1710
PLH	<i>Clupea harengus pallasii</i>	Larve	Epithélium	ATCC CRL-2750
BG/F	<i>Lepomis macrochirus</i>	Nageoire	Epithélium	Non déposée
CAR	<i>Carassius auratus</i>	Nageoire	Fibroblaste	ATCC CCL- 27721
GFS	<i>Haemulon sciurus</i>	Nageoire	Fibroblaste	ATCC CCL-58
AB-9	<i>Brachydanio rerio</i>	Nageoire caudale	Fibroblaste	ATCC CRL-2298
SJD.1	<i>Brachydanio rerio</i>	Nageoire caudale	Fibroblaste	ATCC CRL-2773
CCO	<i>Ictalurus punctatus</i>	Ovaire	Fibroblaste	ATCC CCL-72
Fugu eye	<i>Fugu rubripes</i>	Œil	Epithélium	ATCC CRL-2641
ASK	<i>Salmo salar</i>	Rein	Epithélium	ATCC CRL-2747
BB	<i>Ictalurus nebulosus</i>	Tissu conjonctif et muscles	Fibroblaste	ATCC CCL-59
FHM	<i>Pimephales promelas</i>	Tissu conjonctif et muscles	Epithélium	ATCC CCL-42
BF-2	<i>Lepomis macrochirus</i>	Tronc caudal	Fibroblaste	ATCC CCL-91

2 Les lignées cellulaires en évaluation de la toxicité aigüe (cytotoxicité)

L'utilisation des lignées cellulaires de poisson se situe à l'interface de la toxicologie environnementale, de l'écotoxicologie et de la biologie cellulaire et moléculaire. En écotoxicologie, elles peuvent servir de support aux études de criblage de molécules, à l'étude de leurs mécanismes de toxicité, au développement de biomarqueurs, ou encore à l'étude de la toxicité de matrices environnementales complexes ou des interactions entre facteurs physiques et chimiques (Figure 21). Ainsi, l'utilité des lignées cellulaires de poisson est pleinement reconnue notamment pour une évaluation initiale rapide du danger intrinsèque lié aux contaminants, et comme outil de classification des produits chimiques et des échantillons environnementaux en fonction de leur toxicité relative (Fent 2001).

Les lignées cellulaires de poisson ont principalement été utilisées pour évaluer la toxicité aigüe de molécules chimiques telles que pesticides, HAP, métaux ou produits pharmaceutiques (Schirmer et al. 1998; Babín et Tarazona 2005; Dayeh et al. 2005; Schnell et al. 2009a) et de matrices environnementales (eau et sédiments) (Schirmer et al. 2001; Schirmer et al. 2004; Keiter et al. 2006). Ces dernières sont principalement testées sous forme d'extraits organiques concentrés, mais peuvent parfois également être évaluées directement en observant des temps d'exposition de quelques heures (Dayeh et al. 2002). C'est le critère de la cytotoxicité qui est alors le plus utilisé et l'établissement de courbes dose réponse permet après modélisation le calcul de valeurs utilisables en évaluation du risque (CE_{50} ou CI_{50} , pour concentration efficace ou inhibitrice pour 50% d'effet).

Les techniques d'évaluation de la cytotoxicité d'une molécule sont variées et incluent la mesure d'activité métabolique (Alamar Blue®, Cell Titer Blue®, sel de tétrazolium MTT-XTT), de l'activité lysosomale (coloration au rouge neutre), l'évaluation de l'intégrité membranaire (5"-carboxyfluoresceïn diacétate ou CFDA-AM), et le détachement cellulaire (mesuré par le FRAME KB protein assay).

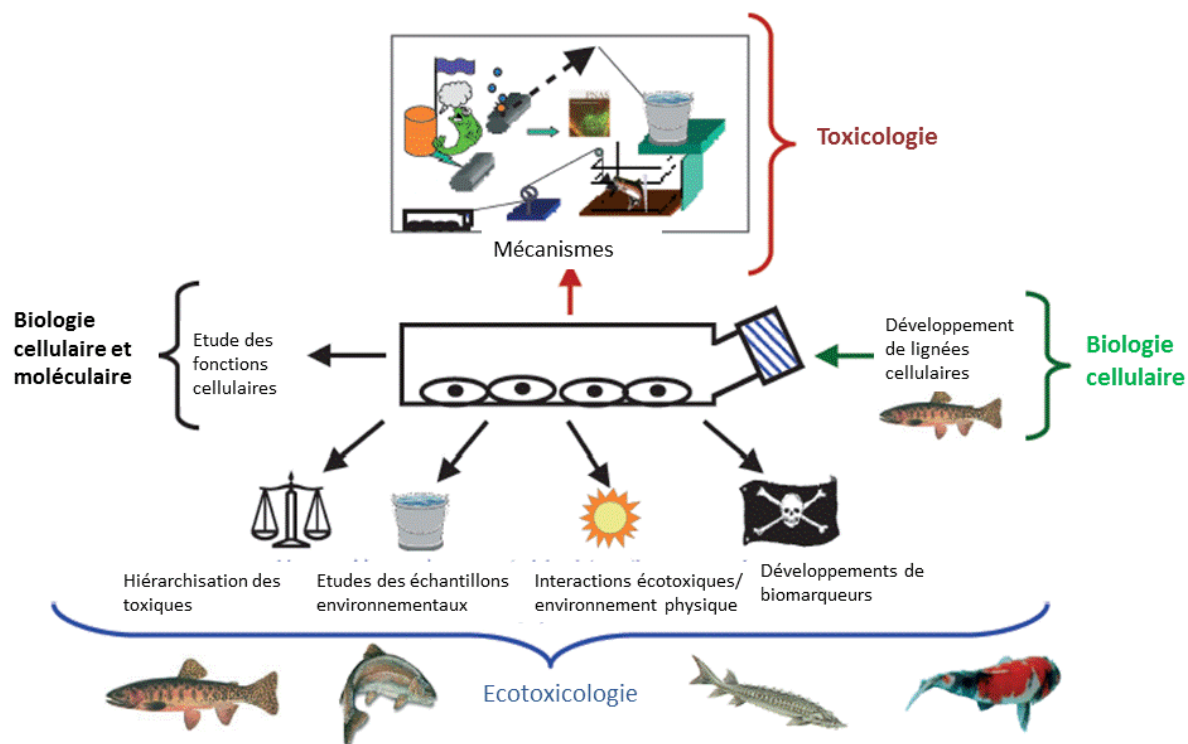


Figure 21 : Divers domaines d'application des lignées cellulaires de poisson
(d'après Bols et al. 2005)

Les tests de cytotoxicité sur lignées cellulaires ont par ailleurs été présentés par certains auteurs comme une alternative potentielle au test de toxicité aigüe pour le poisson (Babich et Borenfreund 1991; Castaño et al. 1996; Kilemade et Quinn 2003; Segner 2004). Ce test (Ligne directrice OCDE 203) est l'un des plus utilisés en évaluation réglementaire de l'écotoxicité des produits chimiques, et l'utilisation de tests *in vitro* alternatifs tels que les test de cytotoxicité sur lignées cellulaires de poisson ou le test sur embryon de poisson (FET) permettrait de limiter le recours à des tests *in vivo* économiquement et éthiquement discutables. Cependant, si globalement il ressort une bonne corrélation des données de toxicité obtenues *in vitro* et *in vivo*, les résultats sont variables d'une étude à l'autre, selon le type de polluant étudié et son mode d'action. Ainsi, pour les organo-étains et les phénols substitués il existe une corrélation positive significative entre les CE_{50} de cytotoxicité et les LC_{50} des données de toxicité aigüe, mais pour d'autres types de produits chimiques, la corrélation est loin d'être satisfaisante et peut dépendre de facteurs tels que le mode d'action du polluant, sa physico-chimie, ou sa toxicocinétique (Knauer et al. 2007; Kramer et al. 2009). Par ailleurs, quand interviennent des mécanismes de toxicité propres à certains tissus cibles, des réponses adaptatives ou des conversions métaboliques nécessaires à l'expression

de la toxicité, l'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* est limitée pour prédire la toxicité *in vivo* (Fent 2001).

Avant d'être pleinement acceptés comme alternative aux tests de toxicité aiguë, les essais de cytotoxicité *in vitro* doivent générer des résultats comparables en ce qui concerne la hiérarchisation des produits chimiques, et ne doivent donner ni de faux positifs, ni de faux négatifs (Segner 2004).

3 Les lignées cellulaires de poisson comme système biologique d'alerte

Les lignées cellulaires peuvent également être utilisées pour étudier des biomarqueurs permettant de mettre en évidence de grandes familles de polluants présents dans des matrices environnementales. Ainsi, dans certaines lignées possédant le récepteur Aryl Hydrocarbon (AhR) servant de médiateur à l'induction d'activités monooxygénases à cytochrome P450, l'induction de l'activité EROD (Ethoxyrésorufine-*O*-dééthylase) est utilisée comme biomarqueur d'exposition à certains substrats inducteurs comme les HAPs et les substances « dioxin-like ». Une fois le niveau et les conditions de l'induction bien caractérisés, certaines lignées comme PLHC-1 peuvent même être utilisées pour une évaluation semi-quantitative de la contamination permettant de s'affranchir des dosages chimiques (David et al. 2010).

De même, le développement des lignées cellulaires à gènes rapporteurs permet par exemple la détection du potentiel de perturbation endocrinienne de polluants ou de matrices environnementales complexes. Ainsi, la mesure d'effets (anti) oestrogéniques et (anti) androgéniques a été développée faisant appel à des cultures de cellules génétiquement modifiées, contenant un gène rapporteur codant pour la luciférase conduisant à l'émission de lumière en présence d'un perturbateur endocrinien. L'intérêt de ce type de tests *in vitro* réside dans un rapport coût/performance qui en fait un outil particulièrement adapté aux opérations de criblage des molécules chimiques (Fent 2001; Cosnefroy et al. 2009; Cosnefroy et al. 2012).

4 Les lignées cellulaires de poisson pour les études des mécanismes de toxicité

Les lignées cellulaires de poisson sont également utilisées pour l'étude des mécanismes de toxicité, ceci nécessitant fréquemment l'utilisation conjointe de plusieurs biomarqueurs. Ainsi, le rôle du stress oxydant dans la toxicité de la microcystine-LR, du cuivre ou des

diphényl-ethers polybromés (PBDEs) a respectivement été étudié chez PLHC-1 (Puerto et al. 2009), RTG-W1 (Bopp et al. 2008) et RTL-W1 (Shao et al. 2008). Ces études font appel à l'évaluation conjointe des réponses des enzymes antioxydantes SOD, CAT, GPX, GST, de la peroxydation lipidique, de la viabilité cellulaire, et peuvent inclure l'étude des dommages primaires à l'ADN. De même, les mécanismes de protection contre le stress oxydant chez les poissons ont été étudiés chez PLHC-1 (Schlenk et Rice 1998).

Les lignées cellulaires peuvent également être utilisées dans l'évaluation globale de l'écotoxicité d'une molécule, au sein d'une batterie de biomarqueurs appliqués à plusieurs organismes. Ainsi l'écotoxicité du bromobenzène, du pentachlorophénol ou de l'hydroxyanisole butylé a été étudiée en détail avec un ensemble de tests monospécifiques classiques en écotoxicologie regroupant bactérie (*Vibrio fischeri*), algue unicellulaire (*Chlorella vulgaris*), plante terrestre (*Allium cepa*), invertébré (*Daphnia magna*) complétée par des mesures de cytotoxicité sur lignées cellulaires de mammifère et de poisson (RTG-2), (Repetto et al. 2001; Jos et al. 2004; Zurita et al. 2007). Dans ces études, les tests d'inhibition de la bioluminescence de *Vibrio fischeri* et d'immobilisation de la daphnie sont les plus sensibles, et les EC₅₀ déterminées sur lignées cellulaires peuvent être jusqu'à 100 fois plus élevées. Ceci peut être expliquée par la présence de sérum dans le milieu d'exposition, qui peut interférer avec la biodisponibilité des contaminants, et par le fait que de nombreuses études raisonnent en concentrations nominales et non en concentrations biodisponibles (Hestermann et al 2000 ; Schirmer 2006 ; Gulden et Seibert 2007). Cette moindre sensibilité des modèles cellulaires parfois observée nécessite une prise en considération sérieuse avec des protocoles d'exposition adaptés et l'utilisation de biomarqueurs et de tests les plus sensibles possibles.

5 Les lignées cellulaires de poisson en évaluation de la génotoxicité

En matière d'évaluation du potentiel génotoxique, les lignées cellulaires de poisson se présentent aujourd'hui comme une alternative prometteuse aux tests de génotoxicité et de mutagenèse classiquement réalisés avec des organismes procaryotes (test d'Ames, Umu-test, SOS chromotest, Mutatox®...) (Kammann et al. 2000; Nehls et Segner 2001; Nehls et Segner 2005) ou sur cellules de mammifères. En effet, les lignées cellulaires de poisson conservent en partie les caractéristiques métaboliques de leur tissu d'origine, et leur capacité de réparation moins performante que celle des cellules de mammifères en ferait un modèle plus sensible aux dommages à l'ADN, même si ce point reste à confirmer car jusqu'à présent peu d'études s'y sont intéressées.

Plusieurs marqueurs ont été mis en œuvre sur des lignées cellulaires afin d'évaluer le potentiel génotoxique de polluants aquatiques (Babich et Borenfreund 1991; Castaño et al. 2003) : la formation d'adduits à l'ADN (Smolarek et al. 1987) et d'aberrations chromosomiques (Kocan et al. 1985), l'échange de chromatides sœurs (Barker et Rackman 1979), ou la synthèse non programmée d'ADN (Walton et al. 1983; Walton et al. 1987). Plus récemment, ce sont surtout l'induction de micronoyaux (Babich et Borenfreund 1991; Castaño et al. 2000; Sánchez et al. 2000) et la mesure de dommages primaires par l'essai des comètes qui ont gagné un intérêt croissant en écotoxicologie génétique sur ces modèles (Braunbeck et Neumüller 1996; Kammann et al. 2000; Nehls et Segner 2001; Risso-de Faverney et al. 2001; Avishai et al. 2002). Ces biomarqueurs de génotoxicité ont été mesurés dans des lignées cellulaires dans le cadre d'applications variées : évaluation de la génotoxicité propre d'une molécule, étude de mécanisme de génotoxicité (Nehls et Segner 2001), du potentiel génotoxique de sédiments (Rocha et al. 2009; Šrut et al. 2011), d'effluents (Lee et al. 2008) ou d'eaux de surface (Avishai et al. 2002; Kamer et Rinkevich 2002; Nehls et Segner 2005). A titre d'illustration, le

Tableau 6 présente les études d'évaluation de la génotoxicité impliquant trois lignées cellulaires fréquemment utilisées en écotoxicologie choisie pour notre travail expérimental, les lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1. Par ailleurs, les lignées cellulaires de poisson sont également utilisées dans le cadre d'évaluation de la génotoxicité multicritères, associant plusieurs biomarqueurs de génotoxicité afin de mieux comprendre la corrélation des résultats (étude *in vitro/in vivo*, dommages primaires/mutagenicité...) (Rocha et al. 2009; Boettcher et al. 2010; Perovic et al. 2012).

<i>Réf.</i>	<i>Molécules</i>	<i>Bioessai</i>	<i>Résultats</i>
RTG-W1			
(Bopp et al. 2008)	Cu	EC	▲ significative des dommages primaires à l'ADN (1 et 2,5 μ M)
RTL-W1			
(Bechtel et Lee 1994)	AFB ₁ et métabolites (AFM, AFL, AFQ, AFB ₂) ^a	Incorporation de thymidine tritiée	AFB ₁ : ▼ dose dépendante de la synthèse de l'ADN (EC ₅₀ : 0,04 μ g/mL); AFQ, AFB ₂ : =. AFM, AFL: ▼ significative
(Boettcher et al. 2010)	Sédiments-Danube	EC, (et MN <i>in vivo</i> chez barbeau commun)	EC: ▲ dommages primaires à l'ADN; MN: très bonnes corrélations <i>in vitro-in vivo</i> et <i>in vitro-in situ</i> .
(Keiter et al. 2006)	Sédiments du Danube	EC	EC: ▲ dommages primaires à l'ADN
(Kosmehl et al. 2008)	Sédiments lacustres	EC	EC: ▲ dommages primaires à l'ADN
(Nehls et Segner 2001)	NQO, BaP, effluents environnementaux	EC	NQO, BaP, effluents: EC: ▲ dommages primaires à l'ADN, effet dose-réponse; sensibilité accrue de RTL-W1/RTG-2
(Rocha et al. 2009)	Sédiments de rivière	EC (MN <i>in vivo</i> chez le tilapia)	EC: ▲ dommages primaires à l'ADN, identification de différences de potentiel génotoxique parmi différents sites; bonne corrélation des résultats EC/MN
(Perovic et al. 2012)	Sédiments lacustres	EC, Test d'Ames	Génotoxicité détectée par les deux tests, bonne corrélation des résultats
PLHC-1			
(Šrut et al. 2011)	BaP, EMS, Sédiments marins	EC	▲ dommages primaires à l'ADN dose dépendant pour tous les sédiments testés et contrôle positif

Tableau 6 : Exemples d'étude d'évaluation de la génotoxicité sur les lignées cellulaires, RTG-W1, RTL-W1 et PLHC-1.

EC : essai comètes, MN : micronoyaux, BaP : Benzo-a-pyrène, EMS : Ethyl méthane sulfonate, AFM : aflatoxine M1 ; AFL : aflatoxicol ; AFQ : aflatoxine Q₁ ; AFB₂ : aflatoxine B₂; ▲ : augmentation ; ▼ : diminution

Chapitre IV - Objectifs de la thèse

Ce travail est né de la volonté de mieux intégrer les dangers génotoxiques des substances pures ou des matrices pluricontaminées dans l'évaluation des risques écotoxicologiques des milieux aquatiques, et dans le même temps, d'évaluer l'intérêt des lignées cellulaires de poisson comme modèle biologique et support de mise au point de biomarqueurs. En effet, il nous est apparu judicieux, dans ce cadre de développement méthodologique, de s'adresser en priorité à des modèles *in vitro*.

Ainsi, cette thèse a pour principal objectif le développement d'un panel de tests de génotoxicité complémentaires, tous basés sur un outil commun, l'essai des comètes en conditions alcalines, pour lequel différentes versions seront déclinées et testées pour leur capacité à évaluer l'impact des contaminants sur : i) le niveau de dommages primaires à l'ADN, ii) les activités cellulaires de réparation des lésions de l'ADN, iii) le niveau de méthylation des cytosines de l'ADN, paramètre épigénétique de régulation de l'expression des gènes. Ces développements seront réalisés sur les lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1.

Le travail s'organise en quatre grands axes détaillés ci-après et résumés dans la

Figure 22 :

1- La caractérisation des 3 lignées cellulaires et l'étude de leur capacité relative à **mettre en évidence des dommages primaires à l'ADN via l'essai des comètes modifié** avec introduction d'une étape de digestion par des enzymes de restriction, en vue d'évaluer leur **sensibilité respective à différents génotoxiques modèles**, et d'évaluer la faisabilité de cet essai avec chacune d'entre elles (dommage de base, effet dose-réponse...). Pour ce faire, nous sommes également intéressés à leurs **capacités de biotransformation** en choisissant de mesurer l'activité EROD dans nos conditions de culture.

2- Le développement d'un biomarqueur de génotoxicité basé sur la mesure de la capacité de réparation de lignées cellulaires à l'aide de l'essai des comètes modifié avec étape de digestion par des extraits cellulaires (**BERc, NERc**). Auparavant, seront réalisées la **mise en évidence et la caractérisation de leurs capacités de réparation des lésions spécifiques du BER, du NER ainsi que du PER** après exposition à des génotoxiques modèles, *via* des études de cinétiques de réparation.

3- Le développement d'un biomarqueur de modifications épigénétiques basé sur la mesure du niveau de méthylation de l'ADN génomique. Ce développement nécessitera au préalable de déterminer **le niveau de méthylation de base des lignées cellulaires et leur**

sensibilité à des agents déméthylants connus par mesure HPLC-MS/MS des 5-MeCyt, puis tentera la mise en place de l'utilisation d'enzymes spécifiques reconnaissant les sites méthylés de l'ADN (HpaII, MsPI) combinée avec l'essai des comètes en conditions alcalines.

4- L'application de deux biomarqueurs développés (1 et 2) à **l'évaluation de la génotoxicité d'effluents environnementaux** contaminés par des goudrons de houille, réalisée en collaboration avec l'USDS (Austin, Texas, USA) dans un cadre d'évaluation du risque de matrices environnementales chargées en hydrocarbures aromatiques polycycliques et en hétérocycles azotés.

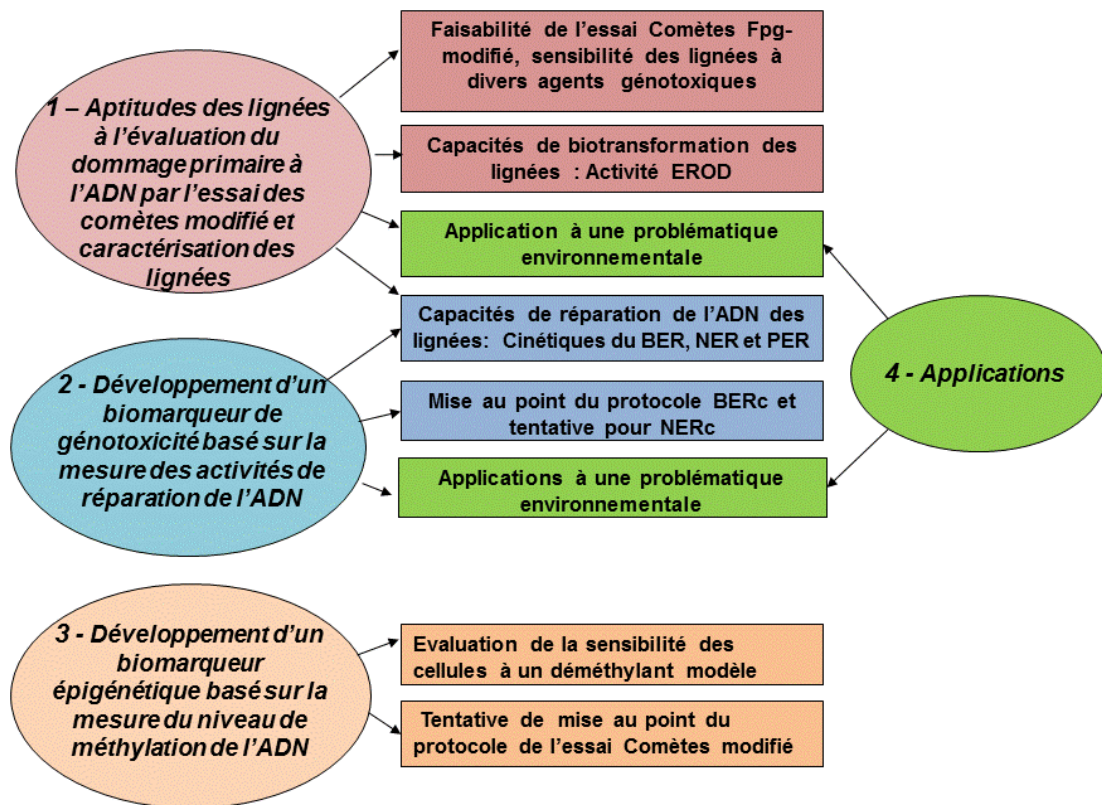


Figure 22 : Les grands axes du travail de thèse et leurs différentes composantes

Partie B - Etudes expérimentales

Notre travail expérimental est structuré en 5 chapitres :

- Un premier chapitre présente les matériels et méthodologies communs à toutes les expérimentations menées dans ce travail: lignées cellulaires utilisées, évaluation de la cytotoxicité, évaluation de la génotoxicité *via* le test des comètes standard.

- Les quatre chapitres suivants correspondent aux expérimentations réalisées dans le cadre de chacun des quatre grands axes de travail présentés dans la Figure 22.

Ce travail comportant de nombreux développements méthodologiques, des sous-chapitres décrivant les mises au point préalables à la mise en place des différents biomarqueurs ainsi que les matériels et méthodes associés sont inclus dans chacun des chapitres.

Chapitre I - Matériels et méthodes

1 Matériels biologiques mis en œuvre

1.1 Caractéristiques des lignées cellulaires utilisées

Dans le cadre de cette thèse, trois lignées cellulaires ont été utilisées. Deux sont issues de la truite arc-en-ciel, *Onchorynchus mykiss* : RTgill-W1 ou RTG-W1 (ATCC CRL 25-23, Bols et al. 1994; Lee et al. 2009) et RTL-W1 (Lee et al. 1993). Ces deux lignées sont non transformées et non cancéreuses (Tableau 7). PLHC-1 est une lignée cancéreuse issue d'un carcinome hépatique provoqué par exposition au cancérigène 7,12-diméthylbenzanthracène du poisson *Poeciliopsis lucida* (Hightower et Renfro 1988).

Des capacités de biotransformation ainsi que l'existence d'un récepteur aryle hydrocarbure ont été mises en évidence chez PLHC-1, d'où une forte capacité d'induction des cytochromes P4501A (CYP1A) (Babich et al. 1991; Hahn et al. 1993). L'activité des cytochromes CYP1A est constitutive et inductible chez la lignée RTL-W1 (Lee et al. 1993; Babín et al. 2005b). Les caractéristiques métaboliques connues telles que les activités de biotransformation, activités antioxydantes, et récepteurs AhR sont détaillées dans le Tableau 8.

Peu de données sont disponibles en ce qui concerne les activités de biotransformation et les défenses antioxydantes de la lignée RTG-W1, et si une activité des CYP1A a été mise en évidence chez des cellules primaires d'épithélium de branchies de truite (Leguen et al. 2000), aucune activité EROD constitutive ou inductible n'a été montrée chez la lignée RTG-W1. RTL-W1 et PLHC-1 ont été choisies pour leur capacité de biotransformation, nécessaire à la pleine expression de certains génotoxiques comme les HAPs. RTG-W1 a été choisie pour sa résistance à l'hyper et l'hypo-osmolarité et sa croissance optimale à température ambiante qui font d'elle un modèle idéal pour la toxicologie aquatique *in vitro*. Par ailleurs, les branchies étant le premier organe au contact des polluants, les cellules de branchies sont un modèle tout indiqué à l'étude des toxiques aquatiques, notamment du fait de leur capacité à être exposées à des effluents quasi-directement, sans extraction ou concentration préalable (Lee et al. 2009).

Enfin, il n'existe aucune donnée à ce jour caractérisant les activités de réparation de l'ADN dans ces trois lignées.

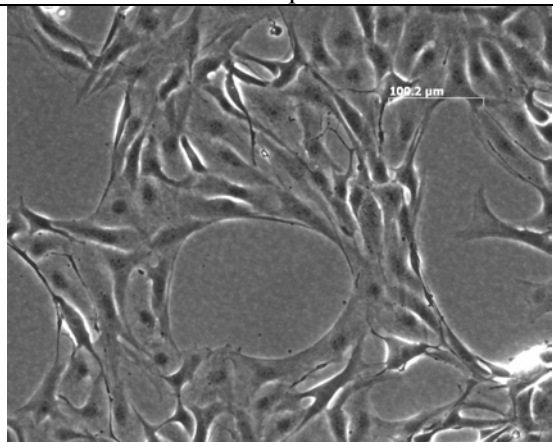
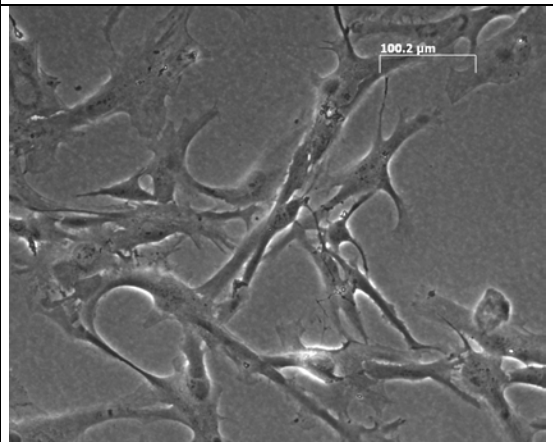
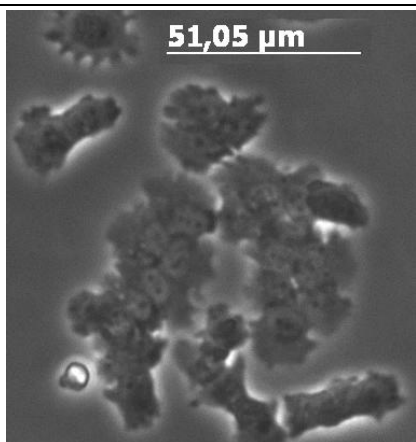
Lignée	RTL-W1	RTG-W1	PLHC-1
Origine	<i>Onchorynchus mykiss</i>		<i>Poeciliopsis lucida</i>
Type de tissu	Epithélium de foie	Epithélium de branchie	Epithélium, carcinome hépatique
Temps de génération moyen en milieu L15+10%SVF	81h	65h	29h
Conditions de croissance	20°C, milieu L-15 + 10%SVF		30°C, milieu minimum de Eagle (MEM) +10% SVF et 5% de CO ₂ ou milieu L-15 + 10%SVF
N° ATCC	Non déposée	CRL 2523	CRL-2406
Morphologie			
Morphologie et caractéristiques de croissance	Croissance reproduisant certaines caractéristiques des cellules hépatiques : laisse des plages arrondies, vestiges de canaux biliaires	Croissance homogène en réseau ; utilisent tout l'espace	Ont conservé certaines caractéristiques morphologiques des hépatocytes : bordures sinueuses, présence de vésicules de sécrétion autour de la surface cellulaire
Références	(Lee et al. 1993)	(Bols et al. 1994; Lee et al. 2009)	(Hightower et Renfro 1988)

Tableau 7 : Caractéristiques des différentes lignées cellulaires utilisées

(Photos LEHNA)

		<i>Enzyme</i>	<i>PLHC-1</i>	<i>RTL-W1</i>	<i>RTG-W1</i>	<i>Références</i>
<i>Défenses antioxydantes</i>	Antioxydants primaire	Superoxyde dismutase (SOD)	oui	nd	nd	(Puerto et al. 2009)
		Catalase (CAT)	oui	nd	nd	
		Glutathion peroxidase (GPx)	oui	nd	nd	
		Glutathion réductase (GR)	oui	nd	nd	
		Glutathion-S-transférase	oui (Puerto 2009)	oui	nd	(Nehls et Segner 2001)
	Antioxydant secondaire	Glutathion	oui	nd	nd	(Schlenk et Rice 1998)
<i>Biotransformation</i>	Récepteur AhR		oui	oui	nd	(Babich et al. 1991; Bols et al. 1999)
Phase I	Hydroxylation	CYP1A (EROD)	oui, inductible	oui, constitutive et inductible	nd	(Lee et al. 1993; Nehls et Segner 2001)
		CYP2M	nd	nd	nd	(Thibaut et al. 2009)
		CYP2K	nd	nd	nd	
		CYP3A	oui	nd	nd	
	Déshydrogénation	3 β -HSD	oui	nd	nd	
		17 β -HSD	oui	nd	nd	
	Réductase	5 α -réductase	oui	oui	nd	
Acétyl cytochrome c réduction		nd	oui	nd		
Phase II	Glucuronidation	Phénol-UGT (1-N glucuronidation)	oui	oui	nd	(Thibaut et al. 2009)
		Stéroïde-UGT (T glucuronidation)	nd	oui	nd	
	Sulfation	Phénol-SULT (1-N sulfation)	oui	oui	nd	
		Stéroïde-SULT (T sulfation)	oui	nd	nd	
	Conjugaison	GST (CDNB conjugaison)	oui	oui	nd	
	Réductase	DT-diaphorase	nd	oui	nd	
Phase III	Protéines MXR	Pgp-1, MRPs	Oui (Pgp1, abcb1, abcc3)	nd		(Zaja et al. 2007; Zaja et al. 2008)
		Transporteurs abcb ; abcc		Oui (abcb, abcc)	Oui (abcb, abcc)	(Fischer et al. 2011)

Tableau 8 : Caractéristiques métaboliques des lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1

nd : non déterminé

1.2 Domaines d'utilisation

Ces trois lignées cellulaires sont utilisées depuis plusieurs années pour évaluer la toxicité de polluants chimiques de divers types (HAPs, PCBs, retardateurs de flamme, pesticides, produits pharmaceutiques, métaux...) ou de matrices environnementales contaminées (effluents liquides, extraits organiques de sédiments ou de matières en suspension etc...). Les Tableau 9 et Tableau 10 présentent un panel représentatif des études ayant utilisé ces modèles cellulaires ainsi que les critères de toxicité et biomarqueurs mis en œuvre.

Elles ont également été utilisées en évaluation de la génotoxicité de molécules chimiques, sédiments ou effluents environnementaux comme précédemment détaillées dans le Tableau 6.

<i>Ref.</i>	<i>Substances testés</i>	<i>Critères utilisés</i>
<i>RTL-W1</i>		
(Babín et Tarazona 2005)	Pesticides : bifenthrine, cyperméthrine, cyhalothrine, λ-cyhalotrine, quinalphos, chlorpyrifos	RN, FRAME; EROD, β-gal.
(Babín et al. 2005a)	Antimicrobiens: tétracycline, oxytétracycline, sulfachlorpyridazine, septrine, chlorpyrifos	RN, FRAME; EROD; β-gal.
(Babín et al. 2005b)	Prochloraz	Induction CYP1A1, EROD
(Schnell et al. 2009b)	Ibuprofène, solution mère préparée dans éthanol ou DMSO	AB ; CFDA-AM
(Bols et al. 1999)	TCCD, 24 HAP non substitués	EROD
(Dayeh et al. 2005)	Métaux: Cu, Cd, Zn, Ni, Fe	AB ; CFDA-AM; RN. Comparaison de RTL-W1 et RTG-W1
(Schirmer et al. 2001)	Effluent de raffinerie : FA, FP, FS ^a	EROD
(Clemons et al. 1998)	Combinaison binaire de 2,3,7,8-TCDD et 7 PCBs.	EROD
(Schnell et al. 2009a)	11 Produits pharmaceutiques, 5 produits de soins, seuls ou en mélange	AB, CFDA-AM
(Keiter et al. 2006)	Sédiments du Danube	RN
(Schirmer et al. 2004)	Effluent aqueux dioxin-like	CFDA-AM ; EROD,
(Schirmer et al. 2000)	BaP, métabolites du BaP	AB, CFDA-AM; EROD, CYP1A
(Shao et al. 2008)	Retardateur de flamme	AB, H2DCF-DA
(Wölz et al. 2009)	Sédiments de la Mer Baltique	EROD
<i>RTG-W1</i>		
(Schirmer et al. 1998)	16 HAP	AB, CFDA-AM, RN
(Dayeh et al. 2005)	Cf RTL-W1	
(Schirmer et al. 2001)	Effluent de raffinerie	AB, CFDA-AM
(Bopp et al. 2008)	Cu	H2DCF-DA, CFDA-AM, TBARS
(Shao et al. 2008)	Cf RTL-W1	

Tableau 9 : Quelques exemples d'étude de la toxicité chez RTL-W1 et RTG-W1 et critères d'étude retenus.

Cytotoxicité: RN: Rouge neutre; AB: Alamar Blue, FRAME: Essai FRAME Kenacide Blue protein, CFDA-AM : Carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester, MTT: réduction des sels de tetrazolium; H2DCF-DA; formation de ROS; TBARS: peroxydation lipidique ; Métabolisme: EROD=activité EROD, β-gal=activité β-galactosidase

PLHC-1		
(Traven et al. 2008)	Sédiments contaminés (HAPs, PCBs, Métaux lourds)	EROD
(Huuskonen et al. 1998a)	Sédiments et eaux contaminées aux PCBs	EROD, contenu total en protéines, Porphyrines
(Huuskonen et al. 1998b)	Cellulose - extraits de copeaux de bois de l'industrie papetière	EROD, contenu total en protéines
(Huuskonen et al. 1998c)	Sédiments contaminés (HAPs, métaux lourds, sulfates, chlorures)	EROD, contenu total en protéines
(Lindström-Seppä et al. 1997)	Effluents d'industrie papetière	Contenu total en protéines
(Babich et al. 1991)	alkylbenzène, phtalates diesters, pesticides organochlorés et organophosphorés, benzo[a]pyrène	RN
(Schlenk et Rice 1998)	H ₂ O ₂ , Zn, Cd	Glutathion (GSH), métallothionéine
(Brüschweiler et al. 1995)	Organoétains (21)	R N, MTT
(Celandier et al. 1996)	Glucocorticoïdes - Dexaméthasone, prégnénolone-16 α -carbonitrile, rifampicine	Expression des gènes CYP1A et CYP3A, EROD
(Laville et al. 2004)	Produits pharmaceutiques: clofibrates, fénofibrate, carbamazépine, fluoxétine, diclofénac, propranolol, sulfaméthoxazole, amoxicilline, chlorure de gadolinium	MTT, EROD, stress oxydant (dichlorofluorescein assay, DCFH-DA)
(Zurita et al. 2007)	Bromobenzène - RTL-W1 et RTG-2	Morphologie, RN, MTS, teneur totale en protéine, fonction lysosomale, activité succinate déshydrogénase, activité G6PDH, EROD, induction des métallothionéines
(Thibaut et Porte 2008)	Produits pharmaceutiques: régulateurs de lipides, anti-inflammatoires non-stéroïdiens antidépresseurs	MTT ; activité EROD
(Dyer et al. 2008)	Surfactants: alkylbenzène sulfonate linéaire (C12-LAS); alcool éthoxylé (C13E08)	RN, coloration des protéines (sulforhodamine blue -SRB), biotransformation et bioaccumulation
(Dyer et al. 2009)	Surfactants: alcool éthoxylé (C16E08), sulfate éthoxylé (C14EO2S)	RN, biotransformation et bioaccumulation
(Caminada et al. 2006)	Produits pharmaceutiques	NR, MTT
(Caminada et al. 2008)	Produits pharmaceutiques	MTT ; biotransformation: capacité de modulation de l'activité des protéines MXR

Tableau 10 : Quelques exemples d'étude de la toxicité chez PLHC-1, et les critères d'étude retenus.

Cytotoxicité: RN: Rouge neutre; AB: Alamar Blue, FRAME: Essai FRAME Kenacide Blue protein, CFDA-AM : Carboxyfluorescein diacetate acetoxymethyl ester, MTT: réduction des sels de tetrazolium; H2DCF-DA; formation de ROS; TBARS: peroxydation lipidique ; Métabolisme: EROD=activité EROD, β -gal=activité β -galactosidase

1.3 Conditions de culture

Dans le cadre de ce travail, les lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1 ont toutes été cultivées en milieu de Leibovitz (L-15) (réf. 31-415 Gibco® ; composition détaillée en annexe I), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco® réf. 10437-028), de la pénicilline (100 IU/mL) et de la streptomycine (100µg/mL) en atmosphère non enrichie en CO₂ dans des chambres de culture (Sanyo Incubator MIR-153), à 20°C pour les lignées de truite RTL-W1 et RTG-W1 et à 30°C pour la lignée PLHC-1.

En routine, les lignées sont cultivées en flacons traités pour culture cellulaire (Nunc) de 75 cm², dans 15 mL de milieu complet. Elles sont trypsinées à environ 80% de la confluence et réensemencées au ½ (80 000 cellules/mL) pour RTL-W1 et RTG-W1, ou au 1/5^{ème} (60 000 cellules/mL) pour PLHC-1, ce qui correspond à une ou deux trypsinations par semaine. La concentration de la trypsine utilisée est de 0.25% pour RTL-W1 et RTG-W1, et de 0.025% pour PLHC-1, dans du PBS-EDTA à 0.03%. Le protocole détaillé du mode opératoire utilisé pour trypsiner les cellules est donné en annexe II.

Au début de ce travail, un lot de conservation de chaque lignée cellulaire a été réalisé, ainsi que des lots de travail, tous conservés dans des vapeurs d'azote liquide. Pour chaque lignée, le nombre de passages des aliquotes de travail a été limité à une quinzaine maximum.

Les lignées étaient régulièrement examinées pour vérifier l'absence de mycoplasmes (Kit MycoAlert, Lonza, USA, réf. LT07-118).

2 Evaluation de la cytotoxicité

Compte tenu des artéfacts liés aux phénomènes de nécrose ou d'apoptose sur le niveau de fragmentation de l'ADN mesuré par l'essai des comètes, toutes les expositions à un génotoxique, une matrice contaminée, ou à un inhibiteur spécifique de la réparation ont fait l'objet d'une évaluation préalable soignée de la cytotoxicité sur la durée d'exposition prévue pour l'étude de génotoxicité. Seules les concentrations d'exposition assurant une viabilité supérieure à 85% ont ensuite été utilisées pour les essais de génotoxicité.

Pour évaluer la cytotoxicité, le test de viabilité Cell Titer Blue® (Promega, France) a été choisi parmi d'autres tests après des essais préalables (inclusion lysosomale du rouge neutre, réduction du MTT) pour sa praticité, sa sensibilité, sa bonne linéarité de réponse (1000 à 25 000 cellules/puit) et sa répétabilité préalablement testée avec les trois lignées cellulaires

utilisées. Ce test est basé sur la capacité métabolique des cellules à réduire la rézazurine en résorufine qui fluoresce. Quatre heures avant la fin de l'exposition au composé testé en plaques multipuits noires (Fluonunc, 96 puits), 20 μ L de la solution de rézazurine sont ajoutés dans chaque puit contenant 100 μ L de milieu et la fluorescence (λ Ex 560nm, λ Em 590nm) est lue à l'aide d'un lecteur de plaque multipuits (Fluostar Optima BMG Labteck, France). Chaque test de cytotoxicité est réalisé en triplicats indépendants avec 6 puits/dose en réplicats intra-plaque. Des puits témoins sans cellules et témoins solvants sont réalisés systématiquement. La viabilité est exprimée en pourcentage de la fluorescence des puits témoins non exposés (ou exposés seulement au solvant). Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'erreur type (SEM) des trois réplicats. La distribution des données n'étant la plupart du temps pas normale, l'analyse statistique a été réalisée par le test non paramétrique U de Mann et Whitney comparant la viabilité pour chaque concentration à celle du témoin non exposé.

3 Evaluation de la génotoxicité : protocole de l'essai des comètes standard

A l'issue des expositions aux génotoxiques (les détails relatifs à chaque expérimentation sont donnés dans la partie correspondante), les cellules sont mises en suspension par trypsination (Annexe II).

En condition non aseptique, cette suspension cellulaire est mélangée volume/volume à un gel d'agarose à bas point de fusion (1% dans du PBS, Sigma A0701) maintenu en surfusion à 37°C. Quarante microlitres de ce mélange sont déposés sur une lame de microscope préalablement recouverte d'une couche de 0.8% de gel d'agarose de type I (Sigma A6013), recouverts d'une lamelle 22x22 mm, puis laissés à refroidir 10 minutes à 4°C (deux gels/lame, environ 10 000 cellules/gel). Les lamelles sont ensuite retirées, les lames disposées dans une cuvette et recouvertes de tampon de lyse (pH 10) (Tableau 11) pendant 1h30 à l'obscurité et à 4°C. A partir de ce moment, toutes les manipulations sont réalisées en éclairage inactinique afin de limiter les dommages artéfactuels à l'ADN dus aux rayonnements UV. A la fin de la lyse, les lames sont rincées 5 minutes avec du PBS froid, égouttées, disposées dans une cuve d'électrophorèse horizontale et recouvertes de tampon d'électrophorèse (pH>13) pendant 40 minutes afin de permettre le déroulement de l'ADN.

L'électrophorèse se déroule ensuite pendant 24 minutes avec un courant réglé à 20V (0.61V/cm) et 300 mA. Enfin, les lames sont égouttées, rincées trois fois pendant 5 minutes avec le tampon de neutralisation, égouttées et déshydratées dans de l'éthanol absolu pendant 30 minutes. Elles sont ensuite mises à sécher à l'air libre dans l'attente de la quantification du niveau de dommage par analyse d'images. Pour ce faire, elles sont marquées avec 25 μ L d'une solution aqueuse à 0,02% de bromure d'éthidium.

<i>Tampon</i>	<i>Composant</i>	<i>Rôle</i>
Tampon de lyse	2.5 M NaCl	Dégradation des protéines (histones et non histones)
	0.1 M Na ₂ EDTA	Inhibe les nucléases en complexant les cofacteurs métalliques
<i>Ajout extemporané</i>	10 mM Tris	Assure les conditions alcalines
	10% DMSO	Antioxydant
	1% Triton X100	Assure la destruction des membranes cellulaire et nucléaire
Tampon d'électrophorèse	0.3 M NaOH	Assure les conditions alcalines : séparation des doubles brins, ouverture des sites alcali-labiles
	1 mM Na ₂ EDTA	Inhibe les nucléases en complexant les cofacteurs métalliques
Tampon de neutralisation	0.4 M TrisHCl	Assure les conditions neutres : réappariement de l'ADN sous forme double brins

Tableau 11 : Composition et rôles des différents tampons utilisés lors de l'essai des comètes en conditions alcalines

Dans cette thèse, toutes les expérimentations faisant appel à l'essai des comètes (dans cette version standard, tout comme dans toutes les versions modifiées qui seront décrites au fil des chapitres) ont été réalisées en triplicats indépendants. Dans chaque réplicat, un échantillon (contaminant, dose ou temps d'exposition) correspond à 1 puit de culture avec lequel deux gels sont préparés. Cinquante cellules ont été analysées par gel (logiciel Comet IV, Perceptive Instruments Ltd, UK), soit 100 cellules par échantillon et par réplicat indépendant générant une valeur médiane par réplicat. Les résultats sont présentés comme la moyenne des réplicats \pm l'écart-type (ET), pour le critère « % Tail Intensity » (% de fluorescence dans la queue). L'analyse statistique des données étant différente en fonction des types d'expérimentations réalisés, elle sera détaillée au cas par cas.

Chapitre II - Evaluation des dommages primaires à l'ADN par un essai des comètes modifié

Ce chapitre traite des expérimentations réalisées dans le cadre du premier axe de travail (Figure 22) qui a pour objectif d'évaluer la sensibilité des lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1 à des génotoxiques modèles (H_2O_2 , MMS) et environnementaux (B[a]P, cadmium, diuron et 3,4 dichloro aniline) *via* l'essai des comètes en conditions alcalines dans sa version modifiée par ajout d'une étape de digestion enzymatique. L'utilisation d'une version modifiée de l'essai s'entend ici pour proposer un biomarqueur le plus sensible et ubiquiste possible des dommages primaires à l'ADN et non pas dans un objectif de caractérisation de la nature du dommage comme c'est généralement le cas. Pour certaines molécules, le caractère génotoxique passe par une étape de biotransformation préalable (le B[a]P par exemple). Ainsi, les capacités de métabolisation des différentes lignées cellulaires pourraient expliquer des différentiels de sensibilité en matière d'évaluation génotoxique. Il nous a donc semblé utile de faire en complément une évaluation d'une activité modèle de type monooxygénase à cytochrome P4501A, l'activité EROD (éthoxy-résorufine-*O*-dééthylase) pour les trois lignées dans les conditions de culture puisqu'il est avéré que ce paramètre peut varier en fonction du milieu, de la concentration en sérum, ainsi qu'en fonction du temps et de la concentration d'exposition (Segner et al. 2000; Hestermann et al. 2002).

Ce chapitre est subdivisé en deux parties:

- Les expérimentations permettant de déterminer les gammes d'exposition sub-cytotoxiques pour divers génotoxiques en vue de l'application de l'essai et les expérimentations d'optimisation d'un protocole de l'essai des comètes modifié par le choix d'une endonucléase à large spectre.

- L'application du protocole de l'essai des comètes modifié aux trois lignées RTL-W1, RTG-W1, PLHC-1, à la détermination des seuils de détection de divers génotoxiques, ainsi qu'à la caractérisation de l'activité EROD pour les trois lignées cellulaires.

Cette seconde partie a fait l'objet de la publication II, "Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay." *Toxicology in Vitro* **26**(3): 500-510. (Kienzler et al. 2012).

1 Optimisation du protocole de l'essai des comètes modifié par une étape de digestion enzymatique

1.1 Détermination préalable des gammes d'exposition sub-cytotoxiques à divers génotoxiques

➤ Méthode :

Les cellules sontensemencées à 200 000, 250 000 et 300 000 cellules/mL pour RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1 respectivement, dans des plaques noires 96 puits (Fluonunc, 100µL/puit). Vingt-quatre heures après ensemencement, les cellules sont exposées au MMS dans du milieu L-15 complet, ou à H₂O₂ dans du PBS, à l'obscurité et sur de la glace, ou encore 24h au cadmium, diuron ou 3,4-DCA aux concentrations détaillées dans le Tableau 12. Immédiatement après exposition au MMS ou à H₂O₂, 20 µL de CTB sont ajoutés à chaque puit pour 4 heures d'incubation (Ch. B-I § 2) avant lecture de la fluorescence. Dans le cas de l'exposition au B[a]P, au Cd, au diuron et à son métabolite la 3,4 di-chloroaniline (3,4-DCA), les 20 µL de CTB sont ajoutés 20h après le début de l'exposition pour une lecture en fin d'exposition (24h).

<i>Génotoxiques</i>	<i>Concentrations testées et milieu d'exposition</i>	<i>Durée d'exposition</i>
H ₂ O ₂	0 ; 1 ; 10 ; 50 ; 100 µM, PBS	10 min
MMS	0 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 ; 5 ; 10 mM, milieu L-15 complet	15 min
B[a]P	0 ; 0,1 ; 0,5 ; 1 ; 10 ; 100 µM, milieu L-15 complet	24h
Diuron	0 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 ; 1000 µg/L, milieu L-15 complet	24h
3,4-DCA	0 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 ; 1000 µg/L, milieu L-15 complet	24h
Cadmium	0 ; 0,1 ; 1 ; 10 ; 100 µM, milieu L-15 sans sérum	24h

Tableau 12 : Exposition aux différents génotoxiques

➤ Résultats :

Les résultats sont présentés dans la Figure 23 pour les génotoxiques modèles H₂O₂, et MMS ainsi que pour le B[a]P, et dans la Figure 24 pour le cadmium, le diuron et son métabolite 3,4 dichloroaniline (3,4 DCA).

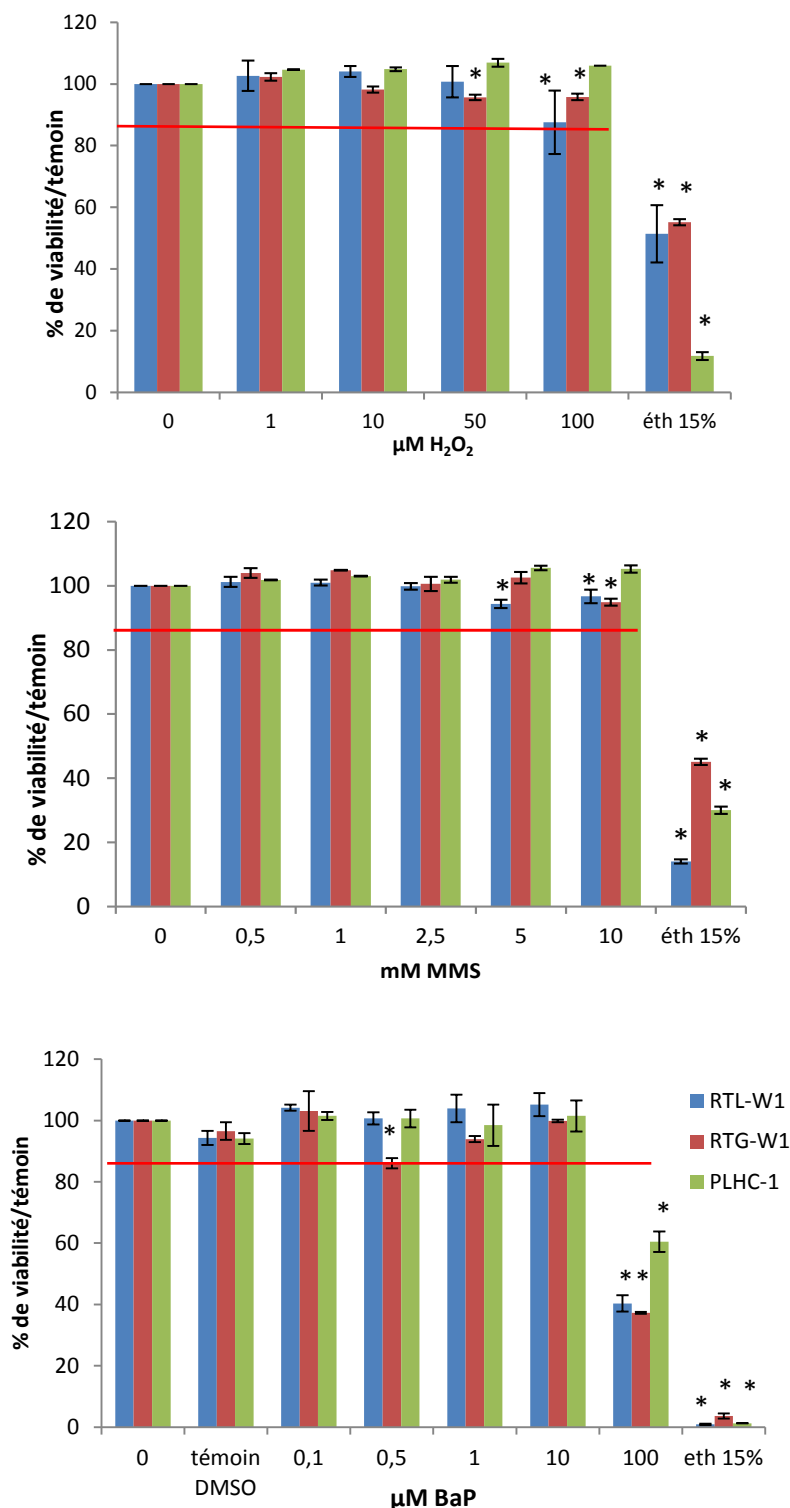


Figure 23 : Cytotoxicité des génotoxiques modèles H₂O₂, MMS et B[a]P sur les lignées cellulaires RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1.

Exposition de 10, 15 minutes et 24h pour H₂O₂, MMS et B[a]P respectivement ; témoin DMSO : 0.01% DMSO ; témoin positif : éthanol 15% ; moyenne ± SEM de 3 réplicats. * : différence significative par rapport au témoin (témoin DMSO dans le cas du B[a]P) (p < 0,05), Test de Kruskal Wallis ; test post-hoc de comparaisons multiples. La ligne rouge correspond à 85% de viabilité par rapport au témoin.

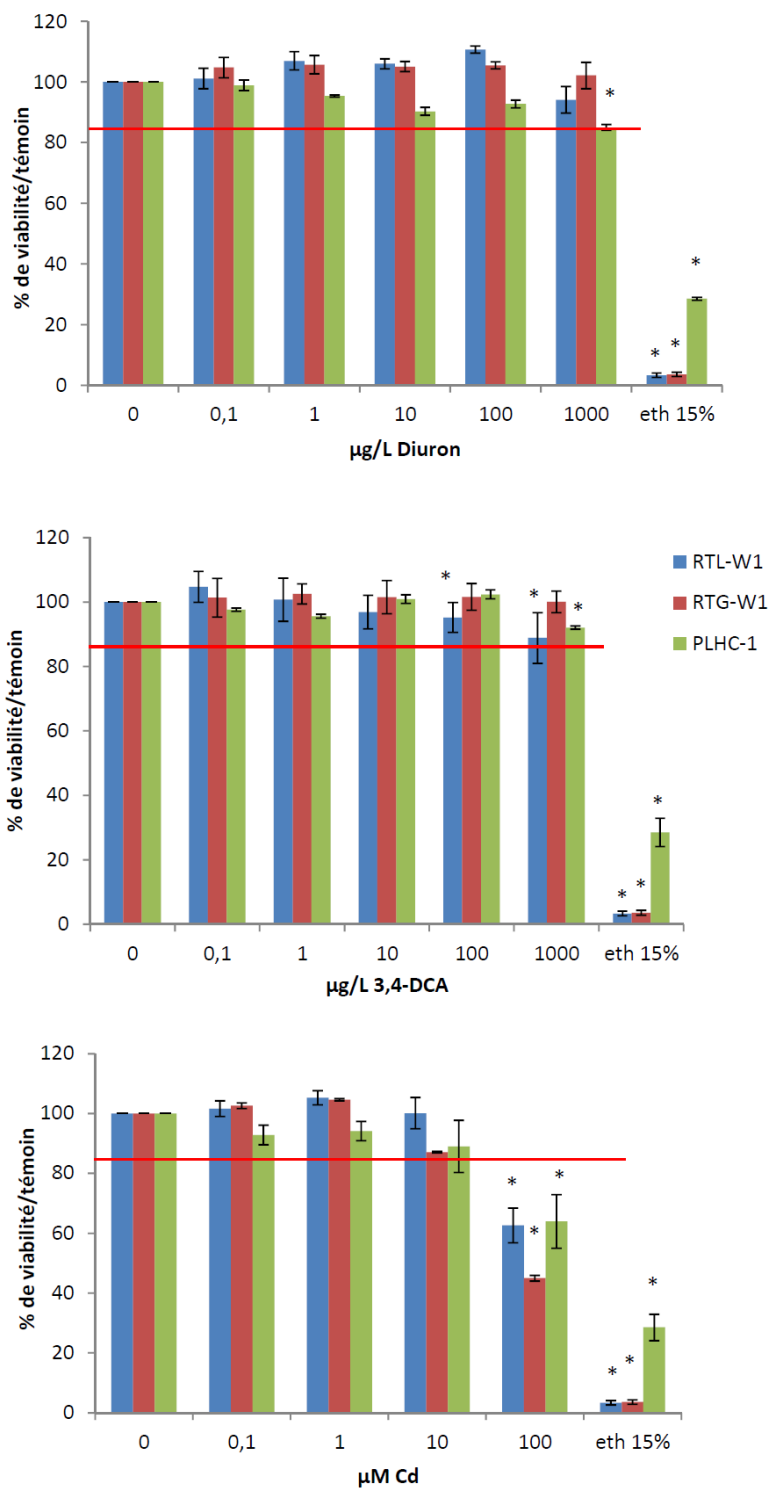


Figure 24 : Cytotoxicité du cadmium, diuron et 3,4-DCA sur les lignées cellulaires RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1.

*Exposition de 24h pour les trois molécules ; témoin positif : éthanol 15% ; moyenne ± SEM de 3 réplicats. * : différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$), Test de Krsuskall Wallis, test post-hoc de comparaison multiples. La ligne rouge correspond à 85% de viabilité par rapport au témoin*

Ces données de cytotoxicité ont permis de fixer des plages d'évaluation de la génotoxicité de 0 à 50 μM pour l' H_2O_2 , 0 à 5 mM pour le MMS, 0 à 10 μM pour le B[a]P, 0 à 100 $\mu\text{g/L}$ pour le diuron et la 3,4-DCA, et enfin 0 à 10 μM pour le Cd. Une viabilité supérieure à 85% par rapport au témoin a été considérée acceptable sur la base du consensus existant sur ce point dans la littérature (Tice et al. 2000).

1.2 Choix de l'enzyme

Deux enzymes sont connues dans la bibliographie pour leur capacité à mettre en évidence un large spectre de dommages oxydatifs et certaines alkylations de bases : l'endonucléase III (Endo III) et la formidopyrimidine glycosylase (Fpg) (Figure 17B). Elles ont donc été comparées dans un premier temps, suite à l'exposition des cellules des trois lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1 à deux génotoxiques modèles : un alkylant, le méthylméthane sulfonate (MMS - 15 min d'exposition en milieu L-15 complet) et un oxydant, le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 - 10 min d'exposition dans du PBS). L'exposition au peroxyde d'hydrogène se fait à l'obscurité afin d'éviter sa dégradation à la lumière, et au froid afin d'éviter la réparation des lésions oxydatives, connue pour être rapide (de l'ordre de quelques dizaines de minutes).

➤ Méthode :

Les cellules sontensemencés à 200 000, 250 000 et 300 000 cellules/mL pour RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1 respectivement, dans des plaques 12 puits. Vingt-quatre heures après ensemencement, les cellules sont exposées 15 minutes au MMS (0, 100, 500, 1000, 5000 μM) dans du milieu L-15 complet, ou 10 minutes à H_2O_2 dans du PBS (0, 1, 5, 10, 50 μM) à l'obscurité et sur de la glace. Immédiatement après l'exposition, les cellules sont trypsinées et le protocole de l'essai standard décrit (Ch. I § 3) est appliqué, avec ajout, après l'étape de lyse et avant celle du déroulement, d'une étape d'incubation avec enzyme.

Pour ce faire, à leur sortie du tampon de lyse, les lames sont rincées trois fois pendant 5 minutes avec du tampon d'activité des enzymes (0.1 M KCl, 0.5 mM Na_2EDTA , 40 mM Hepes KOH, 0.2 mg/mL BSA, pH 8.0). Chaque enzyme est diluée extemporanément dans ce tampon au 1/500^{ème}, et 30 μL de cette solution sont ajoutés sur chaque gel (correspondant à 0.4 UI pour la Fpg - NEB M0240S- et 0.6 UI pour l'Endo III -NEB M0286S- par gel) et sont recouverts d'une lamelle. Des lames témoins sont également préparées avec 30 μL de tampon enzyme seul. Les lames sont placées dans des boîtes plastiques humidifiées à 37°C et à l'obscurité pendant 30 minutes. A la fin de l'incubation, les lames sont mises à 4°C pendant 5

minutes afin de consolider les gels, les lamelles sont enlevées et les lames rincées 5 minutes avec du PBS froid. La fin de l'essai est ensuite similaire à celle d'un essai standard (déroulement-électrophorèse-neutralisation-analyse d'image).

➤ **Résultats et discussion :**

Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 25. Quel que soit l'agent génotoxique utilisé, l'enzyme Fpg permet une augmentation de la sensibilité de l'essai (niveau de cassures), plus importante qu'avec l'enzyme EndoIII. Ceci est cohérent avec les données de la bibliographie qui indiquent une plus stricte spécificité pour les dommages oxydatifs de l'enzyme Endo III.

Traduits sous la forme de facteurs d'induction du signal par rapport à celui obtenu avec l'essai comètes standard (rapport %TI avec enzyme / %TI sans enzyme,

Tableau 13), les résultats confirment que l'enzyme Fpg améliore nettement la détection des dommages, donc la sensibilité de l'essai, et plus efficacement que ne le fait l'Endo III, ceci étant particulièrement clair pour les plus faibles concentrations d'exposition. En effet, une ANOVA multifactorielle met en évidence un effet enzyme significatif pour les deux molécules testées ; dans le cas des ratios obtenus avec H₂O₂, il ressort également un effet lignée (PLHC-1 différente de RTG-W1 et RTL-W1). C'est le seul cas où les deux enzymes donnent des résultats sensiblement équivalents.

	<i>PLHC-1</i>		<i>RTG-W1</i>		<i>RTL-W1</i>	
<i>H₂O₂ (μM)</i>	Endo III	Fpg	Endo III	Fpg	Endo III	Fpg
1	3,4±0,8	2,4±1,9	5,4±0,2	12,7±3,7	2,8±1,9	6,3±1,1
5	2,1±0,7	1,9±0,5	1,4±0,4	2,0±0,06	1,0±0,4	2,4±0,5
10	1,1±0,2	1,6±0,3	1,2±0,2	2,1±0,3	1,5±0,4	2,4±0,7
50	1,0±0,1	1,1±0,2	1,0±0,02	1,1±0,03	1,0±0,03	1,1±0,02
<i>MMS (μM)</i>						
100	2,1±2,3	9,8±2,39	1,9±1,1	8,5±5,8	2,2±0,6	12,8±6,8
500	2,3±0,8	6,8±3,89	3,27±1,2	12,3±4,6	2,4±1,0	9,95±3,1
1000	2,1±0,2	4,7±1,68	1,5±0,2	4,5±0,7	1,7±0,3	9,7±3,6
5000	2,7±1,1	1,4±2,19	1,4±0,04	2,5±0,1	1,2±0,4	2,6±0,3

Tableau 13 : Facteurs d'induction du signal (%TI+enzyme/%TI sans enzyme) lus par l'essai des comètes modifié avec les enzymes Endo III et Fpg, calculés pour chaque concentration et chaque lignée cellulaire après exposition au MMS et à H₂O₂.

Les résultats de cette comparaison nous ont permis de choisir l'enzyme Fpg pour la suite de ce travail visant à mettre en place les conditions de détection des dommages primaires

à l'ADN de ces trois lignées cellulaires avec la plus grande sensibilité possible. Ce choix rend cet essai compatible avec l'évaluation du potentiel génotoxique de substances ou de matrices contaminées à des concentrations environnementales généralement faibles.

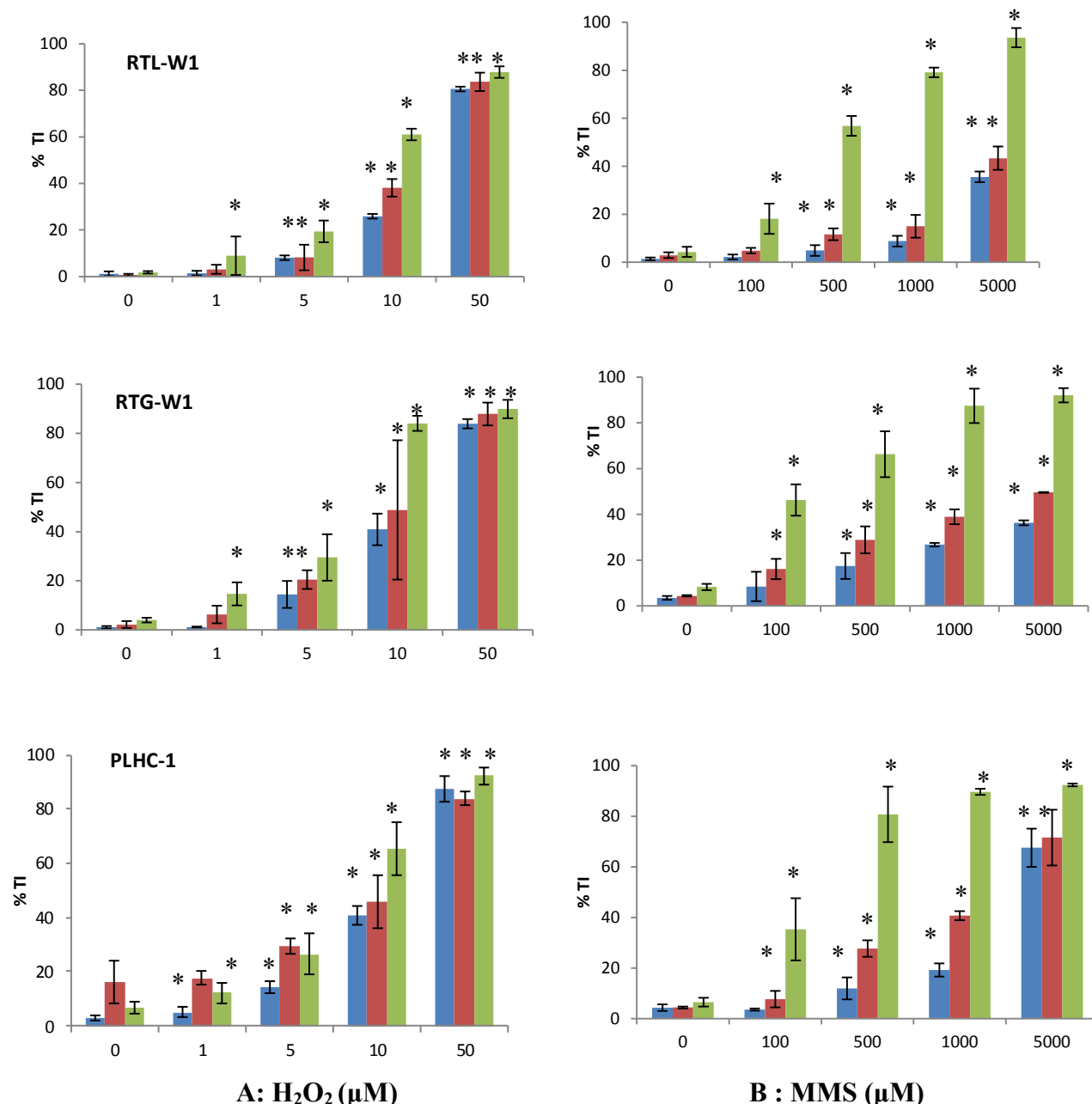


Figure 25 : Comparaison des niveaux de fragmentation lus par les essais comètes Fpg et Endo III-modifiés (%TI) après exposition des lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1 à H₂O₂ (A) et au MMS (B).

■ Sans enzyme ■ +Endo III ■ +Fpg ; moyenne ± ET de trois réplicats ; * : différence significative avec le témoin non exposé correspondant (Test U de Mann et Whitney, $p < 0,05$)

2 Mise en œuvre de l'essai des comètes Fpg-modifié avec les lignées RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1 : Publication II

Kienzler et al., 2012. *Toxicology in Vitro* 26: 500-10

Résumé : Ce travail a pour but de valider l'intérêt de l'utilisation d'un essai modifié utilisant l'enzyme Fpg avec les lignées cellulaires RTL-W1, RTG-W1 et PLHC-1, pour l'évaluation de la génotoxicité de différents types de polluants, et afin d'atteindre des seuils de mise en évidence d'un potentiel génotoxique les plus bas possibles. Par ailleurs, l'activité EROD des différentes lignées a également été mesurée comme un biomarqueur modèle de leur capacité de biotransformation respective en vue de prendre en compte ce paramètre dans la discussion sur l'intérêt de ces lignées dans l'évaluation de la génotoxicité en écotoxicologie.

Deux génotoxiques modèles ont été choisis, le méthylméthane sulfonate (MMS), agent alkylant, et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), agent oxydant, ainsi que quatre génotoxiques provenant de différentes familles de molécules fréquemment retrouvées dans l'environnement aquatique : le cadmium, le benzo[a]pyrène, le diuron et son métabolite principal, la 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA), qui est aussi décrite plus persistante et plus écotoxique que la molécule mère. Des gammes de concentration ont été testées sur des expositions courtes pour les génotoxiques modèles (15 minutes d'exposition pour le MMS, 10 min d'exposition pour H₂O₂, et sur des expositions plus longues (24h) dans le cas des génotoxiques environnementaux. Trois réplicats (expériences indépendantes) ont été réalisés pour chaque molécule testée.

Pour toutes les molécules testées, un effet génotoxique dose-dépendant a été observé chez toutes les lignées cellulaires. L'utilisation de l'enzyme Fpg, en augmentant le panel de lésions détectées, permet par ailleurs une augmentation de la sensibilité de l'essai des comètes allant de 10 à 1000 selon la lignée et selon la molécule. Une telle augmentation de sensibilité permet dans certains cas de détecter un effet génotoxique à des concentrations pertinentes du point de vue environnemental, ce qui n'est pas toujours le cas avec l'essai des comètes standard. Ainsi, l'utilisation d'un essai des comètes modifié peut partiellement compenser le manque de sensibilité de ces modèles *in vitro*, souvent cité comme étant l'une des principales limites à l'utilisation des lignées cellulaires.

Ces résultats montrent par ailleurs que lors de l'utilisation d'un essai standard, le choix de la lignée peut influencer sur les résultats obtenus : ainsi RTL-W1 ne permet pas de détecter de génotoxicité d'aucune des molécules testées dans les gammes utilisées. *A contrario*, l'utilisation d'un essai comète Fpg-modifié permet de mettre en évidence le potentiel génotoxique des molécules étudiées chez les trois lignées cellulaires, et ce en dépit des différences de capacités de biotransformation existant entre ces lignées.

Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay

Aude Kienzler, Xavier Tronchère, Alain Devaux and Sylvie Bony

Université de Lyon, UMR LEHNA 5023, USC INRA IGH, ENTPE, rue Maurice Audin, Vaulx-en-Velin F-69518, France

Abstract

In a context of growing awareness of aquatic pollution impacts, there is an increasing need to develop methods for hazards and risk assessment of pollutants. For this purpose, *in vitro* biological models such as fish cell lines warrant to be evaluated as possible alternative to *in vivo* fish testing, and new toxicity endpoints such as genotoxicity deserve to be considered. This study assesses the interest of the Formamido pyrimidine glycosylase (Fpg)-modified Comet assay applied to three fish cell lines regarding the sensitivity of the system for measuring genotoxicity of chemicals from different classes of pollutants. Cytochrome P450-dependent EROD activity has also been measured to evaluate the importance of the biotransformation capacity of the cell lines in genotoxicity assessment. For all the cell lines and all the chemicals tested, a concentration dependent genotoxic effect was observed with a 10 to 1000 fold increased sensitivity when the digestion step with Fpg was added to the standard comet assay protocol. Such an increased sensitivity led to the detection of a large array of primary DNA damages following exposure to certain group of chemicals at environmentally relevant contaminant concentrations and could partly compensate for the lower sensitivity of cell lines *versus* whole organism testing often cited as a limit of *in vitro* testing.

Keywords: Genotoxicity, Fish cell line, Comet assay, Formamido pyrimidine glycosylase.

1. Introduction

In aquatic ecotoxicology assessment, toxicity testing of chemicals and water samples on fish is increasing dreadfully both for regulatory and environmental monitoring purposes. To satisfy this demand, alternative *in vitro* models such as fish cell lines are of particular interest. They represent standardized easy-to-use systems that can be conducted in fully controlled environment, giving fast, affordable and ethically eligible results (Bols et al. 2005; Schirmer 2006; Fent 2007). The interest of fish cell lines in environmental toxicology has been reviewed and positively assessed mainly regarding cytotoxicity (Babich et Borenfreund 1991; Fent 2001; Castaño et al. 2003). Cytotoxicity is described to correlate significantly with *in vivo* acute toxicity although fish *in vivo* are often found more sensitive than cell lines (Segner 2004; Kramer et al. 2009). Besides cytotoxicity, genotoxicity is of great interest because of its relevancy in chronic exposure situation and of its possible delayed consequences at the population level (Devaux et al. 2011). In ecotoxicology, *in vitro* genotoxicity testing relies mainly on prokaryotic organisms such as in the Ames test (Ohe et al. 2004). Fish cell lines, while representing an interesting eukaryotic model retaining specific fish physiological characteristics (ectothermia, tolerance towards osmolality variation and some specific metabolic capacities) have not been often used in genotoxicity testing and deserve to be evaluated more in detail (Castaño et al. 2003). However, although very poorly documented, fish cell lines are suspected to possess low DNA repair activities (Willett et al. 2001; Bols et al. 2005), and this could influence their sensitivity in genotoxicity testing. One of the main goals in genotoxicity evaluation is to use reliable endpoints and methods as sensitive as possible since genotoxic contaminants are mostly found at very low concentrations, act often on a non-threshold basis (Ohe et al. 2004) and exhibit various modes of action leading to a large panel of lesions. Considering these criteria, primary DNA damage is admitted as a very early and universal genotoxicity endpoint (Frenzilli et al. 2009). The most versatile tool to evaluate such damage is the alkaline comet assay described as a rapid, sensitive and inexpensive method (Collins et al. 1997) that has been extensively used in ecotoxicological studies with aquatic organisms (Cotelle et Ferard 1999; Lee et Steinert 2003; Jha 2008). Among the wide variety of possible DNA lesions, those detected by the standard version of the alkaline comet assay are limited to DNA single and double-strand breaks (SSB, DSB), alkali-labile sites (ALS), DNA-DNA and DNA-protein cross-linking, and SSB associated with excision repair sites (Tice et al. 2000). One way to optimize the comet assay sensitivity is to broaden the panel of lesions detected by adding a digestion step with restriction

endonucleases that recognize one or several DNA lesions and converts unrepaired lesions to additional DNA breaks. Endonuclease III (EndoIII), formamido pyrimidine DNA glycosylase (Fpg), hOGG1, T4 endonuclease V and Alk A have been successfully used in combination with the comet assay but mostly for mechanistic purposes (Collins et al. 2001a). Fpg acts both as N-glycosylase and as AP-lyase. The N-glycosylase activity releases damaged purines from double stranded DNA, generating an apurinic site (AP site). This enzyme was originally recommended for the detection of oxidative DNA damage, in particular 8-oxo guanine (Albertini et al. 2000; Tice et al. 2000), but other damaged bases such as 8-oxo adenine, fapy-guanine, methy-fapy-guanine, fapy-adenine, aflatoxin B1-fapy-guanine, 5-hydroxy-cytosine and 5-hydroxy-uracile are also recognized. It also detects abasic site (AP sites) and ring-opened N-7 guanine adducts (Epe et al. 1993; Tchou et al. 1994; Li et al. 1997; Tudek et al. 1998). Speit et al. (2004a) confirmed the Fpg sensitivity towards alkylation damage in particular to N-7 alkylation of guanine, and Smith et al. (2006) showed that Fpg was the most sensitive enzyme towards alkylation damage when compared to Endo III and hOGG1.

The present study proposes a new approach by using a Fpg-modified comet assay in order to broaden the panel of lesions detected and to increase the sensitivity of the assay, in a context of environmental screening of pollutants, and aims at assessing the potential of three fish cell lines as a sensitive tool for genotoxicity testing when combined with such an assay. RTL-W1 and RTG-W1, two rainbow trout fish cell lines derived from liver and gill respectively, and PLHC-1 derived from a topminnow hepatocarcinoma, have been widely used for cytotoxicity assessment (Schirmer et al. 2001; Laville et al. 2004; Babín et al. 2005a; Dayeh et al. 2005; Caminada et al. 2006; Thibaut and Porte 2008; Schnell et al. 2009a). Regarding genotoxicity testing and standard comet assay, these three cell lines have already been used but to a lesser extent: genotoxicity of pure xenobiotics, and of environmental samples has been assessed with RTL-W1 (Nehls et Segner 2001; Keiter et al. 2006; Rocha et al. 2009; Boettcher et al. 2010). RTG-W1 and PLHC-1 have been used to detect genotoxicity of copper (Bopp et al. 2008) and sediment extracts (Šrut et al. 2011) respectively. However, none of those cell lines has been used with a modified comet assay so far. In our study, exposure to model genotoxicants such as methyl methane sulfonate (MMS, an alkylating agent) and hydrogen peroxide (H_2O_2 , an oxidizing agent) were first carried out to validate the protocol. Second, known or suspected genotoxicants such as cadmium (Cd), the herbicide diuron and one of its metabolite, 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA), and benzo-[a]-pyrene (B[a]P) were tested for genotoxicity comparing standard and Fpg-modified comet assays.

B[a]P is representative of compounds requiring metabolic activation to express fully their toxicity, in particular genotoxicity, through cytochrome P450-dependent activities such as the ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD) activity. Therefore, since it has been shown that the culture medium composition could influence EROD activity (Segner et al. 2000; Schirmer et al. 2004), we checked for the EROD activity level for comparing B[a]P genotoxicity assessed in the three cell lines under the applied culture conditions.

2. Materials and Methods

2.1 Cell lines

The three cell lines used were RTL-W1, a non-transformed rainbow trout liver cell line established by Lee *et al.* (1993), PLHC-1 (ATCC CRL-2406), a *Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma cell line (Hightower et Renfro 1988) and RTG-W1(ATCC CRL-2523), a non-transformed rainbow trout gill epithelium cell line (Bols et al. 1994). Cells were cultured routinely in 75 cm² culture flasks (Nunc) at 20 °C for RTG-W1 and RTL-W1 and at 30°C for PLHC-1 in Leibovitz's (L-15) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL) in CO₂ free incubators. Cells were trypsinized twice a week using 0.25% trypsin (RTL-W1 and RTG W1) or 0.025% trypsin (PLHC-1) with 0.03% EDTA. Experiments were carried out with cells aged from passage 65 to 75 for RTL-W1, 17 to 27 for RTG-W1, 162 to 175 for PLHC-1. Cells were regularly checked for the absence of mycoplasma.

2.2 Reagents and chemicals

Culture medium and all cell culture reagents were provided by Gibco® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). All chemicals used for exposure (methyl methane sulfonate (CAS number 66-27-3, 99% purity), benzo-[a]-pyrene (B[a]P, CAS number 50-32-8, 98% purity), cadmium chloride (CAS number 10108-64-2, 99% purity), diuron (CAS number 330-54-1, 98% purity), 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA, CAS number 95-76-1, 98% purity) as well as chemicals used for the comet assay, EROD activity and protein content, were supplied by Sigma Chemicals™ (St Quentin Fallavier, France). The Formamido pyrimidine glycosylase (Fpg) enzyme was purchased from New England Biolabs (Evry, France).

2.3 Exposure protocols

For exposure experiments, optimal seeding densities were previously defined: 200 000, 250 000 and 300 000 cells/mL were applied for RTL-W1, RTG-W1 and PLHC-1 respectively. For EROD activity measurement, cells were plated in black 96-well plate (Fluonunc, 100 μ L/well) 24h prior exposure, and then were exposed for 4, 8, 16 and 24 hours to B[a]P at 0, 0.001, 0.01, 0.1 and 1 μ M in complete L-15 medium using a 10 mM B[a]P stock solution prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). Two controls were performed: one with the maximum DMSO concentration used (0.01% corresponding to 1 μ M B[a]P exposure), the other without DMSO. Cell viability was evaluated using the same exposure range by the Cell Titer Blue® viability assay (Promega, France) for each cell line and was above 90% for all tested concentrations (data not shown).

For genotoxicity measurement, cells were plated 24h prior exposure in transparent 24-well plates (Nunc, 500 μ L/well). Exposure to H₂O₂ was realized for 10 min in obscurity at 4°C (in order to prevent a rapid DNA repair), and 15 min at ambient temperature for MMS, in complete L-15 medium. Exposure to other toxicants was realized for 24h in complete L-15 medium except for Cd (L-15 medium without serum, as it decreases cadmium bioavailability), using stock solutions (10 mg/L diuron and 3,4-DCA in water, 10 mM Cd in water, 10 mM B[a]P in DMSO).

Cell viability was previously checked for each molecule by the Cell Titer Blue® viability assay and was above 90% for all tested concentrations (data not shown). Following exposure, cells were washed once with PBS, trypsinized and immediately processed for the comet assay as described below.

2.4 Comet Assay procedure

The modified comet assay was performed under alkaline conditions and was based on the method proposed by Collins *et al.*, (1996). Briefly, after exposure, trypsinized cells were mixed with an equal volume of 1% low melting point agarose prepared in PBS at 37°C. Forty μ L of this mixture were spread on a frosted microscope slide pre-coated with normal agarose (0.8%), and was covered with a 22x22 mm coverslip (two gels per slide, two slides per sample). After agarose polymerization (4°C, 5min), coverslips were slid off and slides were placed in a lysis solution (2.5 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% Triton X100; pH 10) at 4°C for 1h30 in the dark. Slides were then washed three times for 5 minutes with an enzyme buffer (0.1 M KCl, 0.5 mM Na₂EDTA, 40 mM HEPES KOH, 0.2

mg/mL bovine serum albumin, pH 8.0), and then incubated 30 min with Fpg enzyme at 37°C (0.4 UI/gel) or with enzyme buffer alone to be further considered as “standard comet assay”. Slides were then washed once with cold PBS and placed in an electrophoresis tank in a 0.3 M NaOH and 1 mM Na₂EDTA solution for 40 min to allow for DNA unwinding (pH >13). Electrophoresis was carried out at 20V (0.61 V/cm) and 300 mA for 24 min. Slides were then neutralized three times for 5 min with a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5), drained, dried in absolute ethanol and stained with 25 µL of a 0.02% ethidium bromide solution. Each slide was viewed by fluorescence microscopy (Axioskop 40, ZeissLtd.). Image analysis was performed with the Comet 4.0 software (Perceptive Instruments Ltd). For each concentration, % tail intensity (% DNA in comet tail) of 100 randomly selected cells was scored per sample.

2.5 EROD activity measurement

After each exposure time to B[a]P, medium was removed and replaced by 100 µL of complete L-15 culture medium containing 2 µM of 7-ethoxyresorufin. Resorufin production was recorded after 15 min in a microplate fluorimeter (Fluostar Optima BMG Labteck, France) at 538 and 590 nm excitation and emission wavelengths, respectively, along with a resorufin standard made in complete L-15 medium. Total protein content was determined with the fluorescamine assay (Lorenzen et Kennedy 1993), using bovine serum albumin (BSA) as a standard: cells were washed twice with cold PBS and frozen 45 min at -80°C. After defrosting at room temperature, 100 µL of PBS and 50 µL of a fluorescamine solution (0.3 mg/mL in acetone) were added to each well. After 10 min incubation in the dark, fluorescence was recorded at 390 and 460 nm excitation and emission wavelengths, respectively. EROD activity was expressed in picomoles of resorufin per minute and per milligram of protein (pmol /min/mg protein).

2.6 Statistical analysis

For the comet assay, results are expressed as the mean and standard deviation of % tail intensity values of at least three independent experiments. For statistical analysis, data were analyzed with the Kruskal-Wallis test (Statistica©-StatSoft, Inc.). Non-parametric Mann-Whitney test was performed to identify groups that differed significantly from control.

For EROD activity measurement, data were plotted as the mean ± standard error of the mean of three independent experiments (each consisting of six culture wells per treatment). For the different cell lines, and for each exposure time, data were examined by a one-way

analysis of variance (ANOVA), followed by a Newman-Keuls test. If two or more consecutive concentrations were statistically significantly higher than the EROD activity for the two lowest concentrations, we conclude that there was an EROD induction for this time of exposure.

3. Results

3.1 Response to model genotoxicants: Methyl Methane Sulfonate and H₂O₂

The basal DNA damage in the three cell lines was first assessed using both Comet assay procedures without and with Fpg (Figure 1).

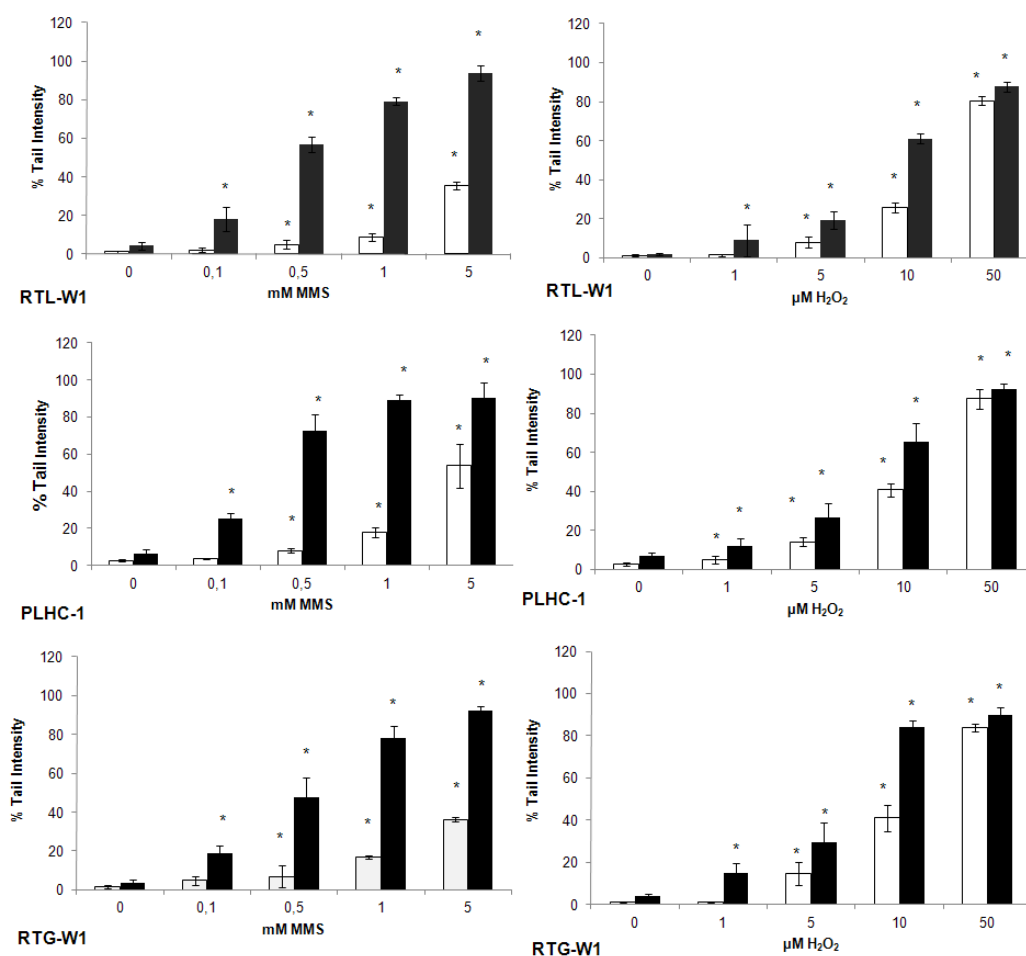


Figure 1: Comparison of classical (without enzyme, □) and Fpg-modified (■) comet assay on fish cell lines RTL-W1, PLHC-1, and RTG-W1 after exposure to MMS and H₂O₂.

Results are mean \pm SD of three independent experiments. *: statistically significant difference compared to control with or without enzyme (Kruskal Wallis ANOVA and Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

When using Fpg, the basal DNA damage slightly increased when compared to the classical version of the assay (about a two to three fold increase) but remained low for the three cell lines (<10% tail intensity). Data variability among replicate experiments slightly increased when using Fpg, especially with the PLHC-1 cell line. Moreover, basal DNA damage was higher in PLHC-1 than in RTL-W1 and RTG-W1, both without or with the use of Fpg.

After exposure to MMS or H₂O₂, all cell lines showed a statistically significant increase in DNA damage following a concentration dependent manner for both protocols (Figure 1). This resulted in a lower first significant genotoxic concentration when using the Fpg digestion step compared to the standard comet assay except for PLHC-1 exposed to H₂O₂.

3.2 Response to environmental pollutants : Cd, diuron, 3,4-DCA

With the standard comet assay protocol, no genotoxic effect of cadmium was detected in RTL-W1, at any of the concentration tested, while a significant genotoxic effect was shown after exposure to the lowest concentration tested 0.1 µM in PLHC-1 (6.71% tail intensity) and to 1 µM in RTG-W1 (1.46 % tail intensity) respectively (Figure 2). When using the Fpg-digestion step, cadmium genotoxicity was finally detected in RTL-W1 at 1 µM leading to 7.4 % tail intensity and the detection limit was decreased to 0.1 µM in PLHC-1 (10.06 % tail intensity).

As for cadmium, with RTL-W1, the use of Fpg allowed revealing a genotoxic effect for diuron and 3,4-DCA, whereas the classical comet assay protocol did not even at the highest tested concentrations (Figure 3). With PLHC-1 and RTG-W1, genotoxicity of diuron was detected without enzyme but only at high concentrations, whereas when adding Fpg, genotoxicity was found to be significantly different from control cells at 0.1 µg/L. 3,4-DCA, a major metabolite of diuron, also exhibited genotoxicity towards RTG-W1 and PLHC-1 without enzyme at 10 and 1 µg/L respectively, whereas with the enzymatic digestion step, genotoxicity was demonstrated at concentrations ten times lower.

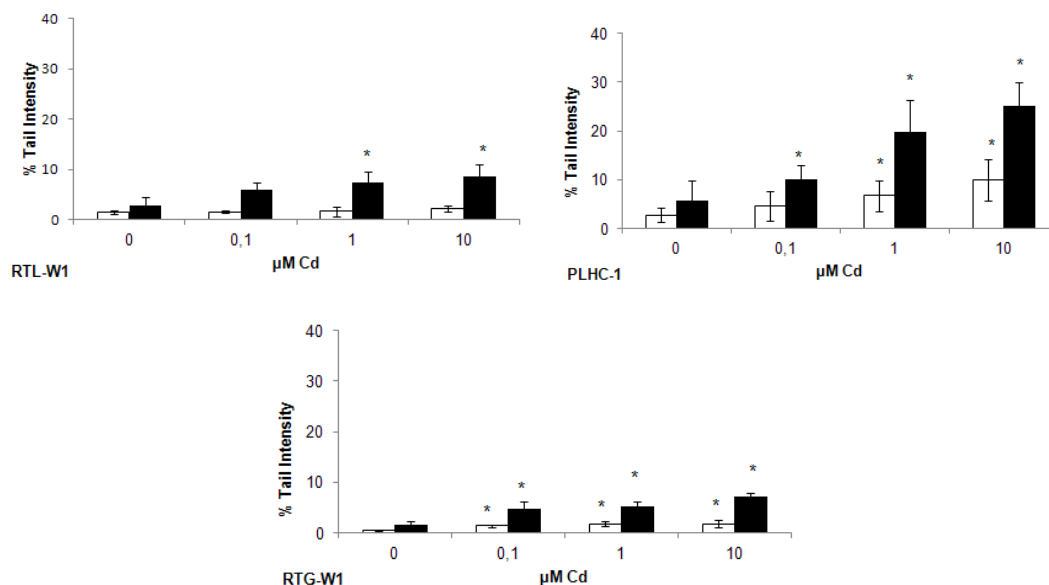


Figure 2: Comparison of level of DNA damage induced by cadmium on fish cell lines RTL-W1, PLHC-1, RTG-W1, after 24h of exposure when applying classical (□) and Fpg-modified (■) comet assay. Results are mean ± SD of three independent experiments. *: statistically significant difference compared to control with or without enzyme (Kruskall Wallis ANOVA and Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

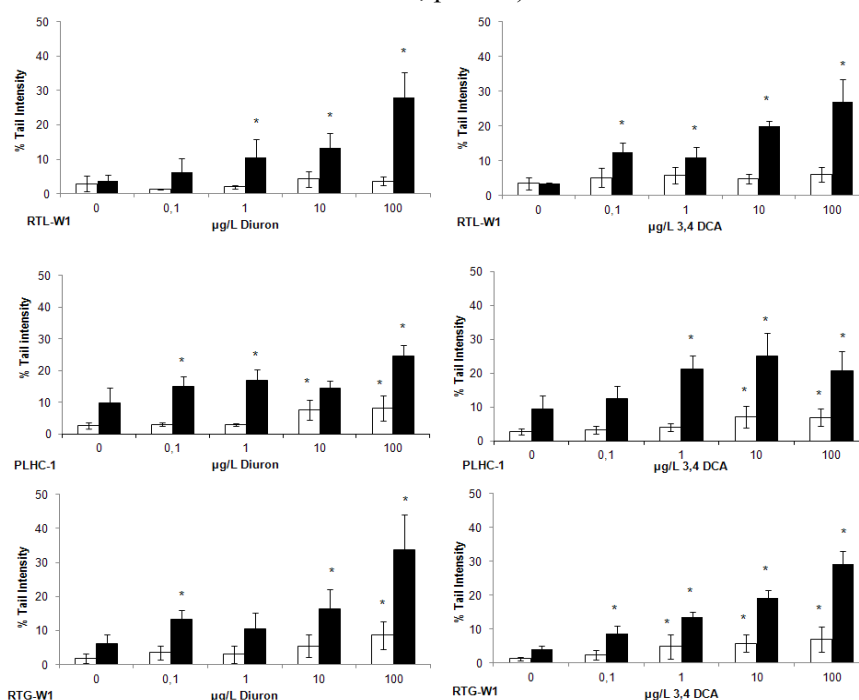


Figure 3: Comparison of level of DNA damage induced by diuron and its metabolite 3,4-DCA on fish cell lines RTL-W1, PLHC-1, RTG-W1, after 24h of exposure when applying classical (□) and Fpg-modified (■) comet assay. Results are mean ± SD of three independent experiments. *: statistically significant difference compared to control with or without enzyme (Kruskall Wallis ANOVA and Mann-Whitney U test, $p < 0.05$).

When both versions of the Comet assay (without and with enzyme) allowed detecting a first significant genotoxicity concentration, the increase in sensitivity of the modified comet assay was calculated as the ratio between the concentration of the first significant effect without enzyme and the concentration of the first significant effect with Fpg. Table 1 shows that this ratio ranges from 1 to 1000 according to the cell line and the concentration of the pollutant tested.

Concentration of the first significant genotoxic effect		RTG-W1	RTL-W1	PLHC-1
Cd (μM)	Without enzyme	0.1	NS	1
	Fpg	0.1	1	0.1
	Sensitivity factor	1	$+\infty$	10
Diuron ($\mu\text{g/L}$)	Without enzyme	100	NS	10
	Fpg	0.1	1	0.1
	Sensitivity factor	1000	$+\infty$	100
3-4 DCA ($\mu\text{g/L}$)	Without enzyme	1	NS	10
	Fpg	0.1	0.1	1
	Sensitivity factor	10	$+\infty$	10

Table 1: Sensitivity factor (concentration of the first significant effect without Fpg/concentration of the first significant effect with Fpg) depending on the pollutants tested for the three cell lines.

NS: No significant genotoxic effect; $+\infty$: sensitivity factor when genotoxicity was detected with the Fpg assay only.

3.3 Response to B[a]P as a model genotoxicant requesting metabolism

3.3.1 EROD activity in the three fish cell lines after B[a]P exposure in L-15 medium

All cell lines showed an increase in EROD activity when exposed to B[a]P. Patterns of EROD induction by B[a]P varied according to exposure duration (Figure 4, Table 2). RTG-W1 showed a weak induction, statistically significant after 8h of exposure (4.49 pmoles/min/mg protein EROD activity). Maximum activity was reached after 16 and 24 hours at 0.5 μM B[a]P for PLHC-1 (7.96 and 7.87 pmoles/min/mg protein, respectively) and RTL-W1, (43.37 and 39.56 pmoles/min/mg protein, respectively). RTL-W1 showed the highest maximum EROD activity, followed by PLHC-1 and RTG-W1; but when regarding the induction factor (ratio maximum EROD activity *versus* basal EROD activity), PLHC-1 appeared to be the most inducible one, followed by RTL-W1 and RTG-W1 (Table 3).

Exposure time	RTG-W1		PLHC-1		RTL-W1	
	Basal EROD activity	Maximum EROD activity	Basal EROD activity	Maximum EROD activity	Basal EROD activity	Maximum EROD activity
4h	0.30 ±0.11	0.82 ±0.32	0.55 ±0.88	2.7* ±1.09	1.33 ±0.60	5.89* ±1.87
8h	0.83 ±0.34	4.49* ±0.98	0.36 ±0.63	5.99* ±1.46	1.62 ±0.48	11.28* ±3.53
16h	1.12 ±0.47	2.96 ±1.02	0.44 ±0.62	7.96* ±2.18	3.61 ±1.54	43.37* ±10.41
24h	1.12 ±0.79	3.90 ±0.63	0.45 ±0.71	7.87* ±2.58	3.88 ±3.18	39.56* ±4.65

Table 2: Basal and maximum EROD activity (pmoles/min/mg protein) following BaP exposure at various time in RTL-W1, RTG-W1 and PLHC-1.

*: statistical significant difference from the control (non exposed cells) (ANOVA, Newman and Keuls test, p<0.05)

	RTG-W1	PLHC-1	RTL-W1
4h	2.7	4.9	4.4
8h	5.4	16.6	6.7
16h	2.6	18.1	12
24h	3.5	17.5	10.2

Table 3: EROD induction factor after exposure of the three cell lines RTG-W1, PLHC-1, RTL-W1 to B[a]P.

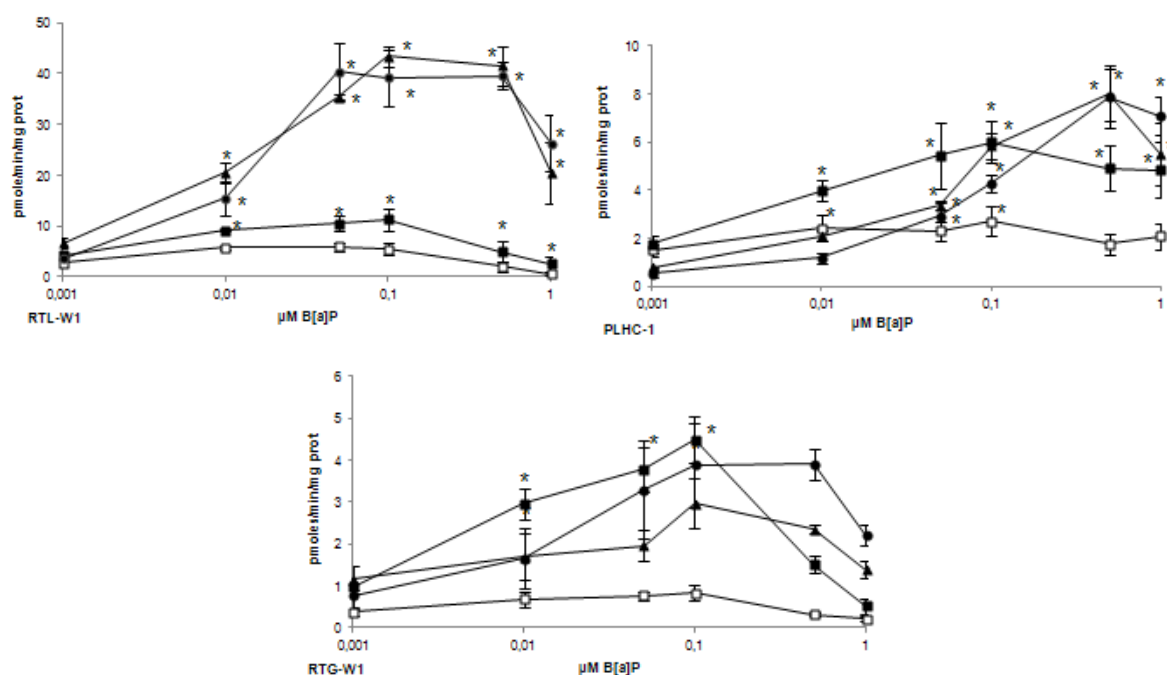


Figure 4: EROD activity in RTL-W1 cells, PLHC-1 and RTG-W1 cells exposed to BaP.

Each data point represents the mean of six culture wells ± SEM of three independent experiments. B[a]P time exposure: □ 4h ■ 8h ▲ 16h ● 24h *: statistically significant difference from the control (ANOVA, Newman and Keuls test, p<0.05).

3.3.2 Response to B[a]P

After B[a]P exposure, genotoxicity was detected only in the RTL-W1 (10 μ M) and the PLHC-1 cell lines (1 μ M) when applying the classical comet assay (Figure 5). With the use of Fpg, a significant genotoxic effect was observed for B[a]P concentrations as low as 0.5, 1 and 0.1 μ M in the RTL-W1, PLHC-1 and RTG-W1 cell lines respectively.

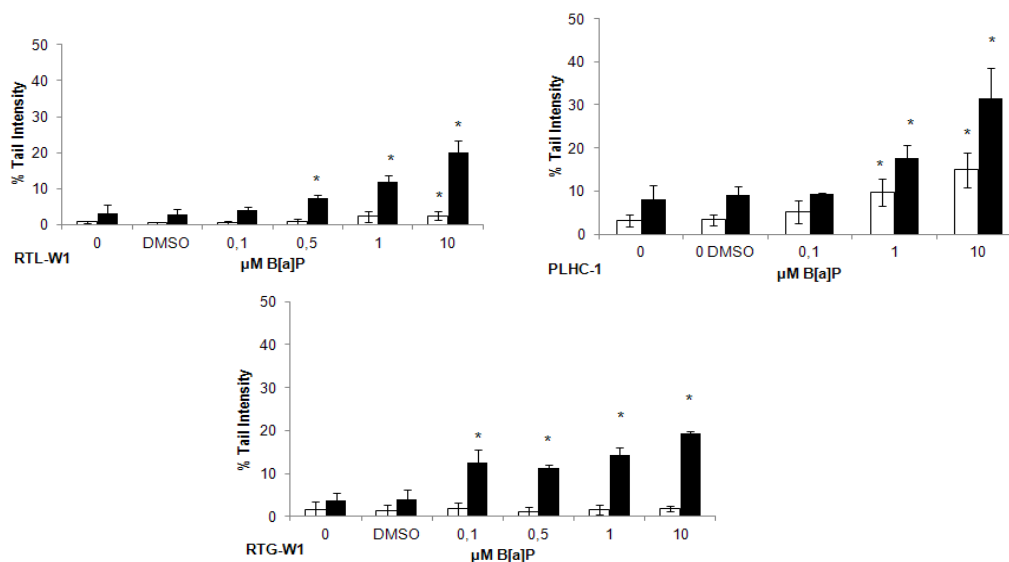


Figure 5: Comparison of level of DNA damage induced by B[a]P on fish cell lines RTL-W1, PLHC-1, RTG-W1, after 24h of exposure when applying classical (□) and Fpg-modified (■) comet assay.

Results are mean \pm SD of three independent experiments. *: statistically significant difference compared to control with or without enzyme (Kruskal Wallis ANOVA and Mann-Whitney U test, $p < 0.05$)

4. Discussion

The aim of this study was to assess the aptness of three fish cell lines widely used in ecotoxicological studies to detect primary DNA damage through the comet assay and to evaluate the benefit of applying an endonuclease-modified procedure, in order to optimize the assay sensitivity, enabling the detection of a larger array of DNA lesions. A prerequisite to achieve a high sensitivity in comet assay is to start with a low basal damage level in unexposed cells. Basal DNA damage can be highly variable and is influenced by cell type, cell cycle and culture conditions. The number of alkali labile sites, excision repair activity and anti-oxidant defenses can also influence the basal level (Lee et Steinert 2003). Finally, the use of a digestion step with a glycosylase such as Fpg, often reveal additional endogenous DNA lesions (Collins et al. 1996). Here, although showing a two-fold increase statistically different when compared to the standard version of the assay the basal DNA damage levels

remained low in all cases with the Fpg modified protocol (max. 7% tail intensity value in PLHC-1) thus validating the use of such a procedure.

After exposure to increasing concentrations of the model genotoxicants MMS and H₂O₂, cell lines exhibit a significant concentration dependent increase in DNA damage. Moreover, in all cases, except for PLHC-1 when exposed to H₂O₂, the use of the Fpg allows the detection of an earlier significant genotoxic effect compared to the standard assay (i.e at a lower genotoxicant concentration). Although H₂O₂ can cause a wide range of DNA damage, oxidized bases are among the most frequent lesions induced and thus the appearance of Fpg-sensitive sites here observed was expected. MMS, as a S_N2-type alkylating agent, mainly induces N7-methyl adducts in guanine and in adenine to a lesser extend (Drabløs et al. 2004). The present results confirm the sensitivity of Fpg towards N7-guanine alkylation as previously shown by Smith et al. ((2006) and Speit et al., (2004a). As described by Lacoste et al. (2006), N7-methyl guanine adducts unstable in alkaline condition, can lead to ring opened N7methyl fapy guanine during the lysis step (pH 10) and becomes subsequently a Fpg-sensitive lesion. The sensitivity of the Fpg toward N7-purine adducts is extremely relevant in a context of accurate detection of environmental genotoxicity since alkylating compounds are thought to be among the most potent and abundant genotoxic contaminants in aquatic ecosystems (Kuehl et al. 1994). One can notice that the difference between tail intensity with and without Fpg was higher after exposure to MMS than to H₂O₂. This could partly be related to the slow repair kinetics of MMS damages leading to less incomplete repaired sites detected by the standard version of the assay than with H₂O₂. Indeed repair kinetics of N- and O-alkylations is known to be a slower mechanism than that of oxyradical based lesions that are usually quickly repaired (Collins et al. 1995; Gates et al. 2004; Collins et Gaivão 2007). Recently, (Chao et al. 2009) confirmed this difference *in vivo* in mosquito fish.

When applying both assays to various environmental pollutants, the use of a digestion step with Fpg almost always lowered the detection limit of the genotoxic effect compared to the standard assay. This resulted in an increase in sensitivity of the method ranging from ten to thousand (sensitivity factor as calculated in table 2) for the RTG-W1 and PLHC-1 cell lines, depending on the chemical. With RTL-W1, the Fpg-modified comet assay allows detecting genotoxicity when the standard assay did not at any of the concentration tested for cadmium, diuron and 3,4-DCA.

Cadmium is a known carcinogen but is weakly genotoxic. It modulates gene expression and reduces the antioxidant activity of proteins involved in cell defense (Bertin et Averbeck

2006). Indirect effects of Cd elicit as well the generation of reactive oxygen species (ROS), which partially trigger Cd genotoxicity (Risso-de Faverney et al. 2001). Thus, oxidative stress could explain the increase in sensitivity obtained with the use of Fpg after Cd exposure. Since Cd concentrations in French surface water have been shown to reach up to 0.26 μM (Lacaze et al.) the use of the Fpg modified comet assay allows the detection of genotoxicity at environmentally relevant concentrations, which would not be possible with the standard version of the assay carried out in the three fish cell lines used.

The genotoxic potential of diuron remains only suspected (Giacomazzi et Cochet 2004), although it has shown some genotoxicity via the Mutatox® test (Canna-Michaelidou et Nicolaou 1996), the micronucleus test in mice bone marrow cells (Agrawal et al. 1996), and the metabolic activated Ames assay (Seiler 1979). The mechanism of diuron genotoxicity remains to be elucidated but, as for Cd, it can trigger oxidative stress in aquatic species, thus producing ROS responsible for further primary DNA damage and leading to Fpg-sensitive sites (Bouilly et al. 2007; Fatima et al. 2007). Our results confirm the genotoxic potential of diuron using the standard comet assay in two of the three cell lines used but at the rather high concentrations of 10 and 100 $\mu\text{g/L}$ for RTG-W1 and PLHC-1 respectively. With the Fpg-modified comet assay, genotoxicity can be measured in all cell lines and in the concentration range of 0.1-1 $\mu\text{g/L}$, which interestingly is environmentally relevant. As an example, diuron was shown to be one of the major contaminant in the French stream Morcille, located in a vineyard watershed, in which a total concentration of pesticides of 0.2 to 5.4 $\mu\text{g/L}$ has been measured (Rabiet et al. 2007).

3,4-DCA is the main metabolite of diuron (Giacomazzi et Cochet 2004), and is more ecotoxic than the parent compound (Tixier et al. 2001). It is also more persistent, which makes it particularly bothersome for the aquatic environment. 3,4-DCA has been shown to be genotoxic on *Chironomus riparius*, and *Vibrio fischeri*, but not yet in fish (Osano et al. 2002). Moreover, other aniline or chloroaniline compounds are known to be genotoxic (Sekihashi et al. 2002; Robbiano et al. 2006). 3,4-DCA has already been suspected to induce oxidative stress in crucian carp through free radical generation and antioxidant depletion (Li et al. 2003). This could, here again, explain the increase in sensitivity achieved when using the Fpg-modified comet assay. 3,4-DCA has been found in concentrations ranging from 0.30 to 2.1 $\mu\text{g/L}$ in surface waters in Germany and Netherlands (Hendricks et al. 1994; TOXNET 2003), and up to 8.9 $\mu\text{g/L}$ in the U.S (Primel et al. 2007), thus above the detection threshold of the Fpg-modified comet assay here observed (0.1 or 1 $\mu\text{g/L}$ depending on the cell line).

The choice of the cell model is a critical point in *in vitro* genotoxicity assessment of chemicals (Nehls et Segner 2001), in particular because the response towards genotoxic substances requesting metabolic activation relies on cell biotransformation competences. Thus, for a given cell line, it seems important to check for this point previously to genotoxicity study, and in particular, to evaluate some indicators of the biotransformation status in the experimental conditions applied. As an example, medium composition and exposure duration are parameters known to interfere with the level of enzymatic induction (Segner et al. 2000). In this line, we showed that in our culture conditions, RTG-W1 can express low but measurable EROD activity after exposure to benzo[a]pyrene. Although literature does not report any CYP450 1A in this cell line, our results are consistent with those of Leguen et al., (2000), who found an inducible EROD activity in primary trout gill cells. We also found that maximal EROD activity in PLHC-1 was lower than reported previously by Smeets et al., (1999). This might be due to culture conditions (L-15 medium instead of DMEM and 5% CO₂ atmosphere usually used for this cell line), as well as the EROD measurement protocol and equipment sensitivity. Though, our conditions allowed normal growth of the cell line, with a doubling time around 28h (data not shown), close to the 22h obtained by (Hestermann et al. 2002) and did not induced additional oxidative stress, as demonstrated by the low basal DNA damage even in the Fpg modified assay. Moreover, DNA damage levels following B[a]P exposure detected with the standard version of the assay in PLHC-1 in our study are in the same range as those obtained for similar exposure conditions but in the DMEM medium (Šrut et al. 2011). B[a]P genotoxicity goes mainly through the formation of the highly reactive B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide which forms stable DNA adducts faintly detected by the comet assay. However, other B[a]P metabolism pathways also catalyzed by CYP1A, such as the one-electron activation pathway, can lead to the formation of multiple unstable covalent adducts (Preston et al. 2010), spontaneously depurinated to form abasic sites. This could explain the amount of DNA damage detected without Fpg in PLHC-1, and to a lesser extent in RTL-W1. Despite a high EROD activity, RTL-W1 fails to detect genotoxicity below 10μM B[a]P with the standard comet assay. This can stem from efficient protective mechanisms such as rapid GSH metabolite conjugation and/or high DNA repair capacities (Smolarek et al. 1987). By adding a Fpg digestion step, B[a]P genotoxicity can be measured with a higher sensitivity in all cell lines, mainly in RTG-W1, in spite of weak biotransformation capacities. The increased sensitivity observed with the Fpg-modified comet assay after B[a]P exposure could be related to the O-quinones pathway and subsequent

production of ROS (Penning 1993; Flowers et al. 1996). Concentrations of B[a]P in rivers are estimated around 4 to 40 pM (TOXNET 2010). In the present work, the lowest B[a]P genotoxic concentration detected with Fpg-modified comet assay is 0.1 μ M, which is therefore higher than average environmental concentration. However, environmental PAH contamination often regards complex mixture of congeners whose global genotoxic potency could be revealed by the use of such a Fpg modified protocol.

One could not totally exclude that differences in sensitivity observed between PLHC-1 and the two rainbow trout cell lines, particularly regarding basal DNA damage level, genotoxic response to B[a]P and induced EROD activity, might be influenced by the cancerous nature of PLHC-1 nor by the difference in cells passage. Although no information regarding this point for PLHC-1 is available, numerous studies in mammalian cancerous cell lines reported modified cell cycle, reduced DNA repair capacities and pathway-specific differences compared to non cancerous ones (Windhorfer et al., 2008). Its difficult to compare the sensitivity of the cells on the basis of cell passage with reliability because of uncertainty in the actual passage number of the cell line, as ATCC does not necessarily mention the passage number of the cell line sold, and as there is an uncertainty concerning the passage of cell line provided by other laboratory. Moreover, cell lines are often criticized for their lack of sensitivity compared to whole organisms, especially when measuring cytotoxicity and acute toxicity (Kramer et al. 2009). Thus, we might wonder if this should be extrapolated to genotoxicity. Regarding genotoxicity, direct comparison of data between cell lines and *in-vivo* models is poorly documented. Using a standard comet assay protocol, a significant correlation was found between genotoxicity assessment of sediment extracts applied to the RTL-W1 cell line and to the zebrafish embryo model respectively. The latter is another interesting alternative system to *in vivo* genotoxicity testing particularly regarding whole sediment toxicity evaluation (Kosmehl et al. 2008). Concerning the molecules tested in the present work, one can attempt an indirect comparison with results obtained *in vivo* in other studies. Thus, regarding diuron, *in vivo* exposure of zebrafish to 1-2 μ g/L leads to a significant increase in micronucleus frequency in erythrocytes after 14 days, as well as to a significant increase in primary DNA damage in liver cells and spermatozoa through the comet assay (Bony et al. 2008; Bony et al. 2010). Interestingly, the present study show that diuron exposure of fish cell lines combined with the Fpg modified comet assay allows detecting genotoxicity in the same concentration range as *in vivo* testing. This is also the case for Cd and B[a]P. Hence, genotoxic effects are detected here from 0.1 μ M for Cd and from 0.1 μ M

to 1 μM for B[a]P depending on the cell line. *In vivo*, Cd has been shown to induce micronuclei in blood cells at 0.89 μM , and at 8.89 μM in gill and fin cells of crucian carp (Arkhipchuk et Garanko 2005). In the same way, exposure of juvenile sea bass to 0.1 μM B[a]P resulted in significant increase in micronuclei and nuclear abnormalities (Gravato et Santos 2003a).

To conclude, the present study shows that all the three common and easy to handle fish cell lines RTG-W1, RTL-W1 and PLHC-1 can be used for accurate genotoxicity testing by the mean of the Fpg-modified version of the comet assay. When using a standard comet assay, the choice of the cell line can influence the result since for example RTL-W1 does not allow genotoxicity for any of the compounds studied. On the contrary, when using the Fpg-modified assay this study shows that all the three cell lines (despite differences in metabolic capacities) allow detecting the genotoxic potential of the studied contaminants within the same threshold value range. However, it is difficult at that stage, to prioritize the use of one of them. The use of a wide spectrum enzymatic digestion step does not interfere with the low DNA damage basal level and increased significantly the threshold of primary DNA damage induced by various classes of environmental aquatic pollutants which genotoxicity mechanisms go through oxidative stress or SN-2 alkylation. Therefore, the association of the Fpg-modified comet assay with fish cell lines could be applicable in the domain of the assessment of the genotoxicity burden of new compounds of concern (pharmaceuticals, personal care products, pesticides, nanoparticles...) with such mode of action commonly found at low concentration in complex matrices (surface waters, sediment extracts, urban and industrial effluents for example). Moreover, we should remind that in this work, all experiments were realized at non-significant cytotoxic concentrations. Since *in vitro* cytotoxicity endpoints have been proposed as *in vivo* acute toxicity alternative systems (Schirmer, 2006), our results stress that in some cases, genotoxicity endpoints can alert much earlier than acute toxicity endpoints on an environmental threat. Consequently as previously stressed by some authors (Castaño et al. 2000), genotoxicity deserves to be considered further in toxicity test series used in ecotoxicological assessment and fish cell lines represent promising biological devices for that purpose.

Acknowledgments

The research was funded via the National School of Public Works (AK PhD grant N° 2009-056). The authors deeply acknowledge Dr. L.E.J. Lee and Dr. N.C. Bols (University Wilfrid Laurier, Waterloo, Canada) for their kind authorization of holding the RTL-W1 cell lines for

research purposes, Charlotte Mucig for her skillful help during preliminary experiments and Pedro Marote (UMR 5180, University of Lyon, France) for preparation of diuron and 3,4 DCA solutions .

References

- Agrawal, R.C., Kumar, S., Mehrotra, N.K., 1996. Micronucleus induction by diuron in mouse bone marrow. *Toxicology Letters* 89, 1-4.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E.G., Tice, R., Waters, M.D., Aitio, A., 2000. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 463, 111-172.
- Arkhipchuk, V.V., Garanko, N.N., 2005. Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells. *Ecotoxicology and environmental safety* 62, 42-52.
- Babich, H., Borenfreund, E., 1991. Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: A review. *Toxicology in Vitro* 5, 91-100.
- Babín, M., Boleas, S., Tarazona, J.V., 2005. In vitro toxicity of antimicrobials on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 20, 125-134.
- Bertin, G., Averbek, D., 2006. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88, 1549-1559.
- Boettcher, M., Grund, S., Keiter, S., Kosmehl, T., Reifferscheid, G., Seitz, N., Rocha, P.S., Hollert, H., Braunbeck, T., 2010. Comparison of in vitro and in situ genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 700, 11-17.
- Bols, N.C., Barlian, A., Chirino-Trejo, M., Caldwell, S.J., Goegan, P., Lee, L.E.J., 1994. Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *Journal of Fish Diseases* 17, 601-611.
- Bols, N.C., Dayeh, V.R., Lee, L.E.J., Schrimmer, K., 2005. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochemistry and Molecular Biology of fishes* 6, 43-84.
- Bony, S., Gaillard, I., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 90, 421-428.
- Bony, S., Gillet, C., Bouchez, A., Margoum, C., Devaux, A., 2008. Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquatic Toxicology* 89, 197-203.
- Bopp, S.K., Abicht, H.K., Knauer, K., 2008. Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquatic Toxicology* 86, 197-204.
- Bouilly, K., Bonnard, M., Gagnaire, B., Renault, T., Lapègue, S., 2007. Impact of Diuron on Aneuploidy and Hemocyte Parameters in Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 52, 58-63.
- Caminada, D., Escher, C., Fent, K., 2006. Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: Comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquatic Toxicology* 79, 114-123.
- Canna-Michaelidou, S., Nicolaou, A.-S., 1996. Evaluation of the genotoxicity potential (by Mutatox(TM) test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus. *Science of The Total Environment* 193, 27-35.

- Castaño, A., Bols, N., Braunbeck, T., Dierickx, P., Halder, M., Isomaa, B., 2003. The use of fish cells in ecotoxicology - The report and recommendations of ECVAM Workshop 47. ATLA. Alternatives to laboratory animals 31, 317-351.
- Castaño, A., Sanchez, P., Llorente, M.T., Carballo, M., de la Torre, A., Muñoz, M.J., 2000. The use of alternative systems for the ecotoxicological screening of complex mixtures on fish populations. Science of The Total Environment 247, 337-348.
- Chao, M.-R., Chang, Y.-Z., Wong, R.-H., Hu, C.-W., 2009. Time course evaluation of N-nitrosodialkylamines-induced DNA alkylation and oxidation in liver of mosquito fish. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 660, 33-39.
- Collins, A.R., Dobson, V.L., Dusinska, M., Kennedy, G., Stetina, R., 1997. The comet assay: What can it really tell us? Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis 375, 183-193.
- Collins, A.R., Dusinska, M., Gedik, C.M., Stetina, R., 1996. Oxidative DNA damage to DNA: do we have a reliable biomarker? Environ. Health Perspect., 465-469
- Collins, A.R., Dusinska, M., Horska, A., 2001. Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. Acta Biochim. Pol. 48, 611-614.
- Collins, A.R., Gaivao, I., 2007. DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. Molecular Aspects of Medicine 28, 307-322.
- Collins, A.R., Ma, A.-g., Duthie, S.J., 1995. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. Mutation Research, 69-77.
- Cotelle, S., Ferard, J.F., 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. Environmental and Molecular Mutagenesis 34, 246-255.
- Dayeh, V.R., Lynn, D.H., Bols, N.C., 2005. Cytotoxicity of metals common in mining effluent to rainbow trout cell lines and to the ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*. Toxicology in Vitro 19, 399-410.
- Devaux, A., Fiat, L., Gillet, C., Bony, S., 2011. Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). Aquatic Toxicology 101, 405-411.
- Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbø, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Peña-Díaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., Krokan, H.E., 2004. Alkylation damage in DNA and RNA - repair mechanisms and medical significance. DNA Repair 3, 1389-1407.
- Epe, B., Pflaum, M., Häring, M., Hegler, J., Rüdiger, H., 1993. Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. Toxicology Letters 67, 57-72.
- Fatima, M., Mandiki, S.N.M., Douxfils, J., Silvestre, F., Coppe, P., Kestemont, P., 2007. Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune-endocrine interactions in goldfish: Immune and antioxidant effects. Aquatic Toxicology 81, 159-167.
- Fent, 2007. Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology. ALTEX 24, 26-28.
- Fent, K., 2001. Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. Toxicology in Vitro 15, 477-488.
- Flowers, L., Bleczynski, W.F., Burczynski, M.E., Harvey, R.G., Penning, T.M., 1996. Disposition and Biological Activity of Benzo[a]pyrene-7,8-dione. A Genotoxic Metabolite Generated by Dihydrodiol Dehydrogenase. Biochemistry 35, 13664-13672.
- Frenzilli, G., Nigro, M., Lyons, B.P., 2009. The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. Mutation Research/Reviews in Mutation Research 681, 80-92.
- Gates, K.S., Nooner, T., Dutta, S., 2004. Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. Chemical Research in Toxicology 17, 839-856.

- Giacomazzi, S., Cochet, N., 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56, 1021-1032.
- Gravato, C., Santos, M.A., 2003. Genotoxicity biomarkers'association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L. *Ecotoxicology and environmental safety* 55, 352-358.
- Hendricks, A.J., Maas-Diepeveen, J.L., Noordsij, A., van der Gaag, M.A., 1994. Monitoring response of XAD-concentrated water in the Rhine delta: a major part of the toxic compounds remains unidentified. *Water Research* 28, 581-598.
- Hestermann, E.V., Stegeman, J.J., Hahn, M.E., 2002. Serum withdrawal leads to reduced aryl hydrocarbon receptor expression and loss of cytochrome P4501A inducibility in PLHC-1 cells. *Biochemical Pharmacology* 63, 1405-1414.
- Hightower, L.E., Renfro, J.L., 1988. Recent applications of fish cell culture to biomedical research. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, pp. 290-302.
- Jha, A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* 23, 207-221.
- Keiter, S., Rastall, A., Kosmehl, T., Wurm, K., Erdinger, L., Braunbeck, T., Henner, H., 2006. Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the upper Danube river. A pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. *Environ Sci Pollut Res Int* 13, 308-319.
- Kosmehl, T., Hallare, A.V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2008. DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 650, 1-14.
- Kramer, N.I., Hermens, J.L.M., Schirmer, K., 2009. The influence of modes of action and physicochemical properties of chemicals on the correlation between in vitro and acute fish toxicity data. *Toxicology in Vitro* 23, 1372-1379.
- Kuehl, D.W., Serrano, J., Naumann, S., 1994. Identification of potentially mutagenic contaminants in the aquatic environment by liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric characterization of in vitro DNA adducts. *Journal of Chromatography A* 684, 113-119.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O., 2011. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution* 159, 1682-1691.
- Lacoste, S., Castonguay, A., Drouin, R., 2006. Formamidopyrimidine adducts are detected using the comet assay in human cells treated with reactive metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600, 138-149.
- Laville, N., Aït-Aïssa, S., Gomez, E., Casellas, C., Porcher, J.M., 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* 196, 41-55.
- Lee, L.E.J., Clemons, J.H., Bechtel, D.G., Caldwell, S.J., Han, K.-B., Pasitschniak-Arts, M., Mosser, D.D., Bols, N.C., 1993. Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biology and Toxicology* 9, 279-294.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 544, 43-64
- Leguen, I., Carlsson, C., Perdu-Durand, E., Prunet, P., Pärt, P., Cravedi, J.P., 2000. Xenobiotic and steroid biotransformation activities in rainbow trout gill epithelial cells in culture. *Aquatic Toxicology* 48, 165-176.

Li, Q., Laval, J., Ludlum, D.B., 1997. Fpg protein releases a ring-opened N-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard. *Carcinogenesis* 18, 1035-1038.

Li, W.-m., Yin, D.-q., Zhou, Y., Hu, S.-q., Wang, L.-s., 2003. 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and environmental safety* 56, 251-255.

Lorenzen, A., Kennedy, S.W., 1993. A Fluorescence-Based Protein Assay for Use with a Microplate Reader. *Analytical biochemistry* 214, 346-348.

Nehls, S., Segner, H., 2001. Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay. *Environmental Toxicology* 16, 321-329.

Ohe, T., Watanabe, T., Wakabayashi, K., 2004. Mutagens in surface waters: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* 567, 109-149.

Osano, O., Admiraal, W., Klamer, H.J.C., Pastor, D., Bleeker, E.A.J., 2002. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution* 119, 195-202.

Penning, T.M., 1993. Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chemico-Biological Interactions* 89, 1-34.

Preston, R.J., Ross, J.A., Charlene, A.M., 2010. DNA-Reactive Agents, *Comprehensive Toxicology*. Elsevier, Oxford, pp. 349-360.

Primel, E.G., Zanella, R., Kurz, M.H.S., Goncalves, F.F., Martins, M.L., Machado, S.L.O., Marchesan, E., 2007. Risk assessment of surface water contamination by herbicide residues: Monitoring of propanil degradation in irrigated rice field waters using HPLC-UV and confirmation by GC-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 585-589.

Rabiet, M., Coquery, C., Margoum, C., Guillemain, C., Gouy, V., Carlier, N., 2007. Distribution and fate of pesticides and traces metals in a small stream draining an agricultural watershed - Assessing the effect of hydrological conditions on the transport of contaminants. *Geophysical Research Abstracts* 9.

Risso-de Faverney, C., Devaux, A., Lafaurie, M., Girard, J.P., Bailly, B., Rahmani, R., 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquatic Toxicology* 53, 65-76.

Robbiano, L., Baroni, D., Novello, L., Brambilla, G., 2006. Correlation between induction of DNA fragmentation in lung cells from rats and humans and carcinogenic activity. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 605, 94-102.

Rocha, P.S., Luvizotto, G.L., Kosmehl, T., Böttcher, M., Storch, V., Braunbeck, T., Hollert, H., 2009. Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and environmental safety* 72, 1842-1848.

Schirmer, K., 2006. Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* 224, 163-183.

Schirmer, K., Dayeh, V.R., Bopp, S., Russold, S., Bols, N.C., 2004. Applying whole water samples to cell bioassays for detecting dioxin-like compounds at contaminated sites. *Toxicology* 205, 211-221.

Schirmer, K., Tom, D.J., Bols, N.C., Sherry, J.P., 2001. Ability of fractionated petroleum refinery effluent to elicit cyto- and phototoxic responses and to induce 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in fish cell lines. *Science of The Total Environment* 271, 61-78.

Schnell, S., Bols, N.C., Barata, C., Porte, C., 2009. Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1. *Aquatic Toxicology* 93, 244-252.

Segner, H., 2004. Cytotoxicity assay with fish cells as an alternative to the acute lethality assay with fish. *ATLA. Alternatives to laboratory animals* 32, 375-382.

Segner, H., Behrens, A., Joyce, E.M., Schirmer, K., Bols, N.C., 2000. Transient induction of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by medium change in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1. *Marine Environmental Research* 50, 489-493.

Seiler, J.P., 1979. Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens , : II. Chemical basis of mutagenic activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 12, 183-190.

Sekihashi, K., Yamamoto, A., Matsumura, Y., Ueno, S., Watanabe-Akanuma, M., Kassie, F., Knasmüller, S., Tsuda, S., Sasaki, Y.F., 2002. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 517, 53-75.

Smeets, J.M.W., Voormolen, A., Tillitt, D.E., Everaarts, J.M., Seinen, W., 1999. Cytochrome P4501A induction, benzo[a]pyrene metabolism, and nucleotide adduct formation in fish hepatoma cells: Effect of preexposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 474-480.

Smith, C.C., O'donovan, M.R., Martin, E.A., 2006. hOGG1 recognize oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* 21, 185-190.

Smolarek, T.A., Morgan, S.L., Moynihan, C.G., Lee, H., Harvey, R.G., Baird, W.M., 1987. Metabolism and DNA adduct formation of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in fish cell lines in culture. *Carcinogenesis* 8, 1501-1509.

Speit, G., Schutz, P., Bonzheim, I., Trenz, K., Hoffmann, H., 2004. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicology Letters* 146, 151-158.

Šrut, M., Traven, L., Stambuk, A., Kralj, S., Zaja, R., Micovic, V., Klobucar, G.I.V., 2011. Genotoxicity of marine sediments in the fish hepatoma cell line PLHC-1 as assessed by the Comet assay. *Toxicology in Vitro* 25,308-314.

Tchou, J., Bodepudi, V., Shibutani, S., Antoshechkin, I., Miller, J., Grollman, A.P., Johnson, F., 1994. Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *Journal of Biological Chemistry* 269, 15318-15324.

Thibaut, R., Porte, C., 2008. Effects of fibrates, anti-inflammatory drugs and antidepressants in the fish hepatoma cell line PLHC-1: Cytotoxicity and interactions with cytochrome P450 1A. *Toxicology in Vitro* 22, 1128-1135.

Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyanae, Y., Rojas, E.s., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.

Tixier, C., Sancelme, M., Bonnemoy, F., Cuer, A., Veschambre, H., 2001. Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: Synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1381-1389.

TOXNET, H.S.D.B., 2003. 3,4-DCA - Environmental water concentrations. NLM - United state National Library of Medicine.

TOXNET, H.S.D.B., 2010. BaP. NLM - United State National Library of Medicine.

Tudek, B., VanZeeland, A.A., Kusmierek, J.T., Laval, J., 1998. Activity of Escherichia coli DNA-glycosylases on DNA damaged by methylating and ethylating agents and influence of 3-substituted adenine derivatives. *Mutation Research/DNA Repair* 407, 169-176.

Willett, K.L., Lienesch, L.A., Di Giulio, R.T., 2001. No detectable DNA excision repair in UV-exposed hepatocytes from two catfish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 128, 349-358.

Windhorfer, F., Krause, S., Hader, C., Schulz, W., Florl, A., 2008. Distinctive differences in DNA double-strand break repair between normal urothelial and urothelial carcinoma cells. *Mutation Research*. 638, 56-65.

**Chapitre III - Etude des capacités de réparation des
dommages à l'ADN des lignées RTL-W1 et RTG-
W1 et application au développement d'un
biomarqueur**

Dans cette phase du travail, nous nous sommes intéressés aux capacités de réparation des dommages à l'ADN des deux lignées cellulaires de truite arc-en-ciel (RTL-W1 et RTG-W1). La lignée PLHC-1 a été écartée de cette étude à cause de son caractère cancéreux d'une part et de sa tendance à s'agréger en amas à la trypsination, ce qui rend son traitement en essai des comètes relativement délicat en routine. Les lignées RTL-W1 et RTG-W1 ont été testées pour leur capacité à réparer des lésions spécifiques des systèmes Base Excision Repair, Nucleotide Excision Repair et PhotoEnzymatic Repair. Ceci a été réalisé grâce à des mesures de cinétiques de décroissance du niveau de fragmentation initié par des génotoxiques modèles, en utilisant deux versions modifiées (endonucléases Fpg et T4) de l'essai des comètes. Dans un deuxième temps, la possibilité de l'utilisation des capacités BER des lignées en tant que biomarqueur a été étudiée par la mise en place de l'essai des comètes modifié de type BERc basé sur la mesure de la capacité d'incision d'un extrait cellulaire des deux lignées mis à incuber sur un ADN substrat porteur de lésions spécifiques des systèmes de réparation par excision des bases.

Cet axe de travail a donné lieu à plusieurs séries d'expérimentations. Dans une première série, nous avons caractérisé les activités de réparation de **type Base Excision Repair** des deux lignées cellulaires avec :

- La mise en place préalable des protocoles de suivi cinétique de la réparation par l'essai des comètes et du protocole de l'essai modifié de type BERc.
- Le suivi cinétique de réparation des dommages par excision des bases (BER) et l'application du BERc aux deux lignées cellulaires. L'ensemble de ces résultats correspond à la publication III publiée dans *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* : «Assessment of base excision repair activity in fish cell lines: towards a new biomarker of contaminant exposure ? » (Kienzler et al., 2013, acceptée le 15.12.2012)

Dans une seconde série d'expérimentations nous nous sommes intéressés aux activités de réparation de type Nucleotide Excision Repair et Photo Enzymatic Repair des lignées après exposition à des rayonnements UV avec :

- La mise au point préalable d'un essai des comètes modifié utilisant une étape de digestion par l'endonucléase T4, spécifique des dommages de type photoproduits.

- Le suivi des cinétiques de réparation de dommages UV-induits par excision des nucléotides et photoréactivation chez les deux lignées (système BER et PER). Ces résultats correspondent à la publication IV « UV-induced Nucleotide Excision Repair (NER) and Photoreactivation Repair (PER) in two trout fish cell lines used in ecotoxicological assessment » soumise au Journal of Photochemistry and Photobiology Part B: Biology.

Les différentes étapes de cette partie de notre travail sont schématisées dans la Figure 26.

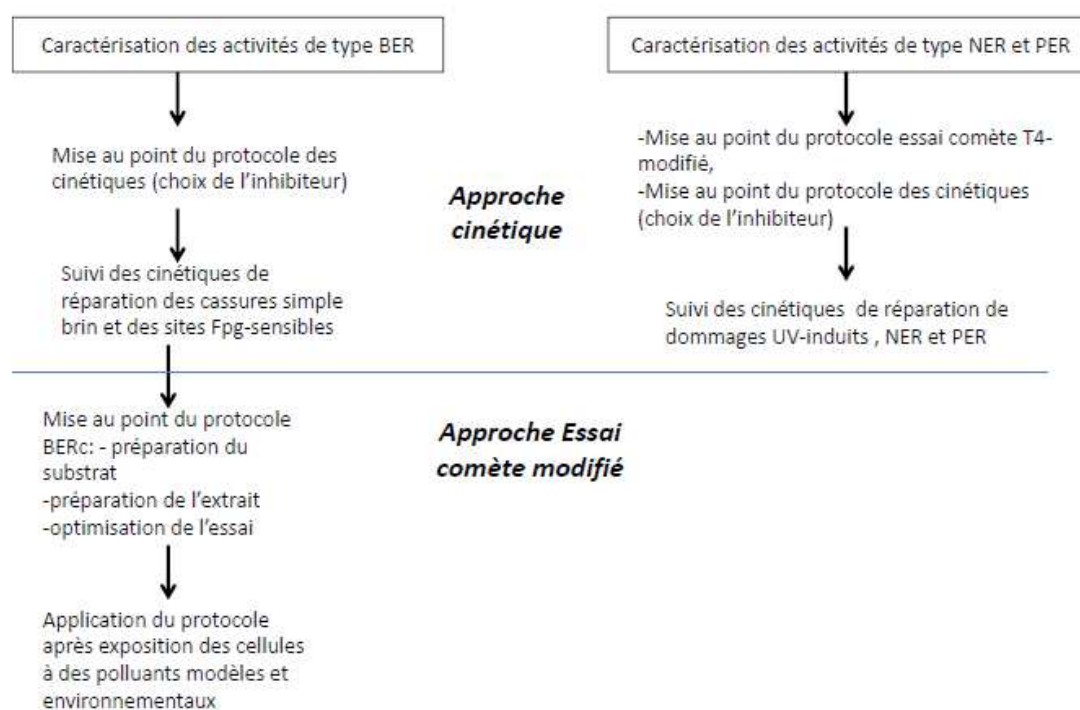


Figure 26 : Les différentes étapes de l'étude des capacités de réparation des dommages à l'ADN des lignées RTL-W1 et RTG-W1

1 Le système BER dans les lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1

1.1 Mise en place du protocole de suivi cinétique : choix de l'inhibiteur sur des critères de cytotoxicité et de génotoxicité

Dans le cas du suivi cinétique de réparation totale, les génotoxiques modèles choisis sont le MMS, engendrant des lésions alkylantes connues pour être prises en charge par le BER, et l'H₂O₂, agent oxydant, générant essentiellement des coupures simple brin et des dommages oxydatifs aux bases dans une moindre mesure. Pour ces deux molécules, l'établissement de gammes d'exposition sub-cytotoxiques présentées au chapitre précédent ont permis de valider les conditions d'exposition adéquates à la mesure de la réparation des dommages à l'ADN dans le temps. Ainsi, 10 minutes d'exposition à 10 µM d'H₂O₂ et 15 minutes d'exposition à 1 mM de MMS ont été choisies comme conditions générant un niveau de dommage initial ne saturant pas le signal lu par l'essai des comètes (environ 50% Tail Intensity à l'origine).

Dans le cas du suivi de la réparation des alkylations, la cinétique a été réalisée sur 24h, et un inhibiteur du système BER a été utilisé afin de vérifier que la décroissance du niveau de dommage avec le temps n'était pas liée à un « effet de dilution » par les divisions cellulaires (comparaison des cinétiques de réparation avec et sans l'inhibiteur). En absence de donnée bibliographique sur l'utilisation d'inhibiteurs de réparation chez ces deux lignées, un travail préalable visant au choix et à la dose (garantissant l'absence de cytotoxicité, et de génotoxicité intrinsèque) de l'inhibiteur a dû être réalisé.

Deux inhibiteurs connus du système BER ont été comparés. Le 3 aminobenzamide (3-AB) (Köberle et Speit 1991; Kopeika et al. 2004) agit en inhibant la poly(ADP-ribosyl)ation, bloquant ainsi la dissociation de la protéine PARP-1 de l'ADN et les étapes ultérieures de réparation (Parsons et al. 2005). La méthoxiamine (MX) agit sur le C1 du désoxyribose (lieu du site abasique), le rendant réfractaire à l'étape de β-élimination ; par conséquent elle bloque le « short-patch BER » mais n'empêche pas le « long-patch BER » (Frosina et al. 1994). Les résultats des gammes de cytotoxicité (0 à 100 mM des deux molécules après 24h d'exposition pour les deux lignées cellulaires) sont présentés dans la Figure 27. Une exposition à 15% d'éthanol a été utilisée comme témoin positif.

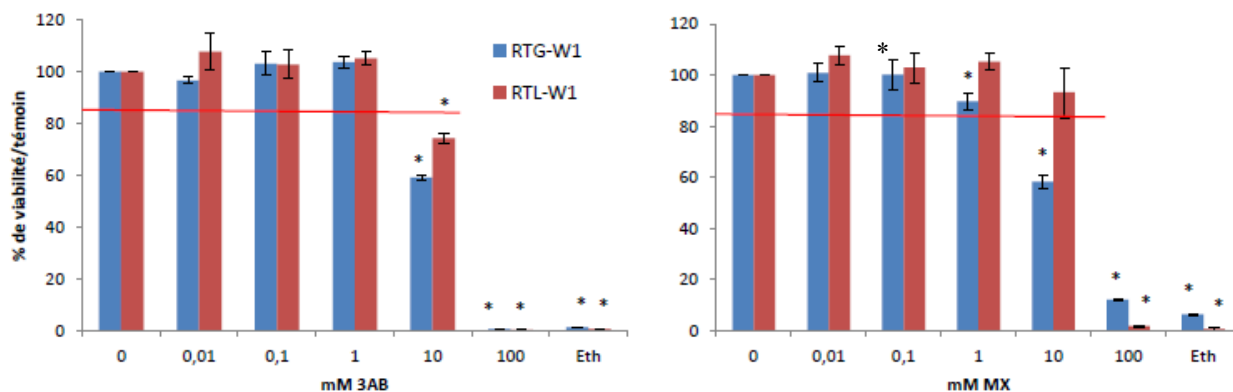


Figure 27 : Cytotoxicité du 3-aminobenzamide (gauche) et de la méthoxiamine (droite) sur les lignées cellulaires RTG-W1 et RTL-W1 après 24h d'exposition

*Moyenne ± SEM de 2 réplicats indépendants de 6 puits chacun par dose ; Eth : éthanol, témoin positif ; * : différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$), Test de Kruskal Wallis-Post-Hoc : Comparaison multiple des rangs moyens. La ligne rouge correspond à 85% de viabilité par rapport au témoin.*

Les doses d'exposition sub-cytotoxiques au 3AB et à la MX obtenues (autour de 1 mM pour les deux molécules) sont faibles comparées à celles décrites dans la littérature pour d'autres types cellulaires, à savoir de l'ordre de 10 à 20 mM pour le 3AB (Kopeika et al. 2004 ; Horton et Wilson 2007) et autour de 30 mM pour MX (Horton et Wilson 2007).

Le 3 aminobenzamide étant la moins cytotoxique des deux molécules testées (pas de perte significative de viabilité jusqu'à la dose de 1 mM), il a été choisi pour la suite des expérimentations et deux derniers points ont été vérifiés: 1) affiner la concentration de 3AB la plus élevée pouvant être appliquée, ceci en condition réelle d'utilisation de l'inhibiteur, à savoir dans le cadre d'un suivi de la réparation d'un ADN endommagé initialement par un traitement au MMS. Il s'agit donc de vérifier l'absence d'effet cytotoxique synergique entre le MMS et l'inhibiteur (Figure 28), 2) vérifier l'effet de l'inhibiteur de réparation à la dose choisie sur le niveau de base des dommages à l'ADN des deux lignées avec l'essai des comètes dans ses deux versions standard et Fpg-modifiée (Figure 29).

Les résultats décrits dans la Figure 28 montrent que pour les deux lignées, une concentration de 2,5 mM de 3AB peut être utilisée sans induire de cytotoxicité notoire (viabilité >85%) au cours des 24h suivant l'exposition au génotoxique et la Figure 29 atteste de l'absence d'effet de l'inhibiteur de réparation sur les niveaux de base des dommages primaires et des sites Fpg-sensibles des cellules (%TI < 10), ce qui confirme la validité du protocole appliqué.

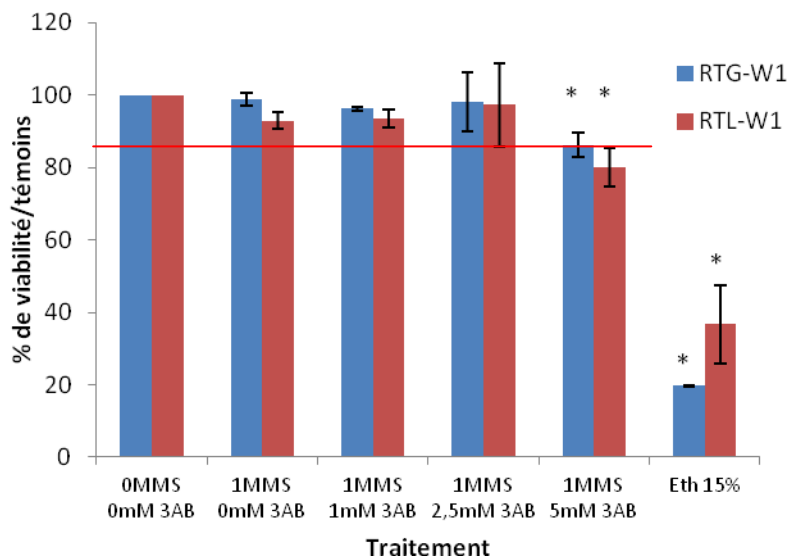


Figure 28 : Cytotoxicité après 24h d'exposition au 3AB faisant suite à une exposition initiale des cellules au MMS (1 mM, 15 minutes).

*Exposition de 24h ; éthanol 15% : témoin positif ; moyenne ± SEM de 3 réplicats de 6 puits chacun.
* : différence significative par rapport au témoin 1MMS/0AB ($p < 0,05$), Test de Kruskal Wallis - Post-Hoc : Comparaison multiple des rangs moyens.
La ligne rouge correspond à 85% de viabilité par rapport au témoin.*

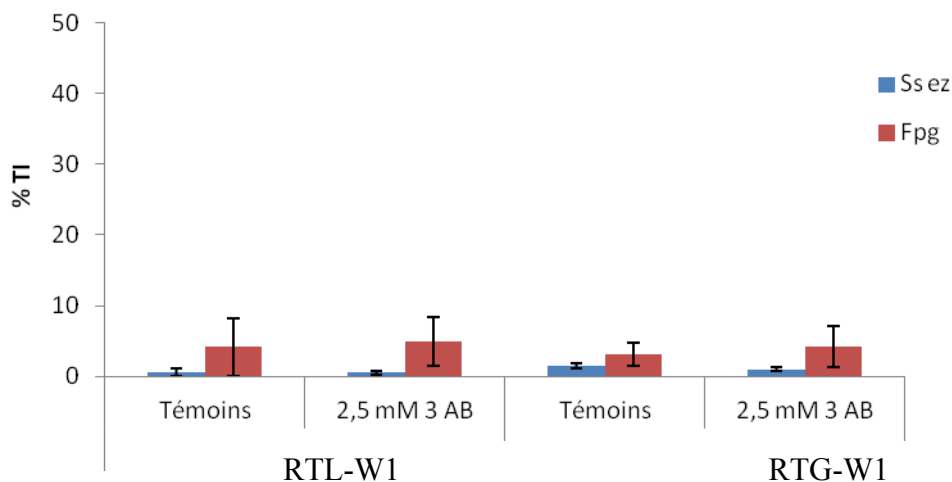


Figure 29 : Niveau de base des dommages à l'ADN des deux lignées RTL-W1 et RTG-W1 après 24h d'exposition avec et sans 3AB dans les versions standard et Fpg-modifiée de l'essai des comètes.

Moyenne ± ET de 3 réplicats

1.2 Mise en place du protocole de l'essai des comètes modifié de type BERc

Comme rappelé dans la Figure 30, le principe de cet essai repose sur une étape d'incubation d'un ADN substrat porteur de lésions spécifiques avec un extrait cellulaire dont on veut évaluer la capacité d'incision. Plusieurs ajustements du protocole développé initialement sur lymphocytes humains (Collins et al. 2001b) et modifié par Langie (communication personnelle) ont été nécessaires pour pouvoir l'appliquer de manière satisfaisante aux lignées cellulaires de poisson.

Les ajustements ont concerné :

- les conditions de préparation et de conservation de l'ADN substrat (en vert dans la Figure 30)
- les conditions de préparation et de conservation de l'extrait cellulaire (en bleu dans la Figure 30), ainsi que certains détails de son utilisation dans les conditions du test tel que:
 - la concentration optimale de l'extrait compatible avec les contraintes de faibles taux de croissance des lignées cellulaires de poisson
 - la durée d'incubation optimale
 - l'âge des cellules pour la préparation de l'extrait
 - la durée de conservation des extraits par congélation

Le protocole final retenu, détaillé dans la publication III (chapitre suivant) ne sera pas décrit ici.

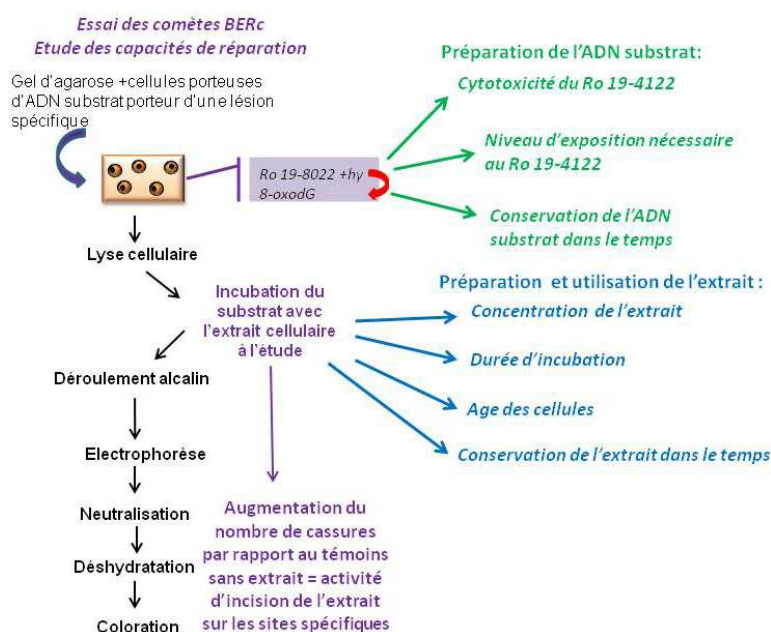


Figure 30 : Principe de l'essai des comètes modifié BERc et différents points étudiés pour son optimisation avec les lignées cellulaires de poisson

En vert, les ajustements effectués pour la préparation de l'ADN substrat, en bleu celles concernant la préparation des extraits cellulaires

1.2.1 Préparation de l'ADN substrat

➤ Objectif

Le génotoxique utilisé pour créer un dommage spécifique du système de réparation des bases sur le substrat est le Ro 19-8022 (1-((10-chloro-4-oxo-3-phenyl-4H-benzo(a)quinzolin-1-yl) carbonyl)-2-pyrrolidine méthanol), une molécule hétérocyclique utilisée dans les traitements médicamenteux anxiolytiques (Figure 31). Elle est ici utilisée pour ses propriétés photosensibilisantes : l'exposition conjointe au Ro 19-8022 et à la lumière permet de générer des lésions spécifiques de l'ADN comptant plus de 90% de 8-oxoGua (Will et al. 1999; Collins et Gaivão 2007). Cette lésion constitue un substrat de choix pour le système de réparation par excision de bases (Flohr et al. 2003). Il était nécessaire d'étudier la cytotoxicité et la génotoxicité induite par cette molécule pour déterminer les conditions d'exposition adéquates des cellules destinées à contenir l'ADN substrat. L'objectif à atteindre étant, en l'absence de cytotoxicité, un niveau de dommage à l'ADN suffisant pour être détecté après incubation avec l'enzyme Fpg (témoin positif) et conduisant à un niveau moyen (40 à

50% TI) compatible avec la mise en évidence ultérieure d'une modulation des activités d'excision des extraits qui seront testés (augmentation ou inhibition).

Par ailleurs, afin de limiter un éventuel « effet substrat » lié à des différences de niveau de dommages à l'ADN générés d'un lot de substrat à l'autre, il est préférable de pouvoir réaliser les différents réplicats d'une même série d'expérimentations sur un même lot d'ADN substrat. L'étape suivante a donc consisté en une étude de la conservation par congélation des cellules porteuses d'ADN substrat.

➤ **Matériels et méthodes :**

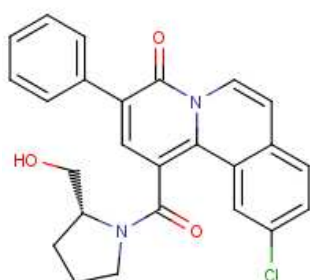


Figure 31 : Molécule de Ro 19-8022
(source : <http://ctdbase.org/cas-images/>)

Mesure de la cytotoxicité : Dans la littérature, l'ADN substrat est préparé à partir de la lignée HeLa, exposée à 0.1 μM du photosensibilisant Ro 19-8022 dans du PBS, avec une irradiation de 2 minutes sur de la glace (Collins et al. 2001b). Pour l'étude de la cytotoxicité, une gamme allant de 0 à 0.5 μM de Ro 19-8022 a donc été choisie.

La solution mère de Ro 19-8022 est préparée à partir d'un échantillon gracieusement fourni par les laboratoires Hoffmann La Roche (Bâle, Suisse) à la concentration de 1mM dans l'éthanol à 70% avant d'être aliquotée par fractions de 0,5 mL et conservée à -20°C à l'abri de la lumière. Cette solution mère est diluée extemporanément dans du tampon PBS afin de constituer la gamme de concentration souhaitée. L'exposition est effectuée en plaques 96 puits sur de la glace, à une distance de 33 cm de la source lumineuse pendant 5 min. La lampe utilisée est une lampe halogène de 500W (400-700 nm) délivrant 2 KJ/m^2 . Immédiatement après l'exposition, le milieu d'exposition est remplacé par du milieu L-15 complet et le test au CTB tel que décrit § B-I-2 est réalisé. La cytotoxicité est ainsi mesurée 4 heures après l'exposition, temps nécessaire à la réalisation du test CTB. Une exposition des cellules à 15% de DMSO a été utilisée pour les témoins positifs.

Mesure de la génotoxicité : Après exposition aux six doses testées de Ro 19-8022 (0 à 0,5 μM) en plaques 6 puits, les cellules sont collectées par trypsination, incluses dans un gel d'agarose comme précédemment décrit sur deux lames différentes et sont soumises aux essais

des comètes Fpg-modifié et standard comme décrit en § B.II.1.2. Trois préparations indépendantes ont été réalisées et les niveaux de dommages à l'ADN ont été mesurés immédiatement après le traitement au photosensibilisant.

➤ **Résultats et discussion :**

Cytotoxicité : les résultats présentés dans la Figure 32 montrent que, pour les deux lignées, l'exposition au Ro 19-8022 et à la lumière n'induit pas de cytotoxicité immédiate significative dans la gamme d'exposition variant de 0 à 0,4 μM de Ro 19-8022, et est supérieur à 90% de 0 à 0,5 μM . La génotoxicité du photosensibilisant peut donc être testée sur cette même gamme.

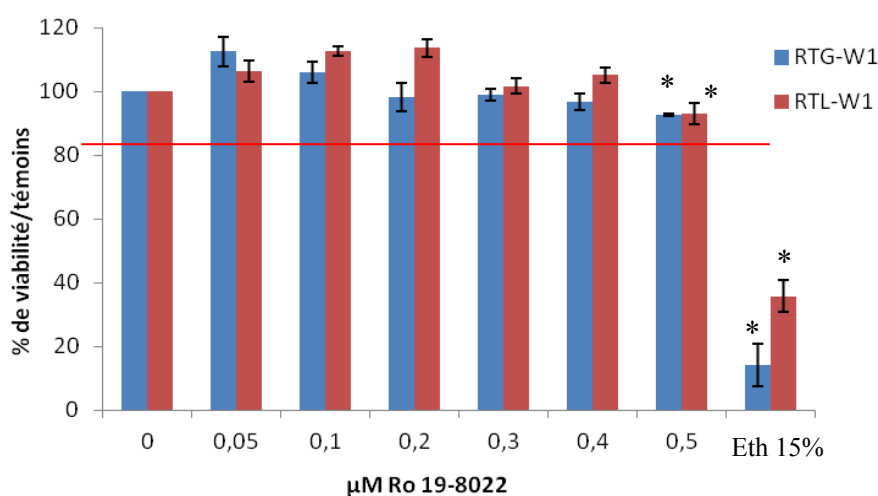


Figure 32 : Cytotoxicité du Ro 19-8022 sur les lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1.
*Exposition de 5 minutes +2 J.m^{-2} de lumière; DMSO 15% : témoin positif ; moyenne \pm SEM de 3 réplicats de 6 puits chacun. * : différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$), Test de Kruskal Wallis - Post-Hoc : Comparaison multiple des rangs moyens. La ligne rouge correspond à 85% de viabilité par rapport au témoin.*

Génotoxicité : les résultats (Figure 33) montrent qu'en appliquant l'essai des comètes non modifié le niveau de dommage lu reste faible ($< 15\%$ TI) même aux plus fortes concentrations d'exposition au photosensibilisant. Par contre, l'application de l'essai Fpg-modifié qui excise les bases oxydées de type 8-oxoGua générées par le traitement, permet l'obtention d'une relation dose-effet avec les deux lignées et des niveaux de dommages moyens (autour de 50%TI) sont atteints avec les concentrations de 0,4 et 0,5 μM de Ro 19-8022. Ce résultat confirme que l'ADN ainsi traité contient une majorité de lésions de type 8-oxoGua, qui ne sont pas alcali-labiles et donc mal révélées par l'essai des comètes en conditions standards et il constitue donc potentiellement une bonne source de lésions spécifiques du système de

réparation BER. A ce stade des essais, l'ADN substrat généré à partir de chacune des deux lignées cellulaires semble convenir indifféremment.

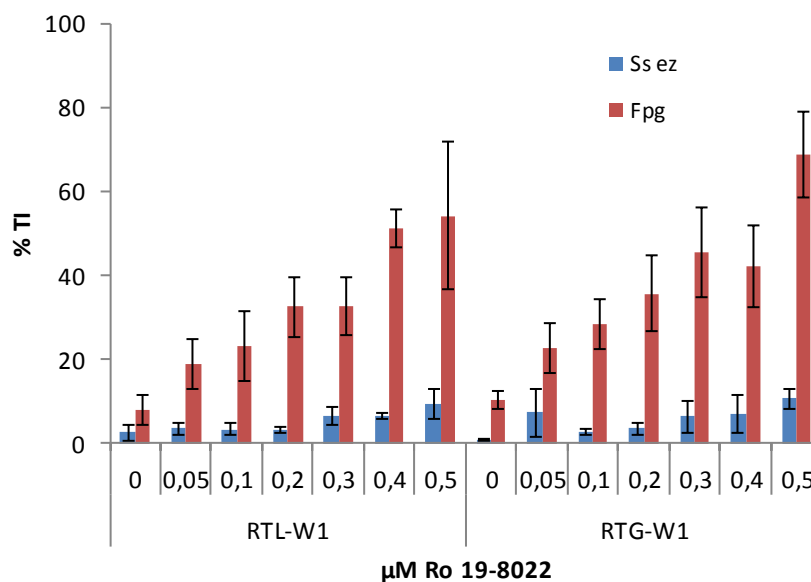


Figure 33 : Niveaux de dommages à l'ADN générés par différents traitements au photosensibilisant Ro 19-8022 sur les lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1.

Ss ez : lames incubées avec tampon uniquement, Fpg : lames incubées avec l'enzyme Fpg. Exposition de 5 minutes + 2 J.m⁻² de lumière; moyenne ± ET de 3 réplicats.

La conservation de l'ADN substrat congelé à -80°C dans le temps a également été vérifiée (Annexe III). Celle-ci ne semble pas poser de problème pour une durée allant jusqu'à 35 jours.

En conclusion, le protocole retenu dans la suite des expérimentations pour la préparation de l'ADN substrat porteur de lésions 8-oxoGua, substrat des activités de réparation BER, est une exposition sur la glace de cellules de la lignée RTL-W1 âgées de 24h, à 0,5 μM de Ro 19-8022 pendant 5 minutes à 33 cm de la source lumineuse. Avant chaque grande série d'expériences utilisant la technique du BERc, un lot d'ADN substrat préparé à partir d'un même lot de cellules sera préparé, aliquoté et congelé pour conservation à -80°C pour une durée maximale allant jusqu'à 35 jours.

1.2.2 Préparation des extraits cellulaires

➤ Objectif :

Il s'agissait tout d'abord d'appliquer le protocole issu de la bibliographie en fixant certains critères arbitrairement (concentration de cellules pour préparer l'extrait, durée d'incubation, âge des cellules utilisées) afin de mettre en évidence une activité d'incision d'extraits cellulaires préparés avec les deux lignées RTL-W1 et RTG-W1 ; puis de revenir sur ces critères méthodologiques importants afin de les optimiser (Figure 30). Par ailleurs, a été également évaluée l'influence de l'âge des cellules post-trypsination, car la phase du cycle de croissance dans lequel se trouvent les cellules (latence, croissance exponentielle, plateau...) peut influencer sur l'activité de réparation des cellules, ainsi que la conservation de l'extrait dans le temps.

➤ Matériels et Méthodes :

Mise en évidence de l'activité d'incision des extraits cellulaires :

Les cellulesensemencées à 150 000 et 200 000 cellules/mL (RTL-W1 et RTG-W1 respectivement) en P75 sont trypsinées 24h après ensemencement, selon le protocole de trypsination classique, puis reprises dans 8 mL de milieu L-15 complet. Elles sont centrifugées (800g, 10 min à 4°C), et le culot est resuspendu dans du PBS de façon à obtenir une concentration de 1.10^6 cellules/mL. Cette suspension cellulaire est ensuite aliquotée par fraction de 1 mL, centrifugée afin de séparer les enzymes du cytosol et les débris cellulaires (14 000g, 6 min, 4°C), et le culot cellulaire est congelé à sec dans l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'au jour de l'essai. Lors de l'essai, l'aliquot est décongelé par ajout de 65 µL de tampon de lyse A (45 mM HEPES, 0.4 M KCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothréitol, 10% glycérol, ajusté à pH 7.8 avec KOH) contenant 1% de Triton X100, le lysat est centrifugé (14 000g, 5min, 4°C) et 55µL du surnageant obtenu qui constitue l'extrait cellulaire brut sont mélangés à 245 µL de tampon F (tampon d'activité des enzymes de réparation, identique à celui utilisé avec l'enzyme Fpg) puis conservés dans la glace jusqu'à utilisation. Les 10 µL d'extrait brut restant sont utilisés pour un dosage de protéines totales. Trente µL d'extrait sont ajoutés à chaque gel avec une lamelle et incubés dans une boîte humidifiée, au noir, 45 min dans une étuve à 20°C. Le reste de l'essai se déroule comme un essai comète classique. Des lames témoins négatifs (avec tampon uniquement) et témoins positifs (avec enzyme Fpg) sont également réalisées.

Concentration de l'extrait et durée d'incubation :

Selon le même protocole que ci-dessus, une deuxième série d'expérimentations a permis de comparer les activités d'extraits préparés à partir de 1.10^6 cellules/mL et de 3.10^6 cellules/mL, et les différences d'activité d'extraits de 3.10^6 cellules/mL après 15, 30 ou 45 minutes d'incubation.

Age des cellules et conservation dans le temps des extraits congelés :

Une troisième série d'expérimentations a permis de comparer l'activité d'incision d'extraits réalisés 24h ou 48h post-ensemencement. Enfin, une quatrième série d'expérimentations a également permis de vérifier la conservation dans le temps des extraits congelés: par souci de concision les résultats sont présentés en annexe III.

➤ **Résultats et discussion**

Mise en évidence de l'activité d'incision des extraits cellulaires :

Les résultats présentés dans la Figure 34 montrent une activité d'incision dans les extraits préparés à partir des deux lignées cellulaires, mesurable et capable de traduire l'effet dose de la gamme de Ro 19-8022 utilisée. Les pourcentages de dommages observés après incubation avec les extraits cellulaires sont clairement supérieurs à ceux des témoins et se situent dans une gamme allant de 15 à 40%TI pour les doses comprises entre 0,2 et 0,5 μ M de Ro 19-8022. L'activité d'incision est détectable à partir de 0,2 μ M de Ro 19-8022 (différence significative par rapport aux témoins respectifs sans Ro de chaque lignée). L'activité d'incision obtenue est toujours inférieure à celle lue avec l'enzyme Fpg qui sert ici de témoin positif et permet entre autres, de vérifier que l'activité des extraits n'est pas limitée par la disponibilité en lésions sur l'ADN substrat. Une analyse statistique des résultats ne met pas en évidence d'effet lignée significatif (ANOVA).

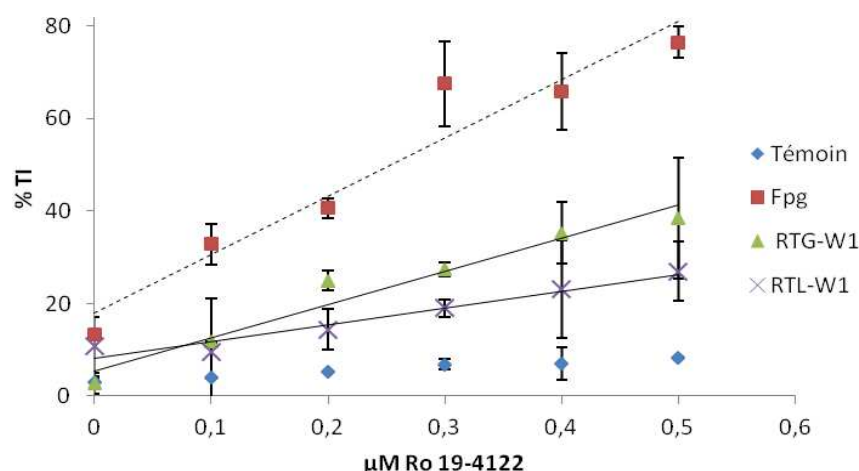


Figure 34 : Mise en évidence des capacités d'incision des lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1 sur un ADN porteur de différents niveaux de lésions type 8-oxoGua.

*Témoin négatif: lame avec tampon seul ; Fpg : lame avec tampon+enzyme Fpg (témoin positif).
Moyenne ± ET de deux réplicats, 2 gels par réplicat et par concentration. Pas d'effet lignée significatif (ANOVA)*

Concentration de l'extrait

Dans la littérature, Collins *et al.* (2001b) préconisent d'utiliser des extraits à la concentration de $6,5 \cdot 10^6$ cellules/300µL pour des lymphocytes humains ; et Ramos *et al.* (2010) préconisent une concentration de $1 \cdot 10^6$ cellules/300µL pour la lignée entérocytaire humaine Caco2. Ce paramètre est en effet lignée dépendant et varie en fonction du niveau global d'activité d'incision de la lignée considérée. Il devait donc être fixé pour les lignées étudiées ici. Deux concentrations d'utilisation ont donc été comparées ($1 \cdot 10^6$ et $3 \cdot 10^6$ millions de cellules dans 300 µL de tampon) afin de vérifier si une concentration supérieure pouvait permettre d'améliorer la sensibilité de l'essai. Des concentrations cellulaires plus élevées n'ont pas été testées du fait de la difficulté à constituer un stock suffisamment important de cellules, étant donnée leur croissance relativement lente. Les résultats, présentés dans la Figure 35, montrent qu'une concentration supérieure permet une meilleure sensibilité de l'essai : un effet «concentration des extraits» significatif est mis en évidence par une analyse statistique chez les deux lignées (ANOVA, $p=0,000035$ pour RTL-W1 et RTG-W1), mais aucun effet « lignée » n'est mis en évidence.

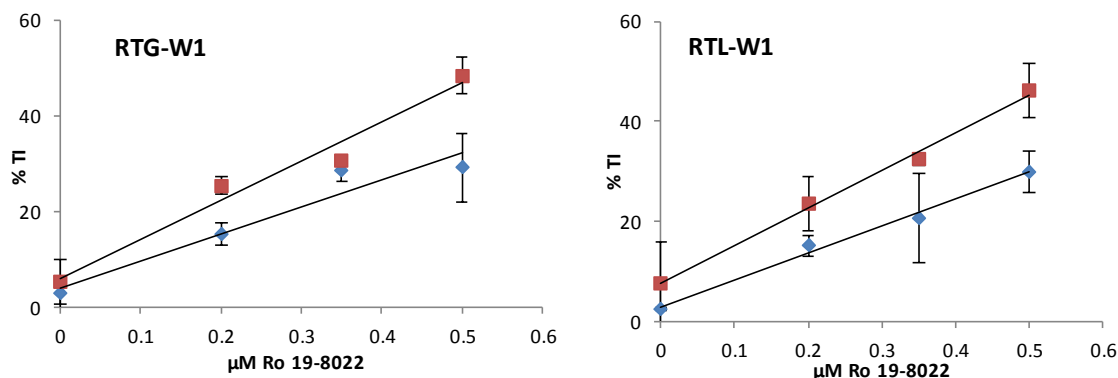


Figure 35 : Concentration des extraits et activité d'incision des extraits cellulaires RTL-W1 et RTG-W1 sur un ADN porteur de différents niveaux de lésions type 8-oxoGua

L'activité d'incision d'extraits préparés à partir de 1.10^6 cellules (losange) et 3.10^6 cellules (carré) dans $300 \mu\text{L}$ est mesurée sur une gamme de concentration de Ro 19-8022 ; moyennes \pm ET de deux réplicat (2 gels par réplicat et par concentration).

Les valeurs des pentes obtenues avec les deux lignes pour une concentration cellulaire donnée sont très proches : elles passent respectivement de 0,34 à 0,48 pour RTL-W1 et 0,37 à 0,50 pour RTG-W1 à 3.10^6 cellules, ce qui montre que les capacités d'incision de ces deux lignées d'origine tissulaire différente mais provenant de la même espèce, sont très comparables.

Durée d'incubation

Sur les premiers essais, une incubation de 45 minutes avait été arbitrairement choisie, de façon à augmenter les chances de mettre en évidence une activité. Afin de tenter d'améliorer la faisabilité et la rapidité de l'essai, nous avons testé des temps d'incubation allant de 15 à 45 minutes. Les résultats sont présentés dans la Figure 36. Au vu de ces résultats, il a été décidé de conserver un temps d'incubation de 45 minutes, qui semble permettre une lecture optimale de l'activité.

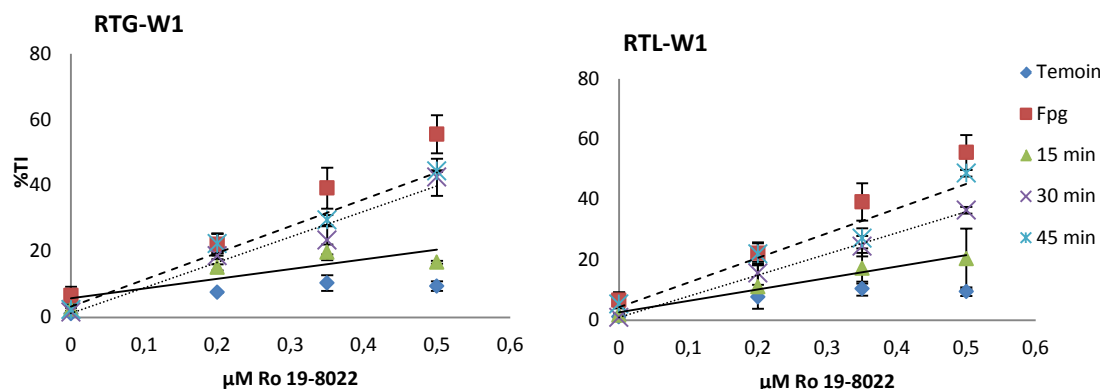


Figure 36 : Effet de la durée d'incubation sur la sensibilité de l'essai

Témoin : lame avec tampon seul ; Fpg : lame avec tampon+enzyme Fpg (témoin positif). Moyenne ± ET de deux réplicats ; 2 gels par réplicat et par concentration
Courbe de tendance : ___ 15 min, 30min, ----45min

Age des cellules

Dans le cas d'une exposition de 24h, débutant 24h après l'ensemencement, les cellules auront alors 48h lors de la trypsination. Il a donc été vérifié que l'âge des cellules post-ensemencement (24 ou 48h) n'avait pas d'influence sur sa capacité d'incision. Par ailleurs, à 48h, on obtient 25 à 30% de cellules supplémentaires disponibles dans le flacon de culture, ce qui est important quand on a besoin de 3 millions de cellules par flacon.

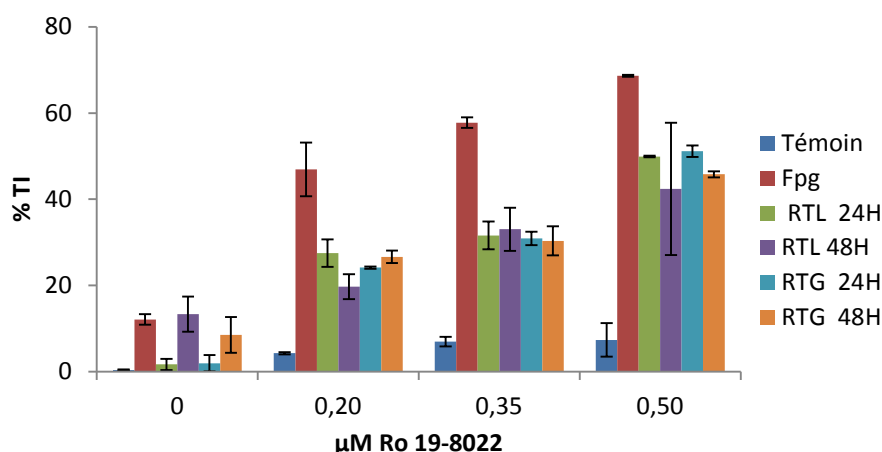


Figure 37 : Effet de l'âge post-ensemencement des cellules lors de la confection des extraits sur l'activité d'incision

Témoin négatif: tampon seul ; Fpg : tampon+enzyme Fpg (témoin positif). Moyennes ± ET deux réplicats, 2 gels par réplicat et par concentration

Les résultats obtenus ne mettent pas en évidence d'effet de l'âge des extraits entre 24 et 48h sur l'activité d'incision (Figure 37 ; pas d'effet « lignée » ni d'effet « âge » sur l'ensemble des données, ANOVA multifactorielles). Les extraits peuvent donc être indifféremment préparés à partir de cultures âgées de 24 ou 48h, en s'assurant toutefois de ne pas être à confluence.

1.3 Mise en évidence des capacités de réparation BER et développement d'un biomarqueur à l'aide de la méthode BERc : Publication III

Kienzler et al., 2013. Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis. 753 (2) 107-113.

Résumé : Le mécanisme de réparation par excision des bases (BER) est le mécanisme majeur de réparation des lésions à l'ADN causées par les génotoxiques environnementaux. Le BER a été mis en évidence chez les poissons mais n'a pas été étudié sur lignées cellulaires pisciaires, bien qu'elles soient de plus en plus utilisées en évaluation écotoxicologique. L'objectif de cette étude est de mettre en évidence les capacités de réparation par le BER chez deux lignées cellulaires de truite utilisées en écogénotoxicologie, RTL-W1 et RTG-W1. Ceci a été réalisée par deux approches : 1) le suivi de la cinétique de réparation après exposition à des génotoxiques modèles engendrant principalement des lésions spécifiques du BER, au moyen de l'essai des comètes en conditions alcalines (standard et Fpg-modifié), 2) l'évaluation de la capacité d'incision d'extraits cellulaires de ces deux lignées par l'essai des comètes modifié BERc.

Les résultats montrent que les deux lignées cellulaires réparent efficacement les coupures simple brin et les bases alkylées en respectivement 4h et 24h. Par ailleurs, cette étude montre que l'essai des comètes modifié BERc peut être utilisé chez ces deux lignées cellulaires RTG-W1 et RTL-W1 pour évaluer les capacités d'incision de ces lignées et leur modulation après exposition à des inhibiteurs modèles du BER tel que le 3-aminobenzamide ou à des contaminants environnementaux tels que le cadmium. Ainsi, après 24h d'exposition des cellules à ces deux molécules, une diminution dose-dépendante des capacités d'incision des extraits est observée. Cet effet n'est pas observé après exposition au TBT. Quand le cadmium est directement ajouté à l'extrait sans exposition des cellules au préalable, cet effet inhibiteur est également observé, à des concentrations suffisamment basses pour être pertinentes du point de vue environnemental. Ceci montre une interaction directe avec les enzymes impliquée dans la reconnaissance et l'incision des bases endommagées, ce qui n'est pas le cas

avec le 3AB ou le TBT, pour lequel aucune modulation n'est mise en évidence par ajout direct dans le tampon d'activité des extraits.

Ce travail démontre l'existence d'activité BER mesurable chez RTL-W1 et RTG-W1, et constitue une base au développement futur d'un nouveau biomarqueur de génotoxicité basé sur les activités de réparation de l'ADN chez des lignées cellulaires de poisson.

Assessment of base excision repair activity in fish cell lines: towards a new biomarker of contaminant exposure?

Aude Kienzler¹, Sylvie Bony^{1,2}, Xavier Tronchère¹, Alain Devaux^{1,2}

¹ Université de Lyon, UMR LEHNA 5023, F-69100, Villeurbanne, France

² INRA, USC IGH 1369, ENTPE, F-69518, Vaulx-en-Velin, France

Abstract

Amongst DNA repair process, BER (Base Excision Repair) is the major mechanism for repairing of DNA base lesions caused by environmental genotoxicants. BER has been proven to exist in fish but has not been investigated in fish cell lines although they constitute growing tools in ecotoxicology assessment. The present study aims at highlighting BER capacity of RTL-W1 and RTG-W1, two trout cell lines used in ecogenotoxicity. This is realized following the strand breaks repair kinetics after short exposure to model genotoxicants leading predominantly in BER specific lesions, by means of the standard alkaline and Fpg-modified comet assays. Results show that both cell lines repair efficiently single strand breaks and base alkylation damages within 4 h and 24h respectively. Then, the study shows that according to minor modifications of the protocol, the cell extract-based BERc assay can be used to evaluate the base incision capacity of the cell lines and its variation after cell exposure to a BER model inhibitor (3-aminobenzamide) and environmental contaminants such as cadmium and tributyltin. This work provides a basis for the further development of DNA repair activity in fish cell lines as a new genotoxicity biomarker.

Keywords: Fish cell lines, Base Excision Repair, Comet assay, DNA repair

1. Introduction

In contaminated environments, the loss of DNA structural or functional integrity in exposed organisms can have delayed consequences at the population level, especially when fitness is affected through impaired growth or reproduction [1,2]. For these reasons, development of genotoxicity biomarkers represents a stimulating challenge in ecotoxicology. Primary DNA damage is one of the most frequently used biomarker in aquatic organisms [3,4], although a large array of such lesions are likely to be repaired. Thus, genotoxicity assessment would gain from a better knowledge of DNA repair capacity of the biological models used. Furthermore, since several contaminants can affect DNA repair processes, the variation of DNA repair capacity could be used as a valuable biomarker of exposure in ecotoxicological survey [5-7].

Amongst DNA repair processes, BER is the major mechanism for repairing DNA base lesions and single strand breaks. BER is initiated by removal of the damaged base by DNA glycosylases followed by cleavage of the phosphodiester backbone by an apurinic/apyrimidic endonuclease (APE) generating single strand breaks. Further repair can be accomplished via two pathways that results in replacement of one (short-patch pathway) or more (long-patch pathway) nucleotides. The BER has been described in fish [8-10] but not yet in fish cell lines although they are recognized as growing tools in ecotoxicology [11], and suspected to possess rather low overall DNA repair activity compared with mammals [11,12]. This important point could influence their sensitivity in genotoxicity testing, and consequently, it deserves to be studied more in detail [13].

RTL-W1 and RTG-W1, derived from rainbow trout liver and gill respectively, have been widely used for cytotoxicity and to a lesser extent for genotoxicity assessment [14-18]. A rather simple way to measure primary DNA damage such as single and double-strand breaks (SSB, DSB), alkali-labile sites (ALS) and SSB associated with excision repair sites is the comet assay, described as a rapid, sensitive and inexpensive method [19]. The addition of a digestion step with specific endonucleases allows the detection of other kinds of DNA lesions, converted into additional breaks [20,21], and has been shown to be applicable to those fish cell lines [22]. Another variant of the comet assay named Base Excision Repair comet assay (BERc) was developed to measure the capacity of lymphocyte cell free extracts to perform the initial step (i.e. damage recognition and incision) of the BER pathway when applied on a substrate DNA carrying 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) lesions [23].

The first aim of the study was to evaluate the DNA repair capacity of RTL-W1 and RTG-W1 cell lines through kinetic studies of residual damage level after exposure to two model genotoxicants, both leading predominantly to BER substrate lesions: Hydrogen peroxide (H₂O₂) as an oxidant inducing a majority of single strand breaks and methyl methane sulfonate (MMS) as a model SN₂ alkylating compound [24]. The level of residual primary DNA damage along with time was measured with the alkaline comet assay and the formamidopyrimidine-DNA glycosylase (Fpg)-modified comet assay. The second purpose of this work was to optimize the BERc assay protocol in order to use it with fish cell lines and to evaluate its potential to provide a relevant biomarker for environmental genotoxicity assessment purpose.

2. Materials and Methods

2-1. Cell lines

RTL-W1 [25] and RTG-W1 (ATCC CRL-2523) [26] are non-transformed rainbow trout cell lines respectively coming from liver and gill epithelium. Cells were routinely cultured in 75 cm² culture flasks (Nunc) at 20 °C in Leibovitz's (L-15) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL) in CO₂-free incubators. In the applied culture conditions, cells showed a lag time of about 24h and an exponential growth for the next 2-3 days. They were trypsinized at 80% confluence (generally 4 days post-seeding with a seeding density of 150 000 cells/ml) using 0.25% trypsin with 0.03% EDTA. All experiments described in this paper were realized with growing cells (aged 24 to 48h post-seeding), and seeded at 150 000 and 200 000 cells/ml for RTL-W1 and RTG-W1 respectively. Cell passages from 70 to 85 were used for RTL-W1 and from 17 to 30 for RTG-W1.

2.2 Reagent and chemicals

All cell culture reagents were provided by Gibco® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). All chemicals used for exposure (methyl methane sulfonate , CAS number 66-27-3; 99% purity), 3-aminobenzamide (3AB, CAS number 3544-24-9; 99% purity), cadmium chloride (Cd, CAS number 10108-64-2; 99% purity), tributyltin (TBT, CAS number 1461-22-9; 96% purity), as well as chemicals used for the comet assay and protein content, were supplied by Sigma Chemicals™ (St Quentin Fallavier, France). Formamido pyrimidine

glycosylase (Fpg) was purchased from New England Biolabs (Evry, France). Photosensitizer Ro 19-8022 was kindly provided by Hoffman La-Roche (Basel, Switzerland).

2-3. Total repair kinetic measurement

In order to evaluate their capacity to repair various BER substrate DNA damage, both exponentially growing cell lines were exposed to H₂O₂ (10μM in PBS, 10 min, 4°C) or to MMS (0.4 or 1 mM, 15 min, 20°C in complete L-15 medium) (Fig. 1).

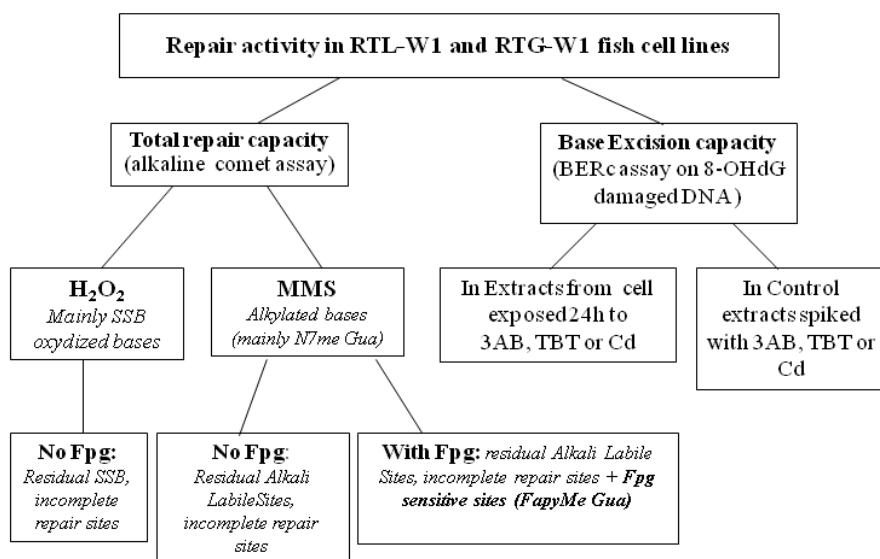


Fig 1: Flow diagram of the overall experimental design used to study DNA repair and BER capacity in RTL-W1 and RTG-W1 fish cell lines.

Following exposure, cells were washed with PBS, complete L-15 medium was added and cells were left to repair for various times at 20°C. The residual DNA damage level was followed with the alkaline comet assay during 4h post-exposure to H₂O₂ and during 24h post-exposure to MMS. As 24h corresponds to a third of the cell cycle, MMS-exposed cells were treated or not with 2.5 mM of the BER inhibitor 3AB during the repair period, in order to check for a possible cell growth dilution effect on the remaining DNA damage level. At each repair time, cells were collected by trypsinization and were immediately processed for alkaline comet assay with or without a Fpg digestion step in the case of MMS, exactly as described before [22]. The use of the Fpg-modified comet assay allowed for the accurate detection of N7-methyl guanine transformed in fapy-methyl guanine by the alkaline condition of the assay. Three independent replicate experiments were performed for each condition tested. In order to focus on the direct rejoining of single-strand breaks, Fpg-modified comet

assay was not used after H₂O₂ exposure. Cell viability was previously tested (Cell Titer Blue®, Promega, Charbonnières-les-Bains, France) in order to check for a possible delayed cell mortality following the initial genotoxic stress and was always found above 90% (data not shown).

2-4. Base Excision Repair comet assay (BERc)

The protocol of the Base Excision Repair comet assay (BERc) was adapted to the two fish cell lines from [23] in order to i) assess their ability to complete the first steps of the BER process ii) to further evaluate DNA repair efficiency measured through BERc as a potential biomarker. In the BERc assay, a cell free extract of the studied cells is applied on 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) damaged DNA embedded in agarose, in order to assess its damage recognition and incision capacity. Following this digestion step, DNA unwinding and electrophoresis in alkaline conditions, a higher amount of strand breaks indicates a higher activity of repair enzymes. In order to validate DNA repair measured by BERc as a possible biomarker, two series of experiments were performed (Fig. 1): first, cell extracts were prepared from cells exposed for 24h to a single concentration of various chemicals; second, control cell extracts were spiked just prior to the assay with increasing concentrations of the same chemicals.

Preparation of cell extracts

Exponentially growing cells were exposed (or not for control) for 24h to various conditions: 2.5 mM 3AB in complete L-15 medium, 5 µM Cd in L-15 medium without FBS or 10 µM TBT in L-15 medium with 2% FBS. These concentrations were chosen because non cytotoxic and able to modulate DNA repair according to literature [27-29].

Control and exposed cells were trypsinized, counted, centrifuged (10 min, 800g, 4°C), and the cell pellet suspended in cold PBS at a cell density of 3.10⁶ cells/ml (optimized in a preliminary experiment). One mL aliquots were centrifuged (6 min, 14 000 g, 4°C) and the resulting “dry cell pellet” was flash-frozen for 1 minute in liquid nitrogen and then stored at -80°C until use. Just prior to an assay, an aliquot was thawed and lysed with 65 µL buffer A (45 mM HEPES, 0.4 M KCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 0.25% Triton X-100, pH 7.8). After vortexing and 5 min incubation on ice, the lysate was centrifuged (6 min, 1400g, 4°C) to remove nuclei and cell debris. Fifty-five µL of the supernatant were then mixed with 245 µL of reaction buffer F (0.1 M KCl, 0.5 mM Na₂EDTA, 40 mM HEPES, 0.2 mg/mL bovine serum albumin, pH 8.0) and kept on ice until

rapid use (Fig.2). The total protein content of the cell extract was determined with the fluorescamine assay according to [30], using bovine serum albumin (BSA) as a standard. Three totally independent cell extracts realized at different dates were prepared per condition.

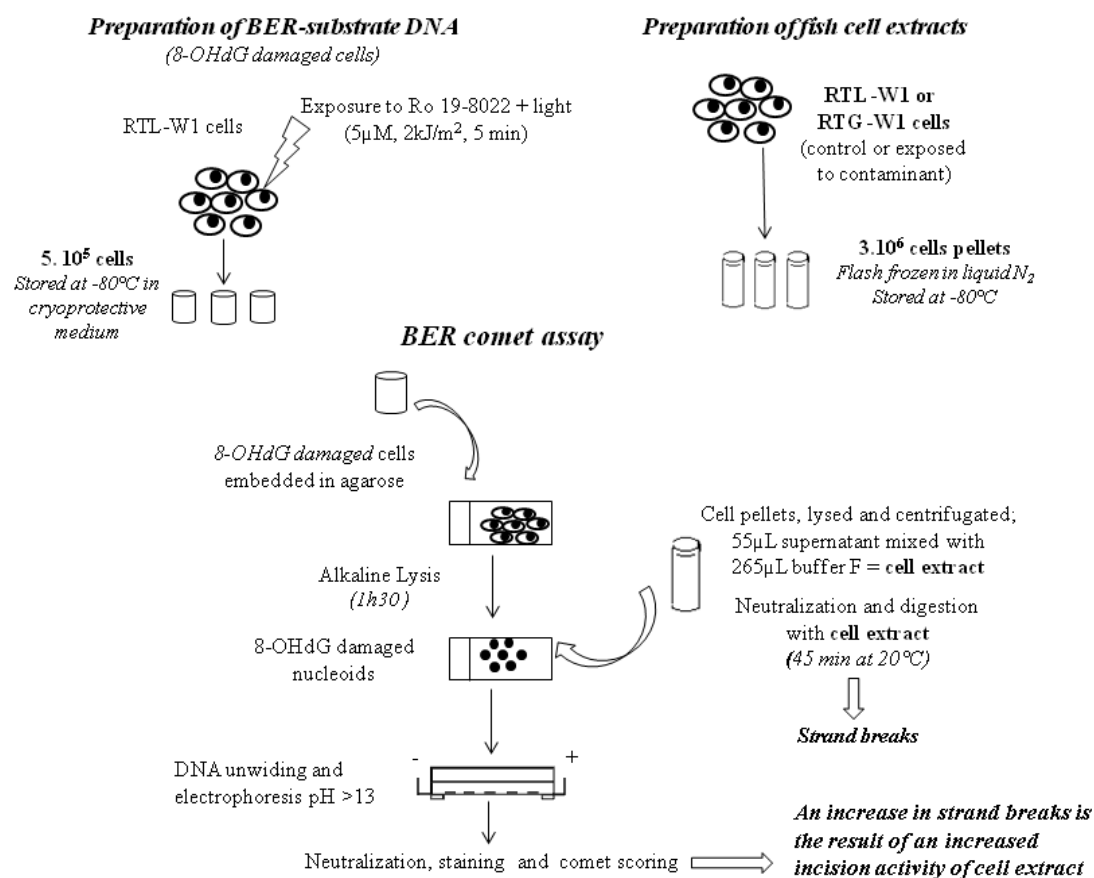


Fig. 2: Summary of the BERc assay protocol optimized for fish cell lines.

Preparation of cells containing substrate DNA

In order to generate 8-OHdG damaged DNA, exponentially growing RTL-W1 (liver cells were chosen on an arbitrary basis), cells were exposed on ice to 0.5 μM of the photosensitizer Ro 19-8022 in PBS, in the presence of visible light (2 kJ/m^2 between 400 and 700 nm). After trypsinization, aliquots of 5.10^5 cells in 1ml of a freezing medium were frozen slowly ($-1^\circ\text{C}/\text{min}$) and stored at -80°C . Control undamaged DNA was prepared in the same way with cells non-exposed to Ro 19-8022 and light (Fig. 2).

BERc assay with extracts prepared from exposed cells.

Aliquots of control and Ro 19-8022 treated cells containing 8-OHdG substrate DNA were thawed, diluted with 10 mL of L-15 medium and centrifuged (6 min, 400 g, 4°C). The

cell pellet was suspended in 0.5 mL of L-15 medium and was used to prepare gels (2 mini-gels per slide) that were processed until the end of the lysis step with the standard alkaline comet assay protocol as described in Kienzler et al. [22]. After lysis, slides were washed (3 times, 5 min) with cold reaction buffer F and incubated at 20°C in the dark for 45 min (optimized duration established in a preliminary experiment) either with 30 µL of cell extract (stemming from control, 3AB, TBT or Cd treated cells as described above), with F buffer alone or with Fpg enzyme (0.4 UI/gel as a positive control). Then, DNA unwinding, electrophoresis and comet scoring were performed as described in [22].

Three independent BERc assays were realized, each with a newly prepared extract but using substrate DNA coming from the same batch. Within each BERc assay, the % tail intensity (%TI) of 50 randomly selected cells was scored per gel and 2 gels were realized per sample. This procedure resulted in 6 median %TI values for each condition tested. The total protein content of each extract was used to adjust the % TI to a standardized amount of protein.

BERc assay with control extracts spiked with contaminants

Here, only extracts prepared from unexposed control cells were used. Fifty-five µL of the cell extract were combined with 245 µL of cold reaction buffer F containing a concentration range of the studied agents (3AB, TBT or Cd). Three independent experiments were performed exactly as described for exposed cells before.

2-5. Statistical analysis

Results are expressed as the mean and standard deviation of median % TI values of three independent experiments, each comprising internal duplicates.

For repair kinetics, data were analyzed using Student t-test (Statistica©-StatSoft, Inc.), to compare for each repair time, the residual %TI in exposed cells with the corresponding %TI in unexposed control. In the case of MMS-exposed cells, %TI obtained with or without 3AB were also compared.

The Student t-test was also used for the BERc assay experiment applied to extracts prepared with 3AB, TBT, and Cd exposed cells, to compare the resulting %TI (corresponding to the incision capacity) with %TI of control extracts.

To analyze the dose-response relationship obtained when applying the BERc assay to control cell extract spiked with various concentrations of contaminants, a one-way ANOVA was used. Tukey's HSD post-hoc test was run to determine concentrations that differed statistically from the control.

3. Results

3.1 Global repair kinetics

Oxidation and SSB repair after exposure to H₂O₂

For both cell lines, the basal DNA damage level in control cells was very low (0.94 %TI \pm 0.38 in RTL-W1 and 0.94 %TI \pm 0.66 in RTG-W1) and did not change significantly between the beginning and the end of repair experiment (Fig. 3). As a consequence, detailed control values were not reported on the figure for the sake of clarity. Initial DNA damage stemming from H₂O₂ exposure was about two-fold higher in RTL-W1 than in RTG-W1 (59 %TI \pm 9.38; vs 33%TI \pm 6.05). However, a similar trend in repair kinetics was obtained for the two cell lines with a rapid repair rate during the first 40 minutes and a half time for repair around 10 minutes and a substantial recovery within 1 to 2h in both cases. After 1h, although the repair seems almost complete, there was still a significant difference with the control and the complete repair was achieved after 4 hours for both cell lines.

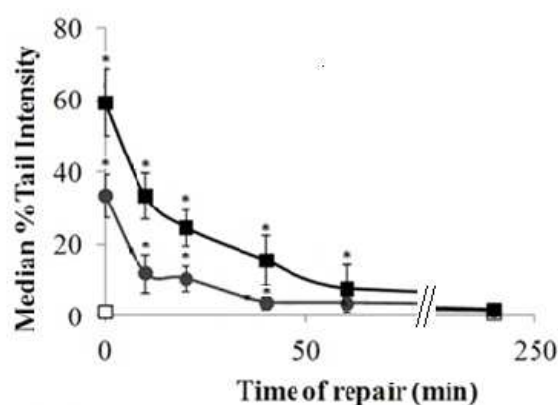


Fig. 3: Repair kinetics after H₂O₂ exposure (10 min, 10 μ M), residual damage level detected by the alkaline comet assay in RTL-W1(■) and RTG-W1(●)

□: damage level in controls. Results are mean \pm SD of three independent experiments. *: significant difference between exposed and control cells (t-test, $p < 0.05$) for each experimental time.

Alkylation damage repair after MMS exposure

There was no effect of 3AB on basal DNA damage in non-exposed control cells (data not shown to improve clarity). Without 3AB, level of residual DNA damage revealed by the alkaline comet assay (Fig. 4.A) showed a similar trend for both cell lines, with a rather constant repair rate during the first 16 hours (0.42 %TI/h \pm 0.05 and 0.99 % TI/h \pm 0.24 for

RTL-W1 and RTG-W1 respectively) followed by a slow-down in repair rate between 16 and 24h. Later on, although close to the basal damage level, there was still a significant difference between control and MMS exposed cells in both cell lines. When applying the Fpg-modified comet assay (Fig. 4.B), the same initial level of DNA damage was observed for both cell lines but the repair rate during the first 16 hours was slower in RTG-W1 (0.85 %TI/h \pm 0.17) than in RTL-W1 (1.86 %TI/h \pm 0.25). However, after 24h, the difference between exposed and control cells was not significant anymore in both cases.

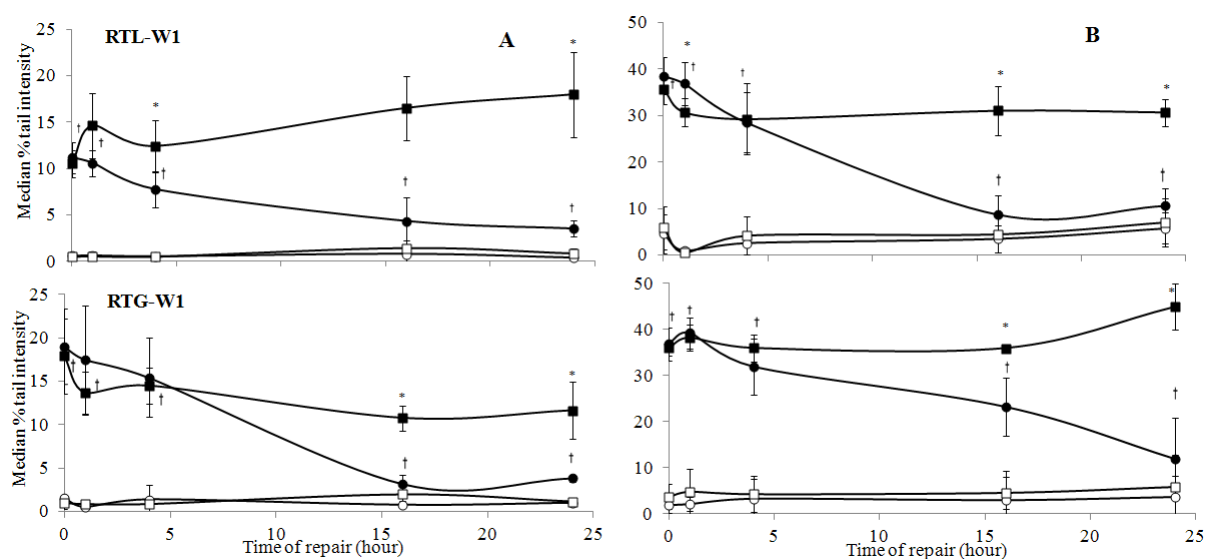


Fig. 4: Repair kinetics after a 15 min MMS exposure in RTL-W1 and RTG-W1

A: residual damage level detected by the alkaline comet assay (1mM MMS,) ; **B:** residual damage level detected by Fpg-modified comet assay that reveals Fpg-sensitive site such as Fapy Me Gua (0.4mM MMS), with (■) and without (●) the BER inhibitor 3-AB. Results are mean \pm SD of three independent experiments. *: significant difference between damage level with and without 3AB (t-test, $p < 0.05$). †: significant difference between damage level in cells exposed without 3AB and the corresponding control (t-test, $p < 0.05$). ■ MMS with 3AB ● MMS without 3AB, ○ no MMS, no 3AB

3.2 Base Excision Repair comet assay with fish cell lines

Validation of the BERc protocol with fish cell lines

As shown in figure 5, cell extracts resulting from the optimized protocol were found to be almost free of non-specific nuclease activity by exhibiting a very low basal incision activity (around 2%TI) in control using undamaged substrate DNA. With 8-OHdG damaged DNA, a clear incision activity was measured in the extracts prepared from both cell lines (38.57 %TI \pm 5.23 and 38.41 %TI \pm 6.61 tail intensity in RTG-W1 and RTL-W1 respectively). In order to complete the validation of the BERc protocol with fish cell lines, the incision capacity of cell cultivated in various conditions of serum supplementation was checked. No difference was found between 0, 2 or 10% FBS in the culture medium for both cell lines (data not shown). In the same way, the incision capacity of extracts prepared from cells aged contrasted passages was assessed and showed no significant difference although a slight decrease was noticed with aging for RTL-W1 (37.8 vs 32.3 %TI at P17-26 and 90-99 respectively).

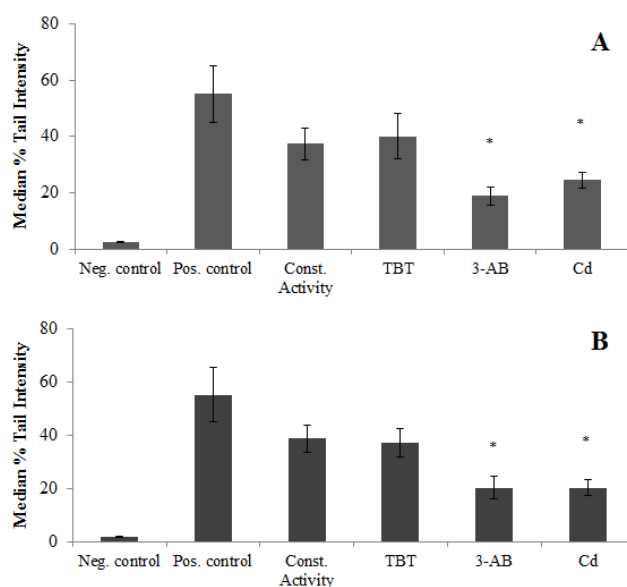


Fig. 5: Base excision capacity of RTL-W1 and RTG-W1 cell extracts assessed with the BERc assay in RTL-W1 (A) and RTG-W1 (B) fish cell lines.

Negative control: residual excision activity of extracts on undamaged substrate DNA. Positive control: excision activity of Fpg on 8OH-dG damaged DNA. Constitutive extract activity: extract incision activity on 8-OHdG-damaged DNA. TBT, 3AB, Cd: extract incision activity after a 24h exposure to 0.1 μ M TBT, 2.5 mM 3AB or 5 μ M Cd. *: significant difference when compared to constitutive extract activity (t-test, $p < 0.05$). Results are mean \pm SD of three independent experiments.

BER activity as a genotoxicity biomarker

The optimized protocol was used to study the effect of the model BER inhibitor 3AB and of two environmental contaminants (TBT and Cd) suspected to interfere with DNA repair. When extracts were prepared after a cell exposure to 3AB and Cd (Fig. 5), the assay revealed a significant decrease in incision capacity toward the BER sensitive sites of the substrate DNA in both cell lines, but this effect was not found after a TBT treatment of the cells.

The dose-response relationships of increasing doses of the three contaminants directly spiked in extracts prepared from control cells are shown in figure 6.

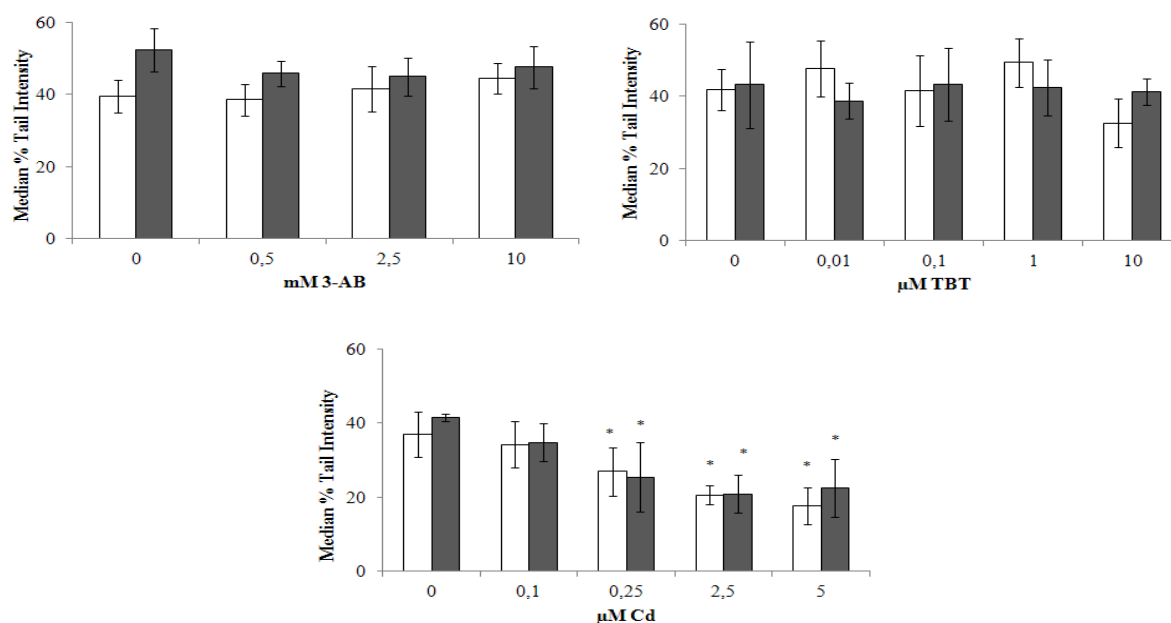


Fig. 6: Base excision capacity of control cells extract of RTL-W1 and RTG-W1 spiked with various concentrations of 3AB (top), Tributyltin (middle) and Cadmium (bottom).

Open bars: RTL-W1, dark bars: RTG-W1. Results are mean ± SD of three independent experiments.

*: significant difference between the excision capacity of the extract when compared to the control.

ANOVA, and Tukey's HSD post-hoc test, $p < 0.05$.

Only cadmium exhibited a dose-response relationship regarding BER activity with a significant decrease in incision capacity starting at 0.25 µM for both cell lines. The inhibitory effect of 5 µM Cd spiked in extract is in the same range as in extracts prepared from 5 µM Cd exposed cells for 24h. Contrary to the result of the exposed-cell experiment, direct addition of 3AB in a control extract does not interfere with the incision activity at any of the concentration tested. In the case of TBT, alike what was found in the TBT exposed-cells, no

inhibitory effect was noticed with RTG-W1 extract, whereas incision capacity of RTL-W1 decreased at the highest concentration tested (10 μM), although in a non-significant way.

4. Discussion

4-1. Repair kinetics

To study single strand break repair, exposure to 10 μM H_2O_2 , which causes a high amount of such damage [31] was chosen. Both cell lines exhibited an efficient SSB repair capacity with a half time for repair around 10 minutes and a substantial recovery within 1 to 2h in both cases. This result is coherent with those obtained with HeLa cells and human lymphocytes, reported to repair SSBs after exposure to H_2O_2 within 2 hours. In this case, the half time for repair was longer than in our study (1h) but this could be related to the stronger H_2O_2 treatment applied (100 μM) [32-34]. Lorenzo et al. [35], showed a half time of repair of 10 min in HeLa cell and 20 min in Caco-2 cells after 5 min of exposure to 30 and 20 μM H_2O_2 respectively, the damage being totally repaired within 1 hour in this case. Therefore, the repair capacity of SSB in RTL-W1 and RTG-W1 does not differ to what was found in human cell lines.

After MMS exposure leading principally to methylated bases, the half time for repair is approximately 10 hours, thus much longer than with SSB rejoining. This difference is probably related to the fact that SSB stemming from H_2O_2 treatment would not require the nicking by glycosylase and APendonuclease1 described as the most limiting steps of the BER process while N-methyl guanine generated by MMS would requires this slower step. This result is coherent with others obtained in mammals describing that the time course of repair might differ with the type of lesion [36].

The cell cycle of RTL-W1 and RTG-W1 lasts around 3 days. Although not as critical as for rapidly growing cells, a 24h kinetic would still allow for a significant increase in cell number. To avoid this artifact, the PARP 1 inhibitor 3AB [28], already proven to be efficient *in vivo* in fish [14], was used in MMS repair kinetics. 3AB was efficient to inhibit the repair of MMS-induced damage demonstrating that 1) the BER process is PARP-dependent in those fish cell lines and that 2) the repair kinetics observed cannot be confounded with undamaged newly divided cells.

The predominant adduct resulting from MMS exposure is N7-methylguanine (N7-MeG), a well-known BER substrate [37]. Alkaline condition converts a part of the N7-MeG adducts into some ring-opened methyl-formamidopyrimidine adducts (Fapy MeG), which are

in turn, highly resistant to strand breakage [38] and unrevealed with the standard comet assay but detected when using the Fpg-modified comet assay [39]. Thus, we assume that repair kinetics realized applying the Fpg-modified comet assay allowed to follow the repair of most of N7-MeG, included those converted into FapyMeG adducts. Here, the amount of Fapy MeG lesions generated by MMS treatment was prevailing since it was necessary to decrease the MMS treatment from 1 mM (standard comet assay) to 0.4 mM when applying the Fpg-modified version, in order to get an acceptable level of initial damage (around 50 %TI). In turn, this means that the standard comet assay kinetics following 1 mM MMS exposure describe only the repair of SSB, DSB, alkali-labile sites and endogenous incision repair sites. In these 1mM exposed cells, unrevealed lesions are likely still present after 24h and the remaining damage (low but still significantly above the control) stems probably from the activity of endogenous excision repair sites.

Concerning N7-MeGua lesions (mainly revealed as Fpg-sensitive sites), the repair seems completed within 24h in both cell lines, but RTG-W1 exhibits a slower repair than RTL-W1 until 16h. This could reveal a tissue specificity, because in fish, some DNA repair activities have been proven to vary greatly between tissues [9,40]. Such differences are also described between mammalian cells resulting in a range of repair times varying from 2 to 24h [21,35,41].

4-2. Base Excision Repair Comet assay

Only a few modifications to the protocol proposed by Collins et al. [29] such as the incubation time (45 min vs 30 min) and the cells concentration of the extract ($3 \cdot 10^6$ fish cells vs $5 \cdot 10^6$ for lymphocytes) were necessary to apply the assay to fish cell lines. In order to complete the validation of this assay, a few other points were checked, such as the optimal Ro 19-8022 treatment for substrate DNA preparation. The 0.5 μ M Ro 19-8022 treatment for 5 min was chosen in order to generate a damage level in substrate DNA around 50% tail intensity in order to allow the detection of a decrease or an increase of the incision activity of the extract, since it has been reported that some agents can also have a stimulatory effect on repair activity [35]. With the adopted protocol, the constitutive level of incision of the extracts was lower than the positive control using purified Fpg. Such a result demonstrates that substrate DNA availability is not a limiting factor when testing the repair activity of extracts. Some authors have reported a decrease of DNA repair efficiency at late passage [41], whereas other did not [42]. In the present study, no difference on the incision capacity between distant

cell passage numbers was observed. This could be explained by the continuous and non-cancerous character of those cell lines, whereas in the literature, effect of cell passage on DNA repair has been mainly reported for cancerous mammal's cell lines or stem cells. The absence of non-specific endonuclease activity in extracts and the absence of effect of the serum level in exposure medium on repair activity, contrary to what was shown in human cell lines [43] strengthen the validity of the optimized protocol.

Since the BERc assay can quantify the constitutive BER incision activity in fish cell lines, the next step was to evaluate its potential to be used as a biomarker that could interestingly complement other genotoxicity endpoints such as primary DNA damage. For this, extracts prepared from cells exposed to contaminants or control extracts spiked with contaminants were submitted to the assay. A 24 hour exposure of cells to PARP inhibitor 3AB decreases the incision capacity of the extracts, but did not when spiked directly in the extract prepared with non-exposed cells. 3AB is commonly described to interfere with DNA repair by preventing the dissociation of PARP protein from DNA [28]. Therefore it should not impair the recognition and the incision step by the DNA glycosylases and AP endonucleases. This mechanism of action is coherent with the absence of effect observed with spiked extract. Nevertheless, the clear-cut inhibitory effect on the BER incision capacity obtained in exposed cells implies another underlying effect such as a down regulation of genes or inhibition of protein expression during the exposure resulting from the inhibition of the PARP. This should not be rejected because PARP is known to poly(ADP-ribosylate) numerous transcriptional factors and signaling molecules, and has various still unclear biological roles [44,45]. A 24h cell exposure to cadmium resulted in a significant decrease of the BER capacity in both cell lines and when directly mixed with the extract, Cd was still interfering with excision of the damaged bases in a dose-dependent manner and at concentration low enough (0.25 μM) to be environmentally relevant. These results demonstrate a direct interaction with enzymes involved in recognition and nicking of the 8-OHdG, that remains to be elucidated. Interestingly, the BERc assay apply to fish cell lines succeeds to confirm that cadmium genotoxicity stems at least partly from an inhibition DNA repair. Indeed, cadmium has been described to interfere with all major DNA repair systems [46] and has been suggested as a PARP inhibitor [47].

In the case of TBT, the results show that a 24hour exposure does not modulate BER incision capacity of RTG-W1 and RTL-W1 and that there is no direct interaction of TBT with the extract activity. Amongst the numerous biological effects attributed to this agent, TBT is

described genotoxic in molluscs [48], fish [49,50], and mammals [51,52]. It has also recently been shown to alter NER gene transcription [29]. However, according to the present work, this prevalent environmental contaminant cannot be suspected to act on DNA integrity through inhibition of BER excision steps.

5. Conclusion

This work combining assessment of whole repair kinetics and the BERc assay with cell extracts demonstrates the existence of measurable BER activity in RTL-W1 and RTG-W1. Active DNA repair systems are important characteristics to evaluate fish cell line as alternative systems to *in vivo* fish testing both for the regulatory genotoxicity screening of chemicals and in genotoxicity assessment of environmental contaminated matrixes in field risk assessment studies. The BERc assay applied to fish cell lines seems a promising approach to include a DNA repair biomarker in complement to the more classical genotoxicity endpoints such as the primary damage level [23,53].

Acknowledgements

The research was funded via the National School of Public Works (AK PhD grant N° 2009-056). The authors acknowledge Dr. L.E.J. Lee and Dr. N.C. Bols (University Wilfrid Laurier, Waterloo, Canada) for their kind authorization of holding the RTL-W1 cell lines for research purposes and Marion Pavan for her skillful help during preliminary experiments.

References

- [1] A. Devaux, L. Fiat, C. Gillet and S. Bony, Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*), *Aquat. Toxicol.* 101 (2011) 405-411.
- [2] E. Lacaze, A. Devaux, R. Mons, S. Bony, J. Garric, A. Geffard and O. Geffard, DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment, *Environ. Pollut.* 159 (2011) 1682-1691.
- [3] G. Frenzilli, M. Nigro and B.P. Lyons, The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 681 (2009) 80-92.
- [4] A.N. Jha, Genotoxicological studies in aquatic organisms: an overview, *Mutat. Res.* 552 (2004) 1-17.
- [5] D.R. Mc Neil, A. Narayana, H.-K. Wong and D.M. Wilson, Inhibition of Ape1 nuclease activity by lead, iron, and cadmium, *Environ. Health Perspect.* 112 (2004) 799-804.
- [6] A. Lankoff, A. Banasik, A. Diuna, E. Ochniak, H. Lisowska, T. Kuszewski, S. Gozdz and A. Wojcik, A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes, *Toxicol. Letters* (2006) 27-36.

- [7] J.-S. Rhee, R.-O. Kim, H.-H. Chang, J. Lee, Y.-M. Lee and J.-S. Lee, Endocrine disrupting chemicals modulate expression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (O⁶-MGMT) gene in the hermaphrodite fish, *Kryptolebias marmoratus*, *Comp. Biochem. Physiol. C*. 153 (2011) 141-149.
- [8] F.E. Ahmed, R.B. Setlow, E. Grist and N. Setlow DNA damage, photorepair, and survival in fish and human cells exposed to UV radiation, *Environ. Mol. Mutagen.* 22 (1993) 18-25.
- [9] T. Ishikawa, P. Masahito and S. Takayama, Usefulness of the medaka, *Oryzias latipes*, as a test animal: DNA repair processes in medaka exposed to carcinogens, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1984 (1984) 35-43.
- [10] S. Weber, Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase, *Biochim. Biophys. Acta- Bioenerg.* 1707 (2005) 1-23.
- [11] N.C. Bols, V.R. Dayeh, L.E.J. Lee and K. Schrimmer, Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in environmental toxicology, *Biochem. Mol. Biol. Fishes* 6 (2005) 43-84.
- [12] K.L. Willett, L.A. Lienesch and R.T. Di Giulio, No detectable DNA excision repair in UV-exposed hepatocytes from two catfish species, *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 128 (2001) 349-358.
- [13] A. Castaño, N. Bols, T. Braunbeck, P. Dierickx, M. Halder and B. Isomaa, The use of fish cells in ecotoxicology - The report and recommendations of ECVAM Workshop 47, *Altern. Lab. Anim.* 31 (2003) 317-351.
- [14] S. Nehls and H. Segner, Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay, *Environ. Toxicol.* 16 (2001) 321-329.
- [15] S. Keiter, A. Rastall, T. Kosmehl, K. Wurm, L. Erdinger, T. Braunbeck and H. Henner, Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the upper Danube river. A pilot study in search for the causes for the decline of fish catches, *Environ. Sc. Poll. Res. Int.* 13 (2006) 308-319.
- [16] P.S. Rocha, G.L. Luvizotto, T. Kosmehl, M. Böttcher, V. Storch, T. Braunbeck and H. Hollert Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): *In vitro* comet assay versus *in situ* micronucleus assay studies, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72 (2009) 1842-1848.
- [17] M. Boettcher, S. Grund, S. Keiter, T. Kosmehl, G. Reifferscheid, N. Seitz, P.S. Rocha, H. Hollert and T. Braunbeck, Comparison of *in vitro* and *in situ* genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 700 (2010) 11-17.
- [18] S.K. Bopp, H.K. Abicht and K. Knauer, Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells, *Aquat. Toxicol.* 86 (2008) 197-204.
- [19] A.R. Collins, V.L. Dobson, M. Dušinská, G. Kennedy and R. Stetina, The comet assay: What can it really tell us?, *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 375 (1997) 183-193.
- [20] A.R. Collins, M. Dušinská and A. Horska, Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay, *Acta Biochim. Pol.* 48 (2001) 611-614.
- [21] K. Hašplová, A. Hudecová, Z. Magdalénová, M. Bjøras, E. Gálová, E. Miadoková and M. Dušinská, DNA alkylation lesions and their repair in human cells: modification of the comet assay with 3-methyladenine DNA glycosylase (AlkD), *Toxicol. Letters* 208 (2012) 76-81.
- [22] A. Kienzler, X. Tronchère, A. Devaux and S. Bony, Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay, *Toxicol. in Vitro* (2012).
- [23] A.R. Collins, M. Dušinská, E. Horvathova, E. Munro, M. Savio and R. Stetina, Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured *in vitro* with the comet assay, *Mutagenesis* 16 (2001) 297-301.

- [24] P. Pourquier, La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie, *Bull. Cancer* 93 (2006) 214-144.
- [25] L.E.J. Lee, J.H. Clemons, D.G. Bechtel, S.J. Caldwell, K.-B. Han, M. Pasitschniak-Arts, D.D. Mosser and N.C. Bols, Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity, *Cell Biol. Toxicol.* 9 (1993) 279-294.
- [26] N.C. Bols, A. Barlian, M. Chirino-Trejo, S.J. Caldwell, P. Goegan and L.E.J. Lee, Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills, *J. Fish Dis.* 17 (1994) 601-611.
- [27] T. Fatur, T.T. Lah and M. Filipič, Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 529 (2003) 109-116.
- [28] J.L. Parsons, I.I. Dianova, S.L. Allinson and G.L. Dianov Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts, *FEBS Journal* 272 (2005) 2012-2021.
- [29] K. Zuo, C. Wang, M. Wu, Y. Wang and Y. Chen, Exposure to tributyltin and triphenyltin induces DNA damage and alters nucleotide excision repair gene transcription in *Sebasticus marmoratus* liver, *Aquat. Toxicol.* In press (2012).
- [30] A. Lorenzen and S.W. Kennedy, A Fluorescence-Based Protein Assay for Use with a Microplate Reader, *Anal. Biochem.* 214 (1993) 346-348.
- [31] B. Halliwell and O.I. Aruoma DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems, *FEBS Letters* 281 (1991) 9-19.
- [32] E.A. Prieto Gonzales, M. Ortega Soler, A.G. Fuch, R. Brito, A.M. Palermo, M. Martinez and E. Fuentes, Differences in DNA repair kinetics of lesions induced by hydrogen peroxide in lymphocytes from premenopausal breast cancer patients and healthy women resident in great Buenos Aires, *J. Med. Med. Sc.* 2 (2011) 1036-1046.
- [33] A.R. Collins and E. , Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: applications of the comet assay, *Biochem. Soc. Trans.* 29 (2001) 337-341.
- [34] A.R. Collins, A.-G. Ma and S.J. Duthie, The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells, *Mutat. Res.* (1995) 69-77.
- [35] Y. Lorenzo, A. Azqueta, L. Luna, F. Bonilla, G. Dominguez and A.R. Collins, The carotenoid β -cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells, *Carcinogenesis* 30 (2009) 308-314.
- [36] A.R. Collins, A.A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C.C. Smith and R. Štětina, The comet assay: topical issues, *Mutagenesis* 23 (2008) 143-151.
- [37] M.D. Wyatt and D.L. Pittman, Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks, *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 1580-1594.
- [38] T.R. Oconnor, S. Boiteux and J. Laval, Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to *in-vitro* DNA synthesis, *Nucleic Acids Res.* 16 (1988) 5879-5894.
- [39] G. Speit, P. Schutz, I. Bonzheim, K. Trenz and H. Hoffmann, Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay, *Toxicol. Letters* 146 (2004) 151-158.
- [40] W.M. David, D.L. Mitchell and R.B. Walter DNA repair in hybrid fish of the genus *Xiphophorus*, *Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol.* 138 (2004) 301-309.
- [41] T. Kaneko, S. Tahara, T. Taguchi and H. Kondo Accumulation of oxidative DNA damage, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, and change of repair systems during *in vitro* cellular aging of cultured human skin fibroblasts, *Mutat. Res.* 487 (2001) 19-30.

- [42] G.A. Hildrestrand, S. Duggal, M. Bjoras, L. Luna and J.E. Brinchmann Modulation of DNA glycosylase activities in mesenchymal stem cells, *Exp. Cell Res.* 315 (2009) 2558-2567.
- [43] M.E. Smith, L.L. Larcom and S.E. Freeman Serum effects on DNA repair in human cells, *Chem. Biol. Interact.* 54 (1985) 325-335.
- [44] S. Aoufouchi and S. Shall, Regulation by phosphorylation of *Xenopus laevis* poly(ADP-ribose) polymerase enzyme activity during oocyte maturation, *Biochem. J.* 325 (1997) 543-551.
- [45] R. Benjamin and D. Gill, Poly(ADP-ribose) synthesis *in-vitro* programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks, *J. Biol. Chem.* (1980) 21.
- [46] M. Filipič Mechanisms of cadmium induced genomic instability, *Mut. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 733 (2012) 69-77.
- [47] G. Bertin and D. Averbeck, Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review), *Biochimie* 88 (2006) 1549-1559.
- [48] A.N. Jha, J.A. Hagger and S.J. Hill Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*, *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 343-350.
- [49] L. Tiano, D. Fedeli, M. Moretti and G. Falcioni, DNA damage induced by organotins on -trout-nucleated erythrocytes, *Appl. Organomet. Chem.* 15 (2001) 575-580.
- [50] M.V.M. Ferraro, A.S. Fenocchio, M.S. Mantovani, C.D. Ribeiro and M.M. Cestari, Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests, *Genet. Mol. Biol.* 27 (2004) 103-107.
- [51] H.-G. Liu, Y. Wang, L. Lian and L.-H. Xu, Tributyltin induces DNA damage as well as oxidative damage in rats, *Environ. Toxicol.* 21 (2006) 166-171.
- [52] M.L. Falcioni, M. Pellei and R. Gabbianelli, Interaction of tributyltin(IV) chloride and a related complex [Bu₃Sn(LSM)] with rat leukocytes and erythrocytes: Effect on DNA and on plasma membrane, *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 653 (2008) 57-62.
- [53] A.R. Collins and I. Gaivão, DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies, *Mol. Aspects of Med.* 28 (2007) 307-322.

2 Les systèmes NER et PER dans les lignées RTL-W1 et RTG-W1

Pour aller plus avant dans la caractérisation des capacités de réparation des lignées cellulaires de poisson, nous avons exploré les cinétiques de réparation de dommages UV induits de type dimères de pyrimidine, qui constituent des substrats pour les systèmes Nucleotide Excision repair (NER) et Photoreactivation repair (PER). Ce travail a nécessité la mise au point préalable d'une version modifiée de l'essai des comètes par ajout d'une étape de digestion par la T4 endonucléase V ainsi que les conditions d'irradiation aux UVC des deux lignées afin de générer un niveau de dommage initial moyen (environ 50% TI), compatible avec le suivi de la réparation. L'ajout d'une étape de digestion par la T4 endonucléase V permet de révéler les lésions UV-induites résiduelles sous forme de cassures au cours du temps (dimères de pyrimidine cyclobutane). En effet, ce type de lésion n'est pas alcali-labile et l'essai des comètes dans sa version classique ne le révèle donc pas (Ravanat et al. 2001).

Nous présentons donc dans cette partie les grandes lignes des étapes de mise au point qui ont été nécessaires et les résultats obtenus pour les deux lignées qui ont fait l'objet d'une courte publication soumise au Journal of Photobiology and Photochemistry Part B : Biology.

2.1 Mise en place du protocole du suivi cinétique des systèmes de réparation NER et PER

➤ Objectifs

Il a tout d'abord été nécessaire de calibrer la lampe afin de définir l'irradiation reçue dans nos conditions d'exposition. Ensuite, la cytotoxicité et la génotoxicité d'une exposition aux UV ont été évaluées, de façon à déterminer l'exposition nécessaire à la genèse d'un dommage à l'ADN suffisant mais non saturant, d'environ 50-60% TI.

➤ Matériels et Méthodes

La lampe UVC utilisée est composée de 2 tubes Vilbert Lourmat T15-C (254 nm) équipés d'un cache rigide en carton de façon à limiter la puissance d'irradiation. Trois séries de mesures de l'irradiation reçue dans nos conditions pendant 70 minutes, sur une zone d'exposition bien définie, ont permis de déterminer le temps de chauffe de la lampe (40 minutes) et sa puissance d'émission stabilisée (0,05 J/m²/s).

La cytotoxicité induite est déterminée comme décrit précédemment (§B-I-2) pour des expositions allant de 0 à 300 secondes ; la génotoxicité a été déterminée à l'aide de l'essai des comètes T4-modifié pour des temps d'irradiation compris entre 0 et 100 secondes à une dose de 0,05 J/m²/s. L'endonucléase T4 (NEB M0308S) est appliquée à la dose de 6UI/gel dans son tampon d'activité dépourvu de DTT (25 mM Na₂PO₄, 100mM NaCl, 1 mM EDTA, 100µg/mL de BSA) pendant 30 minutes à 37°. Le niveau de fragmentation correspond aux sites T4 sensibles (dimères de pyrimidine cyclobutane) générés sur les lignées par l'irradiation UV.

➤ Résultats

Conditions d'irradiation aux UVC des cellules

Les résultats montrent qu'après 40 minutes la lampe atteint une émission stabilisée à 0,05 J/m²/s (Figure 38).

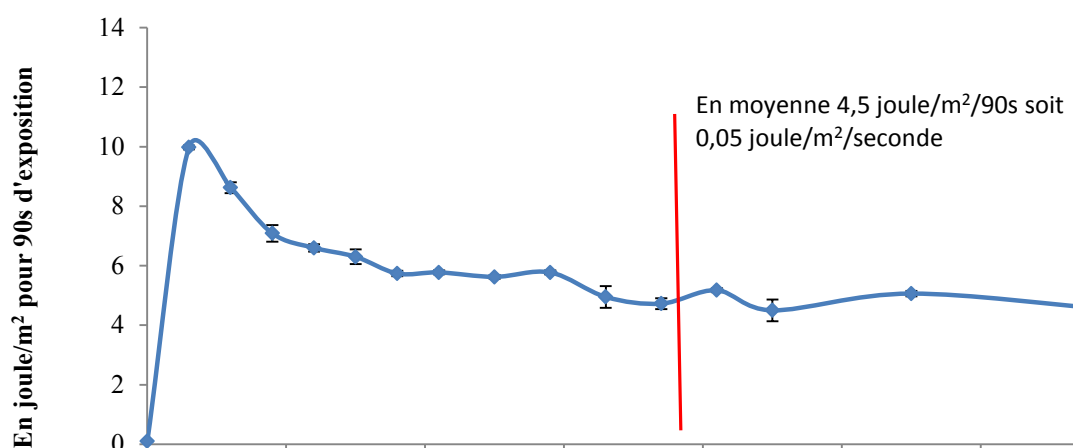


Figure 38 : Calibration de la lampe UVC

Les résultats de cytotoxicité des UV sont présentés dans la Figure 39. La viabilité reste supérieure à 85% pour les deux lignées jusqu'à 4 minutes d'exposition. Après 6 minutes d'exposition, elle passe à 78,9% pour RTG-W1 et 84,69% pour RTL-W1. Une exposition aux UVC jusqu'à 4 minutes peut ainsi être envisagée sans risque de générer de faux positif en essai des comètes.

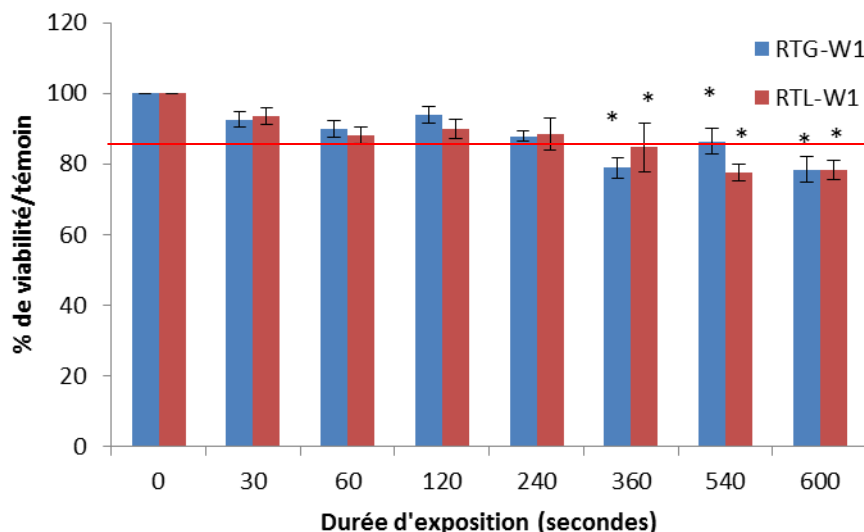


Figure 39 : Cytotoxicité immédiate des UVC sur les lignées RTL-W1 et RTG-W1.

Moyenne \pm SEM 2 réplicats, 6 puits par réplicat et par temps d'exposition. * : différence significative par rapport au témoin ($p < 0,05$), Test de Kruskal Wallis ; post-hoc : comparaison multiples des rangs moyens. La ligne rouge correspond à 85% de viabilité par rapport au témoin.

2.2 Caractérisation des capacités de réparation NER et PER chez les lignées cellulaires de poisson RTL-W1 et RTG-W1 : Publication IV

Kienzler et al., 2013. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 125 51-55.

Résumé : Une meilleure connaissance des capacités de réparation de l'ADN des lignées cellulaires de poissons contribuerait à établir leur intérêt pour l'évaluation de la génotoxicité et du risque environnemental, y compris pour l'évaluation des effets de l'augmentation des radiations UV chez les organismes aquatiques. Les mécanismes de réparation NER (Nucleotide Excision Repair) et PER (Photoreactivation Repair) sont les deux mécanismes de réparation de choix des lésions UV-induites. Dans ce travail, ces deux mécanismes sont caractérisés chez les deux lignées cellulaires de truite RTGill-W1 (branchie) et RTL-W1 (foie), au moyen d'un suivi cinétique utilisant l'essai des comètes T4-modifié. Cet essai permet de suivre spécifiquement la réparation des dimères de pyrimidines cyclobutanes.

Les deux mécanismes de réparation ont été mis en évidence chez ces deux lignées, le PER réparant beaucoup plus rapidement les lésions UV que le NER, avec des cinétiques de l'ordre de quelques heures et de plusieurs jours respectivement. Le NER est par ailleurs légèrement plus efficace dans la lignée de branchie que dans la lignée de foie.

UV-induced Nucleotide Excision Repair (NER) and Photoreactivation Repair (PER) in two trout fish cell lines used in ecotoxicological assessment

Aude Kienzler¹, Xavier Tronchère¹, Alain Devaux^{1,2}, Sylvie Bony^{1,2}

¹ Université de Lyon, UMR LEHNA 5023, F-69100, Villeurbanne, France

² INRA, USC IGH 1369, ENTPE, F-69518, Vaulx-en-Velin, France

Abstract

A better knowledge of DNA repair capacities in permanent fish cell lines would contribute to establish their interest in genotoxicity testing for environmental risk assessment studies including the effects of an increase in solar UV radiations on aquatic organisms. NER (Nucleotide Excision Repair) and PER (Photoreactivation Repair) are the two repair pathways of choice for UV- induced photo-lesions. In the present paper, these repair processes were characterized in the two rainbow trout cell lines, RTGill-W1 and RTL-W1 (liver), by means of a T4-modified comet assay which allowed to follow the cyclobutane pyrimidine dimers repair kinetics specifically. Both repair processes have been found in the cell lines, PER repairing much faster UV lesions than NER, and NER being slightly more efficient in the gill cell line than in the liver one.

Keywords: DNA repair, UV, fish cell line, genotoxicity.

1- Introduction

Among environmental stressors affecting DNA in aquatic organisms, physical stressor such as ultra violet radiations has been shown to impair recruitment and thus sustainability of natural populations. As an example, UV-photoproducts in the form of pyrimidine dimers (mainly cyclobutyl-pyrimidine photodimers -CPDs- and some pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts -6-4PDs-) have been described to reduce sperm motility and fertilization and to increase embryo malformations [1]. To prevent such deleterious effects, the nucleotide excision repair (NER) system plays a central role in the removal of a variety of DNA lesions such as bulky adducts, UV-induced pyrimidine dimers and inter-strand cross links. In fish, UV-photoproducts can also be repaired by a direct photoenzymatic repair (PER) [2, 3]. NER and PER pathways have been quite well studied in fish in vivo and particularly efficient NER and PER have been found in larval stages [4]. Results obtained in adult fish are more controversial due to great species and tissue specificities with liver generally described as poorly equipped to remove UV-photoproducts [5] and stable bulky adducts resulting from metabolically activated compounds such as aflatoxin B1 or polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [6, 7].

Established fish cell lines are of growing interest in ecotoxicological studies as they constitute reliable and easy-to-use biological devices proposed as an alternative to in vivo fish testing [8]. They are also useful in vitro models to study mechanisms of action and effects of contaminants and environmental stressors such as UV radiations on fish. To date, one limitation to a more intensive use of fish cell models lies in their insufficient characterization with respect to their cellular and functional properties. In particular, their capacity to repair various types of DNA damages has been very poorly studied although fish cell lines such as RTL-W1 and RTGill-W1 are increasingly used in genotoxicity testing [9-11]. Recently, efficient single strand breaks rejoining and repair of N7 methyl guanine adducts were shown, demonstrating for the first time the existence of active base excision repair systems in these cell lines [12].

The aim of the present work was to demonstrate presence of NER and PER systems for the first time in the rainbow trout liver RTL-W1 and gill RTGill-W1 cells lines by following UV photoproduct repair kinetics using an endonuclease T4-modified version of the comet assay, which allows the assessment of cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) repair. In order to generate a great majority of CPD dimers, that are specific substrates for NER or PER

systems, UVC exposure was chosen as a model DNA damaging agent [13].

2- Materials and methods

2.1 Fish cell lines

RTL-W1 and RTGill-W1 (ATCC CRL-2523) are non-transformed rainbow trout cell lines originating from liver and gill epithelium respectively. Cells were routinely cultured in a CO₂-free incubator at 20 °C in Leibovitz's (L-15) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL). Cells were sub-cultured when reaching 85-90% of confluency using a 0.25% trypsin solution containing 0.03% EDTA.

2.2 UVC-exposure

Exposure to UVC was realized 24h post-seeding using two Vilbert Lourmat T15-C lamps (254 nm) settled to deliver 0.05 J. m⁻².s⁻¹. In order to avoid photoactivation of culture medium compounds, exposure was realized in PBS after removing the lid of the plate lying on ice. In order to assess the sensitivity of both cell lines to UVC damage, a dose/response experiment was first performed by monitoring the DNA damage level in cells exposed to an UVC dose range of 0-5 J.m⁻² corresponding to 0 to 100 second exposure duration. For the repair kinetic experiments, intermediate UVC exposure conditions were applied to the cells, i.e. 1.75 J.m⁻² for PER and 2.5 J.m⁻² for NER assessment, as the NER process has been shown to be more efficient at higher dose of UV exposure. After exposure, PBS was replaced by complete L15 medium and cells were kept up to 48h at 20°C in the dark in the case of NER in order to avoid photorepair. In the case of PER, cells were kept under photoreactivating light (PRL - 1.65 J.s⁻¹.m⁻² 360-500 nm), i.e. visible light prone to activate the photolyases. The light was delivered by two KL200 LED light sources (Shott, Southbridge, MA, USA) for up to 9 h. Control cells were exposed to visible light alone (360-500nm) to check for a possible extra DNA damage related to the visible light exposure.

2.3 Cytotoxicity evaluation

In order to check for cytotoxicity, cell viability was measured in both cell lines at 4h, 24h and 48h post-treatment to UVC in 96 well black plates (Fluonunc) seeded with 25 000 cells per well, i.e. near confluency). The Cell Titer Blue® viability assay (Promega,

Charbonnières les Bains, France) was used according to manufacturer instructions. Three independent experiments, each comprising 6 wells per condition were realized.

2.4 Modified comet assay and kinetic measurements

For this experiment, cells were seeded in 12-well transparent plates (180 000 and 230 000 cells per well for RTL-W1 and RTGill-W1 respectively, i.e. near confluency). The progress of DNA repair was determined by assessing the decrease in UV-photoproducts over time. DNA damage was measured by means of a modified-alkaline comet assay using a digestion step by the T4-PDG (pyrimidine dimer glycosylase) restriction enzyme (New England Biolabs). In this modified assay, remaining cyclobutane pyrimidine dimers (that are not alkali labile sites, thus cannot be revealed by the standard version of the assay) are recognized and cleaved by the T4-PDG enzyme, resulting in strand breaks which are quantified after the differential electrophoretic migration of the DNA at the single cell level. The modified comet assay was performed according to Kienzler et al. [14], except that T4-PDG was used instead of Fpg enzyme. T4-PDG was diluted in a buffer containing 25 mM Na₂PO₄, 100mM NaCl, 1 mM EDTA, 100 µg.mL⁻¹ BSA. Six UI of enzyme were added to each gel, control gels received buffer only. Fifty single cells were scored per gel resulting in a median Tail Intensity value (%TI), with two gels prepared per treatment. Each experiment was carried out in 3 independent replicates and results are expressed as the mean ± SD of 3 mean %TI values. The repair progress (T4-PDG sensitive sites) was determined at 0, 1, 3 and 9 hours after UVC exposure to follow PER process. In the case of NER, the repair was followed at 0, 1, 3, 16, and 24h and 48h post-UVC exposure.

3- Results

3.1 UVC cytotoxicity

	4h		24h		48h	
	no UV	UV	no UV	UV	no UV	UV
RTL-W1	19.0 ± 0.49	19.5 ± 0.41	18.6 ± 0.23	19.1 ± 0.56	18.64 ± 0.72	18.59 ± 1.30
RTGill-W1	27.3 ± 1.16	26.2 ± 1.44	26.7 ± 1.05	25.7 ± 1.80	25.12 ± 2.83	26.53 ± 0.91

Table 1 : Effect of a 2.5 J.m⁻² UVC treatment on RTL-W1 and RTGill-W1 cells viability 4h, 24h and 48h post-treatment. Results are expressed as fluorescence (arbitrary unit, 10³). Data correspond to the mean ± SEM of three independent experiments.

As shown in Table 1, in all tested conditions including controls, no significant cell growth occurred and cell viability remained constant during the experiment. UVC exposures did not result in any delayed cytotoxicity up to 48h after treatment in both cell lines.

3.2 UVC exposure

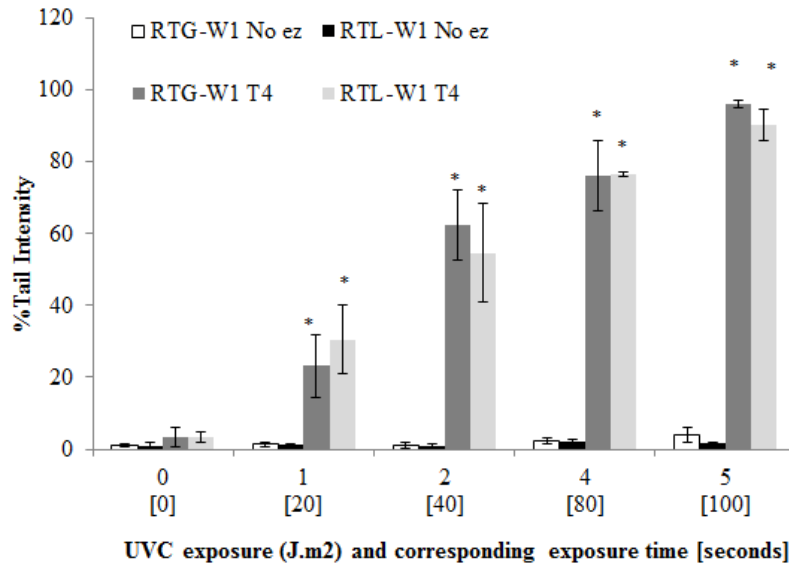


Figure 1: DNA damage level after various UVC exposure conditions in RTL-W1 and RTGill-W1 fish cell lines as revealed by standard and T4-modified comet assay.

Results are expressed as mean \pm SD of three independent experiments, * significant difference compared to the corresponding control (0 UVC exposure - Mann & Whitney U test, $p < 0.01$).

According to the UVC dose-DNA damage response revealed by the T4-modified comet assay, an exposure range between 30 and 45 seconds (corresponding to 1.75 to 2.5 J.m⁻²) was chosen to generate a moderate amount of initial T4-sensitive sites in the further kinetic repair studies. Such a previous check was necessary to ensure no overwhelming of the T4-modified assay and thus, to guaranty no false result in the first hours of the repair studies that could stem from a comet assay signal saturation.

A clear UVC dose / DNA damage response was observed in both fish cell lines when the T4 modified comet assay was applied (Figure 1). Both cell lines showed the same sensitivity profile toward UV. At the rather low UV doses tested here, the standard alkaline version of the comet assay did not reveal any additional strand breaks compared with unexposed cells.

3.3 Repair Kinetics

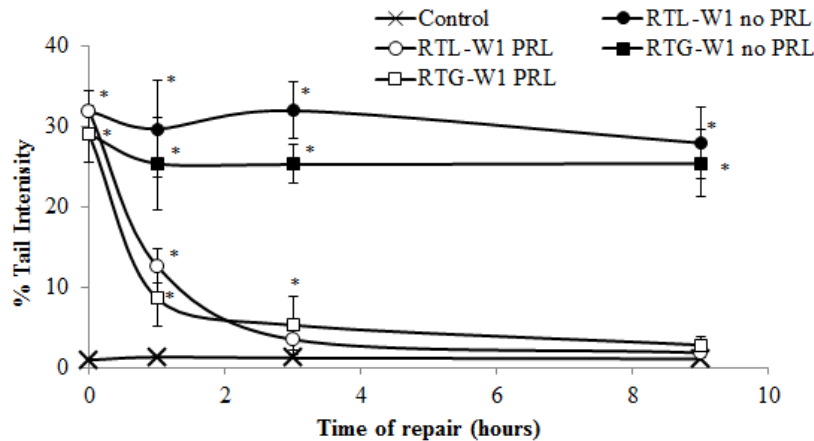


Figure 2 : Photoenzymatic repair kinetics of T4-sensitive sites for RTL-W1 and RTGill-W1 cell lines after exposure to 1.75 J.m⁻² UVC. Control: UVC treated cells, no enzyme. *: Significant difference when compared to corresponding control ($p < 0.05$, mean of $3 \pm SD$ independent experiments).

As shown in Figure 2, PER occurs in both cell lines. As soon as one hour after UVC exposure, 58% and 71% of the initial damage has been repaired in RTL-W1 and RTGill-W1, respectively, which corresponds to a half repair time of 49 minutes for RTL-W1 and 42 minutes for RTGill-W1 respectively. Within 3 hours, there is no more significant difference between RTL-W1 cells exposed to UV and non-exposed control cells (data not shown). Without photoreactivating light (corresponding to the NER conditions), no repair was observed in both cell lines during the 9 hour-recovery period.

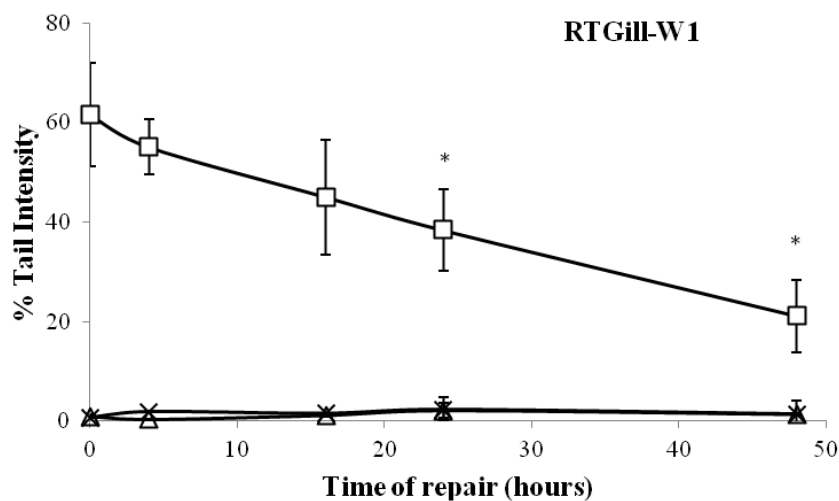


Figure 3: NER kinetics of T4-sensitive sites in RTGill-W1 fish cell line after exposure to UVC. *: Significant difference with initial DNA damage (ANOVA - Dunnet post-hoc test). Results are mean \pm SD of 3 independent experiments.

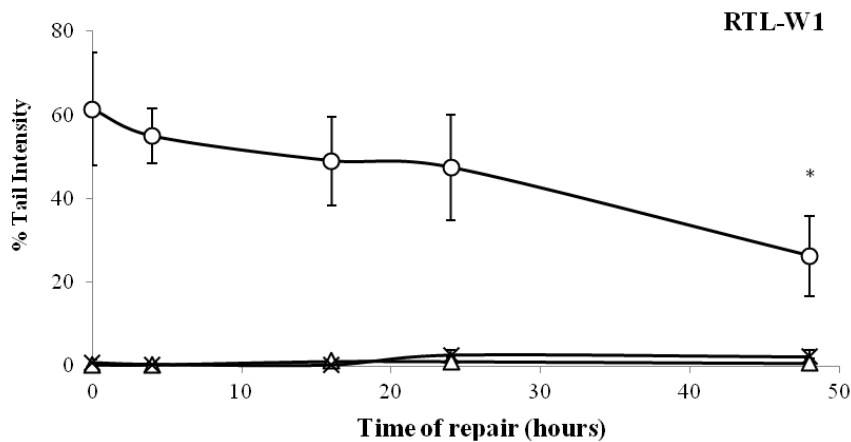


Figure 4: NER kinetics in RTL-W1 fish cell line after exposure to UVC.

*: Significant difference with initial DNA damage (ANOVA - Dunnet post-hoc test). Results are mean \pm SD of 3 independent experiments.

Figure 3 and 4 describe the nucleotide excision repair kinetics of cyclobutyl-pyrimidine dimers in RTL-W1 and RTGill-W1 monitored up to 48h. Both cell lines exhibited a similar trend in slow repair of pyrimidine dimers, with significant reduced UV-lesions only after 24h and 48h of recovery in RTGill-W1 and in RTL-W1 respectively. Between 16h and 48h, the repair rates were 0.94 %TI per hour for RTL W1 and 0.99 %TI per hour for RTGill-W1. It is also noticeable that no significant increase in strand breaks stemming from incomplete repair was observed when applying the standard alkaline comet assay (no T4 enzyme) in UVC treated cells.

4- Discussion

This work aims to characterize the presence of NER and PER systems in two fish cell lines increasingly used in ecotoxicity assessment as alternative biological models to in vivo fish testing. UVC (254nm) were chosen in order to generate substrate DNA lesions as specific as possible of these repair systems. If 254nm is not an environmentally relevant irradiation wavelength, it is close to the absorption maximum of the pyrimidine and purine nucleobases making the photochemical reactions extremely efficient within DNA. In such conditions, cyclobutane pyrimidine dimers are the very major DNA photoproducts followed by pyrimidine (6-4) photoproducts and cytosine photoproducts. Then, the choice of a T4-PDG (pyrimidine dimers glycosylase)-modified comet assay allowed to specifically follow the repair of CPDs. These lesions are particularly relevant since they are recognized as specific

substrate for NER or PER systems depending on the lighting condition during repair and are also the main DNA lesions produced by terrestrial sunlight [16].

Since pyrimidine dimers are not alkali labile sites, the absence of strand breaks detection after UVC exposure when applying the standard alkaline comet assay confirms that the rather low exposure conditions chosen are adequate to generate a high majority of pyrimidine dimers, without any significant amount of single and double strand breaks or any alkali labile sites such as oxidized bases or abasic sites that could have stemmed for example with UVB exposure [1, 15]. This point validates even better the protocol applied for assessing NER and PER kinetics, i.e. using UVC as a model genotoxicant since pyrimidine dimers are specific substrate lesions for these repair systems, while double strand breaks are preferentially repaired by the NHEJ or HR systems and single strand breaks or oxidized bases preferentially by BER.

The longer repair time observed for NER in the studied cell lines is coherent with previous in vitro results showing that NER consecutive to UV induced lesions is generally found negligible or very slow in fish cell lines when compared to mammalian cells [2, 17-19], the NER process lasting frequently several days in fish cells [20]. Other studies elicited even no NER activity in cultured primary trout liver cells but this was obtained after much higher UVC challenging doses (10 to 40 J. m⁻²), possibly saturating the response of the T4-alkaline gel electrophoresis assay [5].

In this work, no DNA repair was detected by the standard version of the assay, although some other studies managed to follow UV repair with the standard comet assay [21]. This might be due to the rather slow NER process of these fish cell lines, as a low DNA incision rate may not generate enough strand breaks per time unit to be revealed by the standard assay. On the contrary, this was possible with human lymphocytes, found to exhibit an efficient and rapid complete repair of similarly UV-damaged DNA (1.5 J m⁻²). Cipollini et al. studied UV-DNA damage repair by simply following the decrease in DNA strand breaks resulting from incomplete repair site with a standard version of the alkaline comet assay [21]. Interestingly, such an efficient NER process in lymphocytes allowed the development of a Nucleotide Excision Repair comet assay (NERc), this DNA repair activity corresponding to a new genotoxicity biomarker [22]. We attempted to develop this assay with the two fish cell lines studied but we did not succeed (data not shown). This was probably linked to the low NER capacity of those cell lines combined with a high non-specific endonuclease activity of the

cell extracts. However, in a previous study using the same cell lines, we managed to set up such a DNA repair activity assay using their BER capacities [12].

In the current study, a significant cell line effect was found (ANOVA, $p = 0.040$) when comparing NER kinetics observed in both cell lines, with RTGill-W1 repairing faster than RTL-W1. This result is consistent with several chronic exposure studies realized *in vivo* showing that NER is relatively inefficient in fish liver [5-7, 23, 24], and with the fact that NER capacity is tissue specific [25, 26]. In fish, NER is mainly described as particularly efficient in larval stages as reported in a recent review [27]. Thus, the fish cell line repair capacities found in this study seem to be quite representative of adult fish NER capacity. As UV exposure is known to trigger cell cycle arrest [28, 29], one can assume that the observed decrease in DNA damage observed is not a dilution effect due to cell growth of undamaged cells despite the rather long repair time tested here. Moreover, this is confirmed with fluorescence data of cytotoxicity evaluation, which does not increase after exposure to UVC.

PER is commonly found in microorganisms, plants and some animals including fish [17, 30, 32]. Our results are in line with previous studies showing that the light-dependent induction of DNA repair enzyme is essential for successful photoreactivation [33, 34], and that rainbow trout are well equipped to remove DNA damage using PER as already demonstrated after exposure to low doses of UVB [35]. These results also support the hypothesis that fish uses both NER and PER to repair photodamage [4, 36, 37], and that PER operates more quickly than NER and can repair damage on a scale of minutes, compared with hours or days for NER [38, 39].

Therefore, those two trout cell lines commonly used in ecotoxicological assessment seem to be valuable alternative models to *in vivo* testing, showing similar overall DNA repair profile as found *in vivo* in adult fish. They could then be used as models to improve our knowledge on UV lesion repair and to study the effects of increasing UV radiations in surface water related to the crucial issue of ozone depletion [40].

5- Conclusion

This work completes a series of studies in our laboratory characterizing the BER capacity in RTL-W1 and RTGill-W1 cell lines [12], and suggesting the use of a Base Excision repair comet assay as a potential new genotoxicity biomarker. The current study demonstrates that two trout cell lines commonly used as alternative models to *in vivo* fish testing show similar UV lesion repair profile than adult fish *in vivo*, i.e a slow NER process in liver cells, with a

significant difference between gill and liver tissues, but an efficient PER system. Since a large array of primary DNA damages is likely to be repairable, the use of genotoxicity biomarkers in fish would gain from a better knowledge of their DNA repair capacity, and such cell lines could be used as models to study DNA repair in fish and in genotoxicity assessment of contaminants.

References

- [1] H.-U. Dahms, J.-S. Lee, UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses, *Aquat. Tox.*, 97 (2010) 3-14.
- [2] J.D. Regan, J.S. Cook, Photoreactivation in an established vertebrate cell line, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 58 (1967) 2274-2279.
- [3] S. Yasuhira, H. Mitani, A. Shima, Enhancement of photorepair of ultraviolet-induced pyrimidine dimers by preillumination with fluorescent light in the goldfish cell line. The relationship between survival and yield of pyrimidine dimers., *Photochemistry and Photobiology*, 55 (1992) 97-101.
- [4] M.H. Olson, D.L. Mitchell, Interspecific variation in UV defense mechanisms among temperate freshwater fishes, *Photochemistry and Photobiology*, 82 (2006) 606-610.
- [5] K.L. Willett, L.A. Lienesch, R.T. Di Giulio, No detectable DNA excision repair in UV-exposed hepatocytes from two catfish species, *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 128 (2001) 349-358.
- [6] C.M. Troxel, A.P. Reddy, P.E. O'Neal, J.D. Hendricks, G.S. Bailey, In vivo aflatoxin B1 metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*), *Toxicology and Applied Pharmacology*, 143 (1997) 213-220.
- [7] T.L. Weimer, A.P. Reddy, U. Harttig, D. Alexander, S.C. Stamm, M.R. Miller, W. Baird, J. Hendricks, G. Bailey, Influence of β -naphthoflavone on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene metabolism, DNA adduction, and tumorigenicity in rainbow trout, *Toxicological Sciences*, 57 (2000) 217-228.
- [8] K. Schirmer, Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish, *Toxicology*, 224 (2006) 163-183.
- [9] P.S. Rocha, G.L. Luvizotto, T. Kosmehl, M. Böttcher, V. Storch, T. Braunbeck, H. Hollert, Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): In vitro comet assay versus in situ micronucleus assay studies, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72 (2009) 1842-1848.
- [10] S.K. Bopp, H.K. Abicht, K. Knauer, Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells, *Aquat. Tox.*, 86 (2008) 197-204.
- [11] A. Perovic, S. Perovic, L. Erdinger, H. Hollert, Assessment of the genotoxic potential of lake Skadar sediments using Ames test and comet assay on the fish cell line RTL-W1, *Archives of Biological Sciences*, 64 (2012) 249-256.
- [12] A. Kienzler, S. Bony, X. Tronchère, A. Devaux, Assessment of base excision repair activity in fish cell lines: towards a new biomarker of contaminant exposure?, *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, (2013) <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.03.004>
- [13] J.-L. Ravanat, T. Douki, J. Cadet, Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components, *Journal of Photochemistry and Photobiology. Part B: Biology*, 63 (2001) 88-102.
- [14] A. Kienzler, X. Tronchère, A. Devaux, S. Bony, Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay, *Toxicology in Vitro*, 26 (2012) 500-510.

- [15] J. Cadet, E. Sage, T. Douki, Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 571 (2005) 3-17.
- [16] A. Besaratinia, J.-i. Yoon, C. Schroeder, S.E. Bradforth, M. Cockburn, G.P. Pfeifer, Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight, *The FASEB Journal*, 25 (2011) 3079-3091.
- [17] Y. Mano, K. Kator, N. Egami, Photoreactivation and excision repair of thymine dimers in ultraviolet-irradiated cultured fish cells, *Radiation Research*, 90 (1982) 501-508.
- [18] K. Kator, Dynamic analysis of repair mechanisms of UV-induced damages in cultured fish cells, *Photomedicine Photobiology*, 6 (1984) 30-32.
- [19] P.M. Achey, A.D. Woodhead, R.B. Setlow, Photoreactivation of pyrimidine dimers in DNA from thyroid cells of the teleost, *Poecilia formosa*, *Photochemistry and Photobiology*, 29 (1979) 305-310.
- [20] E.G. Notch, G.D. Mayer, 17 α -Ethinylestradiol hinders nucleotide excision repair in zebrafish liver cells, *Aquat. Tox.*, 95 (2009) 273-278.
- [21] M. Cipollini, J. He, P. Rossi, F. Baronti, A. Micheli, A.M. Rossi, R. Barale, Can individual repair kinetics of UVC-induced DNA damage in human lymphocytes be assessed through the comet assay?, *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 601 (2006) 150-161.
- [22] S.A.S. Langie, A.M. Knaapen, K.J.J. Brauers, D. van Berlo, F.J. van Schooten, W.L. Godschalk, Development and validation of a modified comet assay to phenotypically assess nucleotide excision repair, *Mutagenesis*, 21 (2006) 153-158.
- [23] D. Jung, Y. Cho, J.N. Meyer, R.T. Di Giulio, The long amplicon quantitative PCR for DNA damage assay as a sensitive method of assessing DNA damage in the environmental model, Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*), *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 149 (2009) 182-186.
- [24] G. Ericson, L. Balk, DNA adduct formation in northern pike (*Esox lucius*) exposed to a mixture of benzo[a]pyrene, benzo[k]fluoranthene and 7H-dibenzo[c,g]carbazole: time-course and dose-response studies, *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 454 (2000) 11-20.
- [25] T. Ishikawa, P. Masahito, S. Takayama, Usefulness of the medaka, *Oryzias latipes*, as a test animal: DNA repair processes in medaka exposed to carcinogens., *National Cancer Institute Monograph*, 1984 (1984) 35-43.
- [26] D.L. Mitchell, J.A. Meador, M. Byrom, R.B. Walter, Resolution of UV-induced DNA damage in Xiphophorus fishes, *Marine Biotechnology*, 3 (2001) 61-71.
- [27] A. Kienzler, S. Bony, A. Devaux, DNA repair activity in fish and interest in ecotoxicology: a review, *Aquatic Toxicology* (2013), DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.03.005
- [28] M. Gentile, L. Latonen, M. Laiho, Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses., *Nucleic Acids Research*, 31 (2003) 4779-4790.
- [29] L. Latonen, Y. Taya, M. Laiho, UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulate p53-HDM2 interaction in human fibroblast, *Oncogene*, 20 (2001) 6784-6793.
- [30] A.D. Woodhead, P.M. Achey, Photoreactivating enzyme in the blind cave fish, *Anoptichthys jordani*, *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 63 (1979) 73-76.
- [31] J.D. Regan, W.L. Carrier, C. Samet, B.L. Olla, Photoreactivation in two closely related marine fishes having different longevities, *Mechanisms of Ageing and Development*, 18 (1982) 59-66.
- [32] S. Yasuhira, H. Mitani, A. Shima, Enhancement of photorepair of ultraviolet-damage by preillumination with fluorescent light in cultured fish cells, *Photochemistry and Photobiology*, 53 (1991) 211-215.

- [33] T.K. Tamai, V. Vardhanabhuti, N.S. Foulkes, D. Whitmore, Early embryonic light detection improves survival, *Current Biology*, 14 (2004) R104-R105.
- [34] J. Hirayama, N. Miyamura, Y. Uchida, Y. Asaoka, R. Honda, K. Sawanobori, T. Todo, T. Yamamoto, P. Sassone-Corsi, H. Nishina, Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish, *Cell Cycle*, 8 (2009) 2794-2801.
- [35] D.L. Mitchell, T. Adams-Deutsch, M.H. Olson, Dose dependence of DNA repair in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae exposed to UV-B radiation, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 8 (2009) 75-81.
- [36] J.H.M. Kouwenberg, H.I. Browman, J.J. Cullen, R.F. Davis, J.F. St-Pierre, J.A. Runge, Biological weighting of ultraviolet (280-400 nm) induced mortality in marine zooplankton and fish. I. Atlantic cod (*Gadus morhua*) eggs, *Marine Biology*, 134 (1999) 269-284.
- [37] N. Uchida, H. Mitani, A. Shima, Multiple effects of fluorescent light on repair of ultraviolet-induced DNA lesions in cultured goldfish cells, *Photochemistry and Photobiology*, 61 (1995) 79-83.
- [38] J.D. Regan, R.D. Snyder, A.A. Francis, B.L. Olla, Excision repair of ultraviolet- and chemically-induced damage in the DNA of fibroblasts derived from two closely related species of marine fishes, *Aquat. Tox.*, 4 (1983) 181-188.
- [39] K.D. Malloy, M.H. Holman, D.L. Mitchell, H.W. Detrich, Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in Antarctic zooplankton, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94 (1997) 1259-1263.
- [40] R.P. Sinha, D.P. Hader, UV-induced DNA damage and repair: a review, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 1 (2002) 225-236.

**Chapitre IV - Mesure du niveau de méthylation du
génomme des lignées RTL-W1 et RTG-W1 et potentiel
d'utilisation comme biomarqueur épigénétique**

Ce chapitre décrit le troisième axe de travail, qui visait au développement d'un **biomarqueur épigénétique** de génotoxicité basé sur la mesure du **niveau de méthylation de l'ADN**. Ce travail a été réalisé en deux temps :

- 1) La mesure du **niveau de méthylation de l'ADN des deux lignées**, à la fois de base et suite à l'exposition à des agents déméthylants connus, par chromatographie liquide haute pression couplée à la spectrométrie de masse en tandem (**HPLC-MS/MS**) des 5-méthylcytosines (5MeCyt) dans l'ADN génomique total.
- 2) La tentative de mise en place d'un **essai des comètes modifié utilisant des endonucléases spécifiques des sites méthylés (méthyl transférases)**.

1 Niveau de méthylation de base de l'ADN et sensibilité à des agents déméthylants

1.1 Introduction

Bien que la méthylation des cytosines de l'ADN génomique ait déjà été mise en évidence chez le poisson, dont la truite (Wang et al. 2009; Blouin et al. 2010), il n'existe aucune donnée dans la bibliographie en ce qui concerne le niveau de méthylation de base des lignées cellulaires de poisson en général, et des lignées RTG-W1 et RTL-W1 en particulier.

Afin d'évaluer le niveau de méthylation de base de l'ADN génomique, qui est un prérequis indispensable au développement ultérieur d'un biomarqueur, deux bases ont été dosées : la 5-méthylcytosine (5-MeCyt), reconnue comme une marque épigénétique prépondérante chez de nombreuses espèces (Havliš et Trbušek 2002) ainsi que la 5-hydroxyméthylcytosine (5-OHmeCyt), un produit d'hydroxylation de la 5-méthylcytosine. Des travaux récents ont en effet montré que chez les mammifères, la 5-méthylcytosine peut être convertie en 5-hydroxyméthylcytosine par des oxygénases, sans que l'on connaisse pour l'instant le rôle exact de cette modification dans les mécanismes épigénétiques (Loenarz and Schofield 2009). Il a donc été jugé intéressant d'explorer à titre prospectif d'une part si cette modification des 5-méthyl cytosines existait également chez les lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1, et d'autre part si l'exposition des lignées à des agents déméthylants modèles ou à des contaminants environnementaux modulait le niveau de méthylation (5-MeCyt) et sa transformation en 5-OHmeCyt.

Le dosage par HPLC (chromatographie liquide haute pression) couplée à la spectrométrie de masse a été choisi car c'est la méthode de référence pour le dosage de la méthylation globale du génome, qui permet à la fois une bonne séparation des nucléotides et une détermination quantitative très sensible des composés séparés (Havliš et Trbušek 2002).

La sensibilité des deux lignées a été étudiée vis-à-vis de deux agents déméthylants modèles, la 5-azacytidine et la zébularine, ainsi qu'au cadmium et au tributylétain, deux molécules pertinentes du point de vue environnemental et déjà décrites pour avoir des effets déméthylants possibles chez d'autres espèces d'organismes aquatiques. La 5-azacytidine et la zébularine sont utilisées comme agent anti-cancéreux (Schneider-Stock et al. 2005). Toutes deux analogues de la cytidine (Figure 40), elles possèdent à priori un mécanisme d'action similaire : après activation, elles sont incorporées dans l'ADN durant la réplication à la place de la cytidine. Suite à l'action de la méthyltransférase sur ces analogues, celle-ci se trouve liée

covalamment à l'ADN, ce qui a pour effet d'engendrer une diminution du pool cellulaire de DNMT disponible (ADN méthyltransférases) et donc une déméthylation globale subséquente à la réplication de l'ADN (Christman 2002; Pali et al. 2008).



Figure 40 : La cytidine et ses deux analogues structuraux, la 5-azacytidine et la zébularine

Les concentrations d'agents déméthylants utilisées dans notre travail ont été choisies en fonction des données de la bibliographie et après étude de leur cytotoxicité pour les lignées RTL-W1 et RTG-W1, évaluées au cours d'expérimentations préliminaires. Classiquement, les concentrations actives de 5-azacytidine utilisées sont de l'ordre de 0,05 à 10 μM (Cheng et al. 2003; Schneider-Stock et al. 2005; Pali et al. 2008), alors que les concentrations de zébularine utilisées varient de 10 à 500 μM (Cheng et al. 2004; Meador et al. 2010).

Parmi les contaminants retrouvés dans les milieux aquatiques, le cadmium est décrit pour inhiber de manière dose-dépendante l'activité des DNMTs chez le rat à de faibles concentrations (de l'ordre de 5 μM) et pour des expositions courtes (1 semaine), probablement *via* une interaction directe avec le domaine de liaison des enzymes à l'ADN plutôt qu'avec leur site actif (Takiguchi et al. 2003). Cette même étude montre par ailleurs une hyperméthylation des cytosines après 10 semaines d'exposition au Cd ; l'effet du Cd sur le niveau de méthylation semble donc extrêmement dose- et temps-dépendant. Le tributylétain (TBT) a également été décrit pour induire une diminution significative du niveau de méthylation de l'ADN chez le poisson, ceci de manière dose-dépendante après une exposition de 48h, à des concentrations variant de 0 à 100 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ (ou 0,31 nM) (Wang et al. 2009). L'effet de ces deux contaminants sur le niveau de méthylation de l'ADN des lignées RTL-W1 et RTG-W1 a ainsi été étudié dans le cadre de ce travail.

1.2 Matériels et Méthodes

En préalable au dosage HPLC, deux étapes sont nécessaires : l'extraction de l'ADN cellulaire, puis sa digestion permettant de séparer les nucléosides. Il a donc été nécessaire

dans un premier temps de comparer plusieurs kits d'extraction de l'ADN afin de choisir celui représentant le meilleur rendement d'extraction et le meilleur indice de pureté de l'ADN extrait. Pour ce qui est de la digestion et du dosage de l'ADN, les protocoles choisis sont ceux utilisés au Laboratoire des lésions sur les acides nucléiques du CEA à Grenoble où les dosages ont été réalisés.

1.2.1 Exposition aux agents déméthylants

La 5-azacytidine (A2385), la zébularine (Z4775), le chlorure de tributylétain (TBT, T50202) et le chlorure de cadmium (CdCl₂, 202908) sont fournis par Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Leur cytotoxicité a été évaluée au préalable à l'aide du test du Cell Titer Blue® (§ B.I.2), sur une durée d'exposition de 24h. Suite à ces résultats (données non présentées) et à la bibliographie, qui fait état de durées d'exposition de 48h à plusieurs semaines selon les études (Cheng et al. 2003; Cheng et al. 2004; Schneider-Stock et al. 2005; Pali et al. 2008; Meador et al. 2010), différentes gammes d'exposition sont déterminées (présentées dans le Tableau 14). Les expositions sont réalisées dans du milieu L-15 complet, et les milieux d'exposition sont renouvelés tous les trois jours. Initialement, un temps d'exposition de 11 jours avait été choisi, nécessitant une ou plusieurs trypsinations des cellules. Or lors de l'exposition à la 5-azacytidine, une difficulté au décollement des cellules lors de la trypsination et une incapacité des cellules à adhérer et repartir correctement a été observée, notamment aux concentrations les plus élevées. La durée d'exposition a donc été ramenée à 8 jours de façon à ne pas avoir à trypsiner les cellules et à s'affranchir de ce problème.

<i>Agents déméthylants</i>	<i>Concentrations d'exposition</i>	<i>Durée d'exposition</i>
5-Azacytidine	0 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 µM	11 jours
Zébularine	0 ; 25 ; 125 ; 250 ; 500 µM	8 jours
Cd	0 ; 0,5 ; 1 ; 2,5 µM	8 jours
TBT	0 ; 0,001 ; 0,01 ; 0,1 µM	8 jours

Tableau 14 : Agents méthylants/déméthylants et concentrations d'exposition choisies pour les lignées RTG-W1 et RTL-W1

1.2.2 Extraction de l'ADN génomique

Quatre kits d'extraction de l'ADN ont été comparés (DNAzol® d'Invitrogen™ ; Purelink™ Genomic DNA minikit d'Invitrogen™ ; QIAamp® DNA minikit de Quiagen™ ; Wizard SV® Genomic DNA Purification system de Promega™) dans le cadre d'une étude préliminaire. La méthode finalement retenue est la méthode de chez Quiagen™ qui permet d'une part, la meilleure efficacité d'extraction, et d'autre part, la meilleure pureté vis-à-vis des protéines, des ARN et des solvants d'extraction (données non présentées). C'est donc QIAamp® DNA minikit qui a été retenu. Le protocole utilisé est celui proposé par le fabricant. Il permet dans nos conditions expérimentales d'obtenir 200 µL d'une solution contenant 20 à 40 µg/mL d'ADN en fonction de la lignée, du réplicat, et de la concentration d'exposition aux agents testés.

1.2.3 Digestion de l'ADN et dosage HPLC-MS/MS des bases méthylées

➤ Digestion enzymatique

A 50 µg (au plus) d'ADN et 50 µL d'H₂O₂ sont ajoutés 2,5 µL de nucléase P1 (0,5 U ; Sigma N8630), 0,25 µL de phosphodiesterase II (0,025 U ; Sigma P9041), 0,25 µL de DNase II (2,5 U ; Sigma D4138) et 5 µL de tampon P1 (200 mM d'acide succinique, 100 mM CaCl₂, pH 6) 10X. Cette solution est incubée 2h à 37°C. Six µL de tampon Palk (10X-500mM Tris, 1mM EDTA, pH 8) sont ensuite ajoutés ainsi que 0,015 U de phosphodiesterase I (Sigma P6903) et 2 U de phosphatase alcaline (Roche Diagnostique, réf. 1097075). L'échantillon est alors incubé à nouveau pendant 2h à 37°C. A la fin de la digestion enzymatique, 3,5 µL d'HCl 0,1 M sont ajoutés pour stopper les réactions avant centrifugation (5000 g, 5 min). L'analyse est réalisée sur le surnageant, par HPLC-MS/MS.

➤ Dosage HPLC-MS/MS

La séparation des nucléosides obtenus par hydrolyse est réalisée par chromatographie liquide sur une colonne à polarité de phase inversée Uptisphere (Interchim ; 5 µm, 150 nmX2 mm i.d) avec une élution en mode gradient à 0,2 mL/min, comme décrit par Frelon (2000). La proportion de solvant B (2 mM de formate d'ammonium contenant 10% d'acétonitrile) dans le solvant A (2 mM de formate d'ammonium) atteint 25% dans les premières 10 minutes, puis est maintenue à 25% pendant 5 minutes et enfin augmentée à 100% en 15 minutes. Cette dernière composition est maintenue 10 minutes supplémentaires. A la sortie de la colonne HPLC, l'éluat est dirigé vers un spectromètre de masse Quantum ultra (Thermo Electron Corporation) de type triple quadripôle par le biais d'une source d'ionisation « electrospray ».

Le mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) est utilisé pour détecter et quantifier simultanément et de façon sensible et spécifique la 2'-désoxycytidine (dCyd), la 5-méthyle-2'-désoxycytidine (5-MedCyd) et la 5-hydroxyméthyle-2'-désoxycytidine (5-HmdCyd). Le principe consiste à isoler dans le premier quadripôle l'ion pseudomoléculaire $(M+H)^+$ issu de l'ionisation en mode positif de chacun des nucléosides, puis à induire une fragmentation de cet ion dans le second quadripôle et enfin d'isoler un ion fils caractéristique de la molécule dans le dernier quadripôle. Pour les 3 composés détectés, la fragmentation observée correspond à la perte du 2-désoxyribose et donc les transitions ions parents \rightarrow ions fils utilisées pour détecter dCyd, 5-MedCyd, 5-HmdCyd sont respectivement $228 \rightarrow 112$, $242 \rightarrow 126$ et $258 \rightarrow 142$. Le dosage est effectué par calibration externe.

Les résultats des mesures sont exprimés en taux de base de cytidines méthylées en C5/total des cytidines (5-MedCyd/dCyd) (%) et en taux de base de cytidines méthylées et hydroxylées en C5/1000 bases méthylées en C5 (5-HmdCyd/1000-5MedCyd).

1.3 Résultats

1.3.1 Niveau de méthylation de base du génome des deux lignées

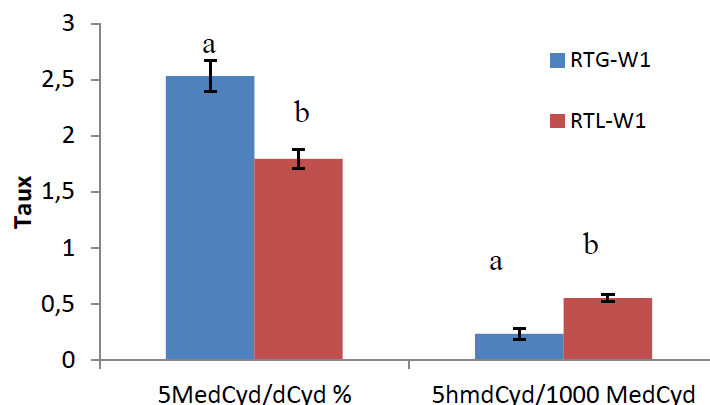


Figure 41 : Niveau de base de méthylation en C5 des cytidines chez les deux lignées RTL-W1 et RTG-W1

Moyenne \pm ET de 3 ou 4 réplicats indépendants. a significativement différent de b; t-test, $p < 0,05$

Si l'on compile toutes les valeurs des témoins pour calculer un niveau de base de méthylation en C5 des cytidines chez les deux lignées (Figure 41), on constate que les deux bases 5-MedC et 5-HmdC sont détectées dans tous les échantillons. Le taux de méthylation de base des cytidines en C5 est significativement plus élevé chez la lignée RTG-W1 ($2,53 \pm 0,24\%$ contre $1,79 \pm 0,29\%$ chez RTL-W1) La présence de 5 hydroxyméthyle-2'-

désoxycytidine est avérée chez les deux lignées et dans ce cas, c'est la lignée hépatocytaire qui possède un niveau d'enrichissement significativement plus élevé que la lignée branchiale ($0,55 \pm 0,05$ pour RTL-W1 contre $0,23 \pm 0,10$ pour RTG-W1).

1.3.2 Sensibilité des deux lignées à divers agents déméthylants

Comme le montre la Figure 42, suite à l'exposition à la 5-azacytidine pendant 11 jours consécutifs, on observe une déméthylation dose-dépendante chez la lignée RTG-W1 (différence significative à partir de $0,4 \mu\text{M}$) ; on observe également un effet déméthylant chez la lignée RTL-W1, significatif à $0,6 \mu\text{M}$ uniquement. Suite à l'exposition à la 5-aza, un effet significatif sur l'hydroxylation des bases méthylées n'est mis en évidence que pour la lignée RTG-W1 aux deux plus fortes concentrations de 5-azacytidine. En revanche, après exposition à la zébularine, au tributylétain et au cadmium, aucune variation du niveau de méthylation des cytosines en C-5 n'est observée chez les deux lignées quelle que soit la concentration d'exposition (Figure 42 et Figure 43).

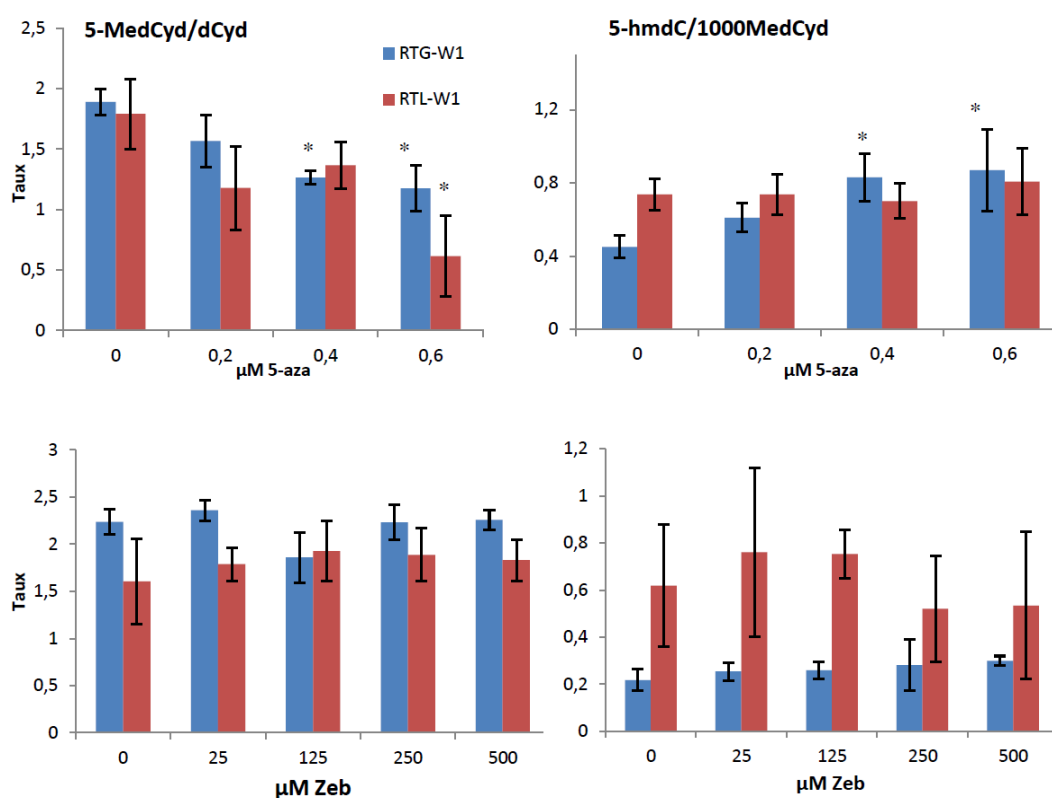


Figure 42 : Mesure des 5-méthylecytosines (à gauche) et 5-hydroxyméthylecytosines (à droite) après exposition à la 5-azacytidine (11 jours) et à la zébularine (8 jours)

Moyenne et écart-type de 3 réplicats indépendants. * : différence significative ($p < 0,05$) avec le témoin, ANOVA, Test post-Hoc HSD de Dunnett

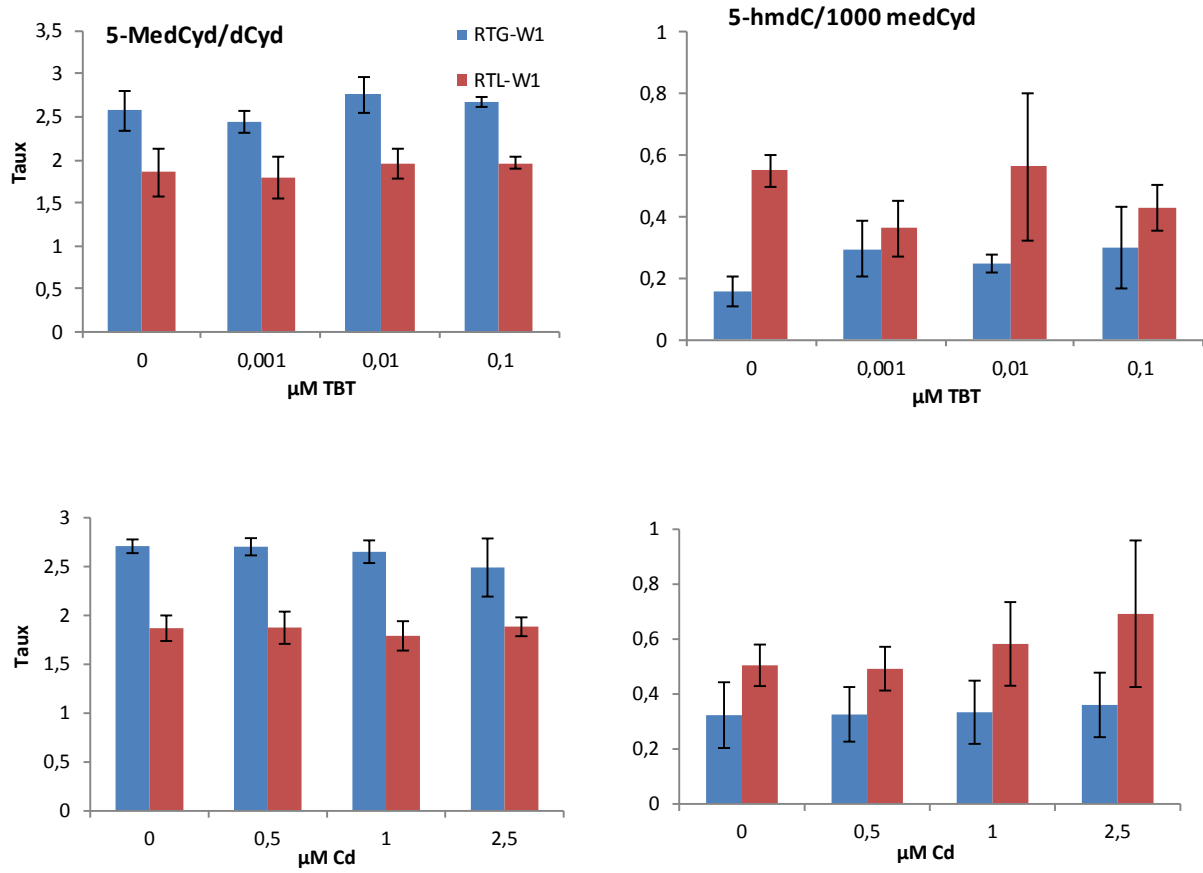


Figure 43 : Mesure de la 5-méthylcytosine (à gauche) et 5-hydroxyméthylcytosine (à droite) après exposition au TBT et au Cd

Moyenne et écart-type de 3 réplicats indépendants. * : différence significative ($p < 0,05$), ANOVA, Test post-Hoc de Dunett

1.4 Discussion

Le niveau de méthylation en C5 des résidus cytidine des lignées RTL-W1 et RTG-W1 est respectivement de 1,79 et 2,53 %. Il est donc du même ordre de grandeur que chez l'humain soit 2-10 % de méthylation des résidus cytidine dans le génome global (Havliš et Trbušek 2002), et supérieur à celui mesuré chez la daphnie soit de 0,13 à 0,81 % (Vandegheuchte et al. 2009b). Il est également du même ordre de grandeur, bien que légèrement inférieur, à celui évalué *in vivo* chez le poisson, d'environ 3,2 à 5,5% selon l'espèce (Varriale et al. 2006).

Le niveau de méthylation relativement important mesuré ici sur lignées cellulaires de truite est un point intéressant dans la perspective de l'utiliser comme biomarqueur puisqu'il

devrait permettre de mesurer sans problème des variations grâce à la grande sensibilité de la méthode de mesure utilisée.

Seule l'exposition à la 5-azacytidine présente un effet déméthylant chez RTG-W1 et RTL-W1. Les résultats ne montrent en effet aucune modification de niveau de méthylation des cytidines en C5 des deux lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1 suite à l'exposition à la zébularine, bien que ces deux agents déméthylants soient décrits comme agissant avec le même mode d'action et que l'action déméthylante de la zébularine ait été démontrée sur d'autres types cellulaires. Ainsi 48h d'exposition à 500 μM de zébularine de cellules T24 (cellules du cancer de la vessie humaine) ont entraîné une déméthylation significative (Cheng et al. 2004), de même qu'une exposition continue de 40 jours à 0,1 mM de zébularine. Une déméthylation dose-dépendante a été observée chez des cellules de souris C3H 10T1/2 Cl8 traitées durant 24h à 10 et 30 μM de zébularine (Cheng et al. 2003).

Par ailleurs, aucune des deux lignées ne montre de sensibilité vis-à-vis du cadmium et du TBT, susceptibles de moduler le niveau de méthylation. Takiguchi et al. (2003) ont mis en évidence sur des cellules TRL1215 (foie de rat) jusqu'à 40% d'inhibition de l'activité des DNA DMNT (de façon dose-dépendante) après une semaine d'exposition à des concentrations allant de 0 à 2,5 μM de Cd, concomitante à une diminution légère mais significative du niveau de méthylation global du génome aux concentrations les plus élevées. Après 10 semaines d'exposition au cadmium, une transformation phénotypique des cellules a été constatée, incluant hyperprolifération, diminution du besoin en sérum, et dans ce cas une augmentation significative du niveau de méthylation de l'ADN et de l'activité des ADN DMNT. De même, Zhang et al. (2009) ont observé une augmentation de la méthylation de l'ADN et de l'expression des DMNT *in vivo* chez la poule après 60 jours d'exposition au cadmium (140 et 210 mg/kg de poids corporel). Ainsi l'effet du cadmium sur la méthylation de l'ADN semblerait dépendre de la dose et de la durée d'exposition, qui dans le cadre de nos expérimentations étaient peut-être insuffisantes. L'effet déméthylant du TBT chez le poisson *Sebasticus marmoratus* est rapporté après une exposition de 48 jours, mais rappelons que dans ce cas il s'agit d'une expérimentation *in vivo* (Wang et al. 2009). On peut suspecter que la durée d'exposition que nous avons choisie ait été trop faible considérant les valeurs citées dans la littérature pour lesquelles une déméthylation a été observée *in vivo*. Cependant, la durée choisie dans notre travail (7 jours) correspond à environ deux cycles des lignées RTL-W1 et RTG-W1, et donc à deux cycles de réplication de l'ADN, ce qui semblait être des conditions favorables à l'étude d'un effet déméthylant pour les analogues de la cytidine tels

que la 5-azacytidine et la zébularine, qui nécessitent la réplication de l'ADN pour exercer leur action.

2 Essai de mise au point du protocole de l'essai des comètes modifié

L'essai des comètes étant un outil bien maîtrisé au laboratoire, un de nos objectifs était d'utiliser une version modifiée de l'essai par ajout d'une étape de digestion avec des méthyl transférases pour disposer d'un outil d'évaluation du niveau de méthylation de l'ADN génomique et de pouvoir aller plus avant dans la validation éventuelle de ce paramètre en tant que biomarqueur potentiel.

Deux protocoles d'évaluation du niveau de méthylation du génome *via* un essai comète modifié de la sorte ont été publiés à ce jour. Le premier protocole, détaillé dans la Figure 44 (colonne verte) utilise les enzymes de restriction HpaII et MspI (Wentzel 2010). Le second met en application les enzymes de restriction HpaII et HhaI utilisées pour cliver l'ADN au niveau des sites CpG non méthylés entre deux étapes de lyse : une première lyse neutre à 37°C avec de la protéinase K avant la digestion enzymatique, suivie d'une deuxième lyse alcaline, puis du déroulement et de l'électrophorèse (McGlynn et al. 1999; McGlynn et al. 2003; Wasson et al. 2006).

L'application du premier protocole sans modifications (cf. Figure 44, colonne verte) aux lignées de poisson a donné de très mauvais résultats (il est à noter que ce protocole ne comporte pas d'étape de déroulement) car aboutissant à un niveau de base de dommage très élevé y compris des cellules témoins non exposés. Nous avons donc essayé de le modifier (colonne rose de la Figure 44), d'une part en utilisant le tampon d'activité préconisé par les fournisseurs des enzymes que nous utilisons, d'autre part, pour tenter de nous rapprocher le plus possible des conditions du protocole d'essai comètes Fpg-modifié validé et utilisé couramment dans notre laboratoire (colonne bleue). En effet, ce dernier permet avec les lignées cellulaires RTL-W1 et RTG-W1 d'obtenir des niveaux de dommages de base très acceptables. Cette modification du protocole n'ayant pas suffi à l'obtention de résultats acceptables, nous avons introduit plusieurs modifications supplémentaires en agissant successivement sur différents facteurs : durée et composition du tampon de lyse, durée d'incubation, nature du tampon enzyme utilisé, etc... (colonne rose). Ces modifications du protocole n'ont malheureusement pas permis d'améliorer le niveau basal de dommages dans les témoins (à savoir une valeur de tail intensity < 10%).

Lors de ces différentes modifications, le dithiothréitol (DTT) et le magnésium présents dans le tampon d'activité des enzymes ont été suspectés comme pouvant être à l'origine des problèmes rencontrés. La suppression du DTT ou du magnésium uniquement n'a pas amélioré la situation (résultats non présentés). La suppression du DTT et du magnésium simultanément permet d'obtenir un niveau de dommage à l'ADN acceptable chez les témoins, mais le Mg^{2+} étant cofacteur des méthyl-transférases, sa suppression totale du tampon entraînerait une diminution significative de l'activité des enzymes, pouvant empêcher au final la réalisation de l'essai.

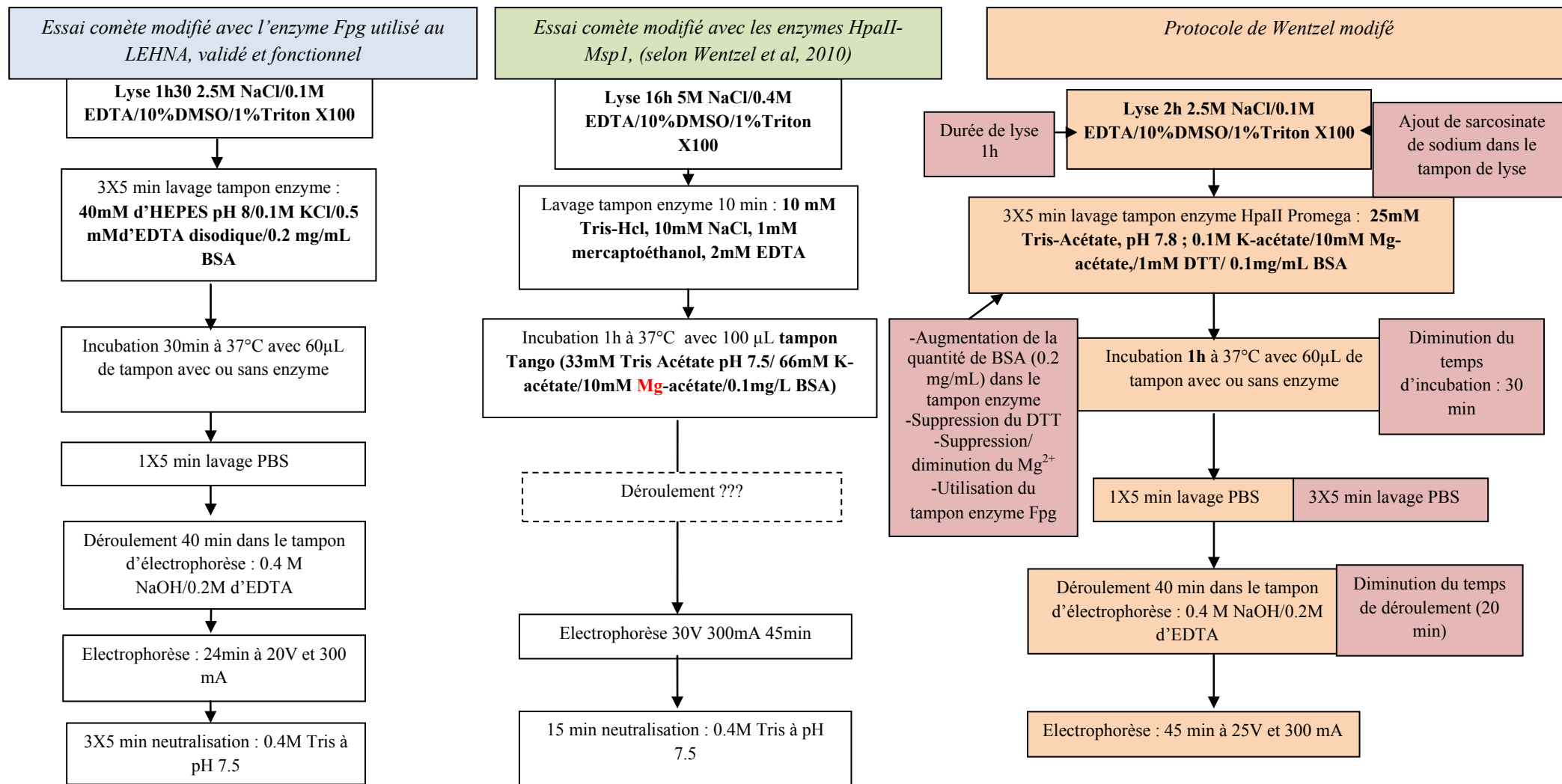


Figure 44 : Essai des comètes Fpg-modifié, essai des comètes modifié selon Wentzel et al. (2010) pour la mesure de la méthylation, et modifications apportées au protocole de Wentzel pour tenter de permettre son utilisation avec les lignées RTL-W1 et RTG-W1

L'influence directe du magnésium sur le niveau de dommage de base a cependant été vérifiée. La Figure 45 décrit l'évolution du niveau de dommage sur la lignée RTL-W1 soumise à une étape d'incubation de 30 minutes en présence du tampon F (tampon d'activité de l'enzyme Fpg) contenant différentes concentrations en magnésium. Les résultats montrent sans équivoque que des dommages artéfactuels à l'ADN significatifs apparaissent dès des concentrations en Mg^{2+} très faibles (0,5 mM), et une fragmentation de l'ADN dose-dépendante est observée jusqu'à la dose de 4 mM. La concentration en magnésium étant fixée à 10 mM dans le protocole de Wentzel et al., ceci correspondrait à une saturation du signal avec plus de 80% de dommage à l'ADN, expliquant ainsi les niveaux de base très élevés observés dans le témoin.

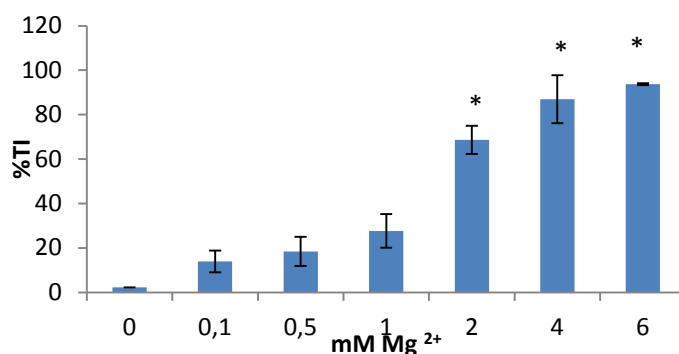


Figure 45 : Fragmentation de l'ADN sur la lignée RTL-W1 suite à l'ajout de Mg^{2+} dans le tampon F (incubation d'1h min à 37°C).

*Moyenne \pm écart-type de 3 réplicats indépendants. * : différence significative avec le témoin (Test de Kruskal Wallis-Test Post-hoc : comparaison multiples).*

Suite à l'hypothèse d'une réactivation d'endonucléases endogènes par le Mg^{2+} , des modifications de l'étape de lyse ont donc été apportées afin de tenter d'inhiber plus efficacement l'action de ces endonucléases (ajout de sarcosinate de sodium ou de protéinase K dans le tampon de lyse). Malgré ces modifications, le taux basal de dommages à l'ADN est resté à un niveau élevé (tail intensity >10%) et il a été décidé de renoncer à poursuivre les essais de validation d'un protocole d'essai des comètes modifié pour évaluer le niveau de méthylation de l'ADN génomique.

Le second protocole de Wasson et al (2006) cité précédemment a également été testé, mais appliqué tel quel il a également donné de très mauvais résultats. Il est détaillé dans la Figure 46, ainsi que toutes les modifications et variantes qui ont été apportées au cours de ces tentatives de mise en place d'un protocole (en rose). Des dommages importants suite à la

première lyse (y compris sur les lames témoins incubées par la suite avec le tampon Fpg) et ici encore, des dommages consécutifs à l'utilisation du tampon d'activité des enzymes contenant du magnésium ont été observés. Les modifications apportées (durée et température de lyse, composition du tampon de lyse) n'ont pas permis d'obtenir des niveaux de dommages satisfaisants chez les témoins.

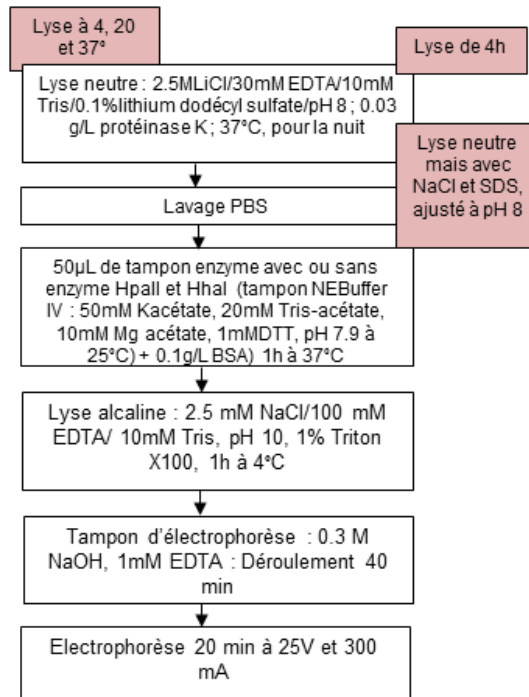


Figure 46 : Essai des comètes modifié et mesure de la méthylation sur lignées cellulaires de poisson : essai de modifications du protocole de Wasson et al., 2006 (en rose).

Etant donné le temps investi et le peu de résultats obtenus après toutes ces modifications techniques, il a ensuite été décidé d'arrêter de travailler sur cette mise au point, et de s'en tenir aux mesures HPLC pour l'évaluation du niveau de méthylation des bases de ces deux lignées cellulaires.

**Chapitre V - Application des biomarqueurs de
généotoxicité développés à l'évaluation de la
généotoxicité d'effluents urbains**

Aux USA, une des sources de pollution des eaux de surface préoccupante concerne l'utilisation d'un revêtement à base de goudron de houille, appelé « Coal-tar based sealcoat » (CTB), utilisé pour étanchéifier routes et aires de stationnement. Les eaux de ruissellement provenant de ce type de revêtement sont en moyenne 10 fois plus chargées en HAPs que celles issues de revêtements classiques à base d'asphalte (Asphalt-based sealcoat, ou ASB) ; ces eaux sont également très chargées en composés hétérocycliques azotés.

Dans la cadre d'une collaboration avec l'équipe de Barbara J. Mahler et Peter C. Van Metre (Environmental Protection Agency, USGS, Austin, Texas, USA) ayant pour objectif l'évaluation de l'écotoxicité de ces eaux de ruissellements, le travail présenté ici s'intéresse plus particulièrement à l'évaluation de la cyto- et de la génotoxicité des eaux de ruissellement recueillies à différents temps post-application sur des parcelles expérimentales recouvertes par des revêtement de type CTB ou ASB, ce dernier servant de témoin. Ces expérimentations réalisées sur le modèle cellulaire RTL-W1, complète des mesures effectuées aux USA sur les mêmes échantillons, à savoir des essais monospécifiques normalisés de toxicité aiguë sur embryon de *Pimephales promelas*, et sur *Ceriodaphnia dubia* ainsi que des analyses chimiques de la composition en HAPs (liste prioritaire selon l'US-EPA) et en composés hétérocycliques azotés des eaux de ruissellement.

Ce travail d'application contribue à la validation des biomarqueurs de génotoxicité développés au cours de la thèse (dommages primaires à l'ADN par l'essai des comètes Fpg modifié et niveau d'activité de réparation par le BERc). Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication en préparation qui est présentée dans ce chapitre. Auparavant, nous détaillerons le contexte scientifique de l'étude, donnerons les éléments de protocole de l'expérimentation ayant permis la collecte des échantillons d'eau de ruissellement et fournirons au titre de la communication personnelle les grandes lignes des résultats obtenus aux USA (analyses chimiques des échantillons et tests d'écotoxicité normalisés). Ces données qui sont en cours de publication par nos collègues nord-américains nous ont semblées nécessaires à la bonne compréhension et interprétation de nos propres résultats.

1 La problématique environnementale des « CTB-Sealcoat »

La contamination des lacs urbains et des cours d'eau par les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) a considérablement augmenté ces 40 dernières années aux USA. L'une des sources de cette contamination est l'utilisation de couches d'étanchéité de voiries formulées à base de goudron de houille et appelées « Coal-tar-based sealcoat » ou CTB (Van Metre et Mahler 2010). Dans certains Etats américains, elles contribuent pour la moitié de la pollution de type HAPs des lacs urbains, l'autre moitié étant due notamment aux véhicules et à la combustion du goudron. Interdit en Europe et dans certains Etats américains, le « CTB-Sealcoat » est surtout utilisé pour le revêtement des voies d'accès aux maisons et immeubles ainsi que des parkings afin d'améliorer l'apparence des chaussées et leur longévité. Les résidus de distillation de goudrons de houille qu'il contient sont classés « cancérogènes avérés pour l'homme » (groupe 1 du CIRC¹), et sont très chargés en HAPs (jusque 50% de la masse totale), ce qui représente des concentrations totales en HAPs près de 70 fois supérieures à celles retrouvées dans des produits plus classiques à base d'asphalte (Mahler et al. 2005). Ces derniers, appelés « ASB Sealcoat », sont constitués de bitumes, produits d'origine pétrolière. Ils sont néanmoins classés dans le groupe 2B « cancérogène possible pour l'homme » par le CIRC.

La ville d'Austin au Texas, estime que près de 2,3 millions de litres de « CTB sealcoat » sont appliqués chaque année dans son agglomération. L'érosion forme en surface des particules fines transportées par les eaux pluviales, le vent, les pneus (Mahler et al. 2012a). Le transport des HAPs par les eaux de ruissellement a été identifié comme l'une des principales sources de pollution des lacs urbains américains (Van Metre et Mahler 2010). Dans les eaux de ruissellement de revêtements de type « CTB-sealcoat » la concentration en HAPs est en moyenne 65 fois celle des eaux de ruissellement de revêtements à base d'asphalte, et est particulièrement élevée dans les eaux ruisselées aux cours des premiers jours suivant l'application du revêtement (Mahler et al. 2005).

La littérature récente confirme que les revêtements à base de goudron de houille contribuent à la dégradation de la survie, de la croissance et du développement des amphibiens. Des embryons d'amphibiens (*Xenopus laevis*) ont été exposés à de l'eau contenant des particules de revêtement CTB à de faible (3 ppm), moyenne (30 ppm) et forte

¹ Centre International de Recherche sur le Cancer

(300 ppm) concentrations en HAPs totaux. Aucun embryon n'a survécu au traitement à 300 ppm et les embryons exposés aux autres traitements ont présenté un retard à l'éclosion et au développement par rapport aux contrôles. Les auteurs de cette étude concluent que le « CTB sealcoat » peut altérer le développement des amphibiens du fait de sa forte concentration en HAPs, connus pour causer des désordres du développement similaires à ceux observés dans leur expérience (Bryer et al. 2006). Il est également établi que le « CTB-sealcoat » contribue à la mortalité embryonnaire et larvaire chez les poissons (Kocan et al. 1996) et qu'il inhibe la croissance et la biodiversité des macros invertébrés et des phytoplanctons benthiques (Oberholster et al. 2005).

De plus signalons que ces revêtements n'engendrent pas uniquement des risques écotoxicologiques, mais font aussi l'objet de risques sanitaires et de problèmes de santé publique pour l'homme : Mahler et al. (2010) ont en effet montré que les poussières retrouvées dans des habitations situées à proximité de voies d'accès et de parkings dont le revêtement est de type « CTB sealcoat » présentent une concentration en HAPs totaux 25 fois supérieure à celle de résidences avec des parkings dont le revêtement est à base d'asphalte.

2 Evaluation de l'écotoxicité de deux revêtements de type « sealcoat » à base de coal-tar ou d'asphalte

2.1 Application des revêtements et collecte des eaux de ruissellement

Les matrices testées sont issues d'une expérimentation menée entre août et octobre 2011 par l'USGS à Austin au Texas (USA). Deux types de revêtement (« CTB sealcoat » et « ASB sealcoat ») ont été appliqués sur des parcelles en asphalte issues d'un même parking (Figure 47). Des pluies ont été simulées à différents intervalles de temps (4h, 24h, 7 jours, 36 jours) après l'application du revêtement à raison de 25L d'eau sur 10m² de revêtement. Les eaux de ruissellement de chaque temps ont été récoltées sur une section de la parcelle qui n'avait pas encore été arrosée. Les parcelles testées n'étaient protégées ni du soleil, ni de la pluie ; cependant, il n'a quasiment pas plu dans la région pendant les essais (respectivement 0 mm, 0,24 mm et 46,23 mm en août, septembre et octobre 2011).



Figure 47 : Application des revêtements « CTB sealcoat » et « ASB sealcoat »
(Photo USGS, Austin, Texas)

Chaque échantillon (reçu congelé à -20°C) a été conservé tel quel (à -80°C). Ces eaux brutes constituent des échantillons relativement hétérogènes avec notamment une teneur en particules solides de plus en plus forte au fil du temps de prélèvement associée à une couleur de plus en plus brune.

2.2 Analyses chimiques des eaux de ruissellement

Les concentrations en HAPs totaux (16 HAP prioritaires pour l'US-EPA) et en hétérocycles azotés totaux² (quinoline, iso-quinoline, acridine, phénanthridine, carbazole) dans les eaux de ruissellement de revêtement à base de goudron de houille (CTB) et à base d'asphalte (ASB) en fonction du temps écoulé entre l'application du revêtement et la première pluie sont présentés dans la Figure 48 (les résultats détaillés des analyses chimiques sont fournis en annexe IV).

Les concentrations en fonction des temps d'échantillonnages en HAPs totaux sont de 30-61 $\mu\text{g/L}$ et 350-485 $\mu\text{g/L}$ et en hétérocycles azotés de 10-30 et 101-904 $\mu\text{g/L}$ pour l'« ASB sealcoat » et le « CTB sealcoat » respectivement.

² Les résultats détaillés sont en cours de publication par l'USGS à Austin (Texas, USA)

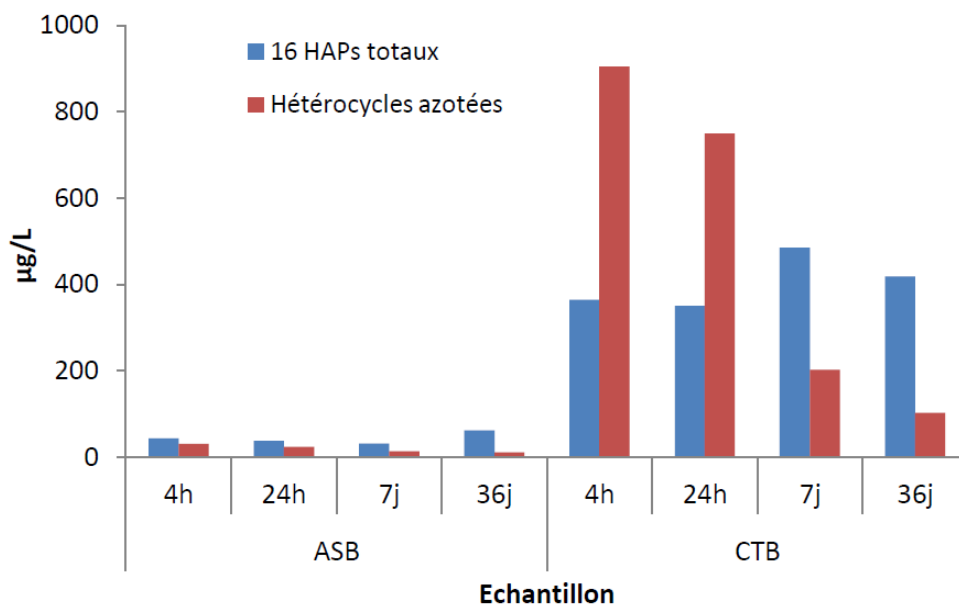


Figure 48 : Concentrations en HAPs totaux (16 HAPs prioritaires pour l'US-EPA) et en hétérocycles azotés totaux dans les eaux de ruissellement de revêtement de type CTB et ASB en fonction du temps écoulé entre l'application du revêtement et la pluie.

Ces résultats confirment que le revêtement « CTB sealcoat » est une source de pollution en HAPs importante avec des concentrations dans les eaux de ruissellement presque 10 fois supérieures à celles des eaux de ruissellement du revêtement à base d'asphalte (Figure 48) ; les échantillons CTB sont également jusqu'à 30 fois plus chargés en hétérocycles azotés (notamment pour les pluies simulées après 4 et 24h). On constate par ailleurs que la concentration totale en 16 HAPs prioritaires ne diminue pas au cours du temps, signe de la persistance d'un relargage de ces contaminants sur le long terme, contrairement à la concentration totale en hétérocycles azotés qui décroît rapidement dans le temps.

Si l'on s'intéresse aux concentrations en HAPs selon leur complexité (nombre de cycles), on observe que les plus petits (2 et 3 cycles) sont lessivés en quantité relativement importante au cours des 7 premiers jours, et que les plus complexes (4 cycles et plus) n'apparaissent dans les eaux de ruissellement en quantité importante qu'à partir du 7^{ème} jour pour les deux types de revêtement (Figure 49A). Les deux principales amines aromatiques retrouvées sont le carbazole et l'acridine dans le « CTB-sealcoat » et le carbazole et la phénanthridine dans l'« ASB-sealcoat ».

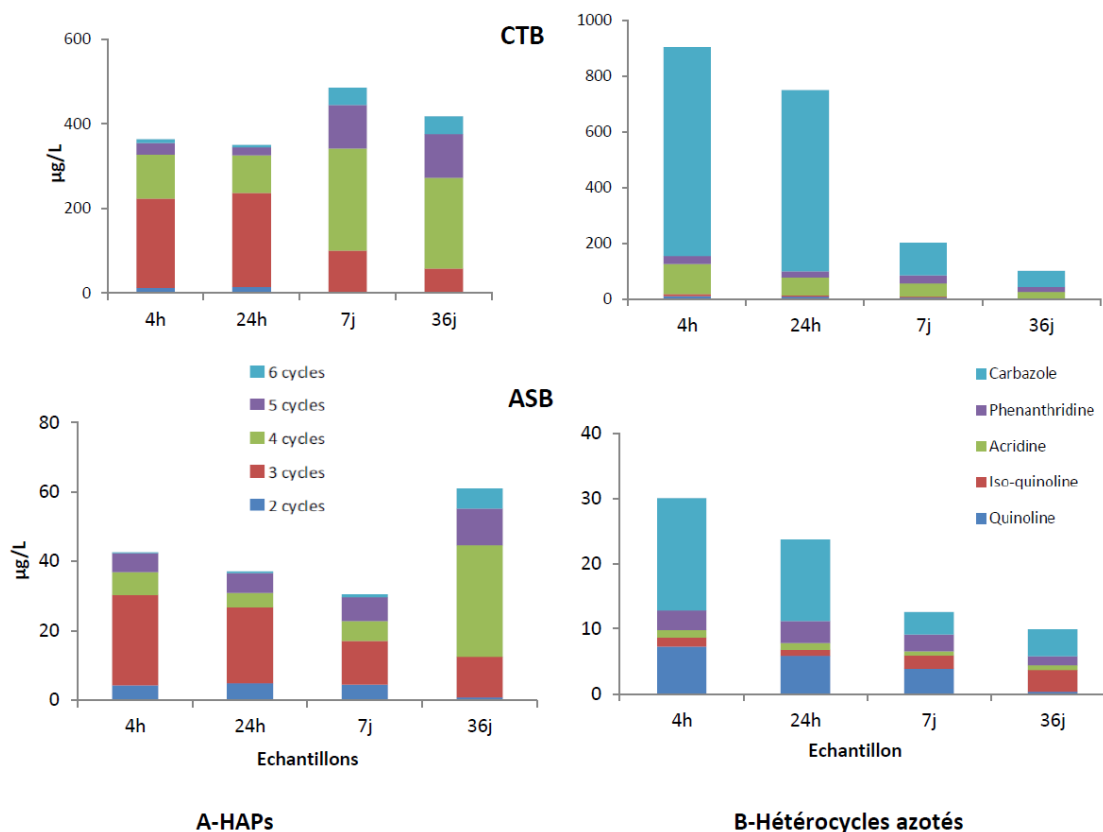


Figure 49 : Concentrations (A) en HAPs selon leur complexité et (B) en hétérocycles azotés en fonction du temps après l'application des revêtements de type CTB (haut) et ASB (bas).

Cette variation de la composition en HAPs dans le temps s'explique par la différence des volatilités et solubilités de ces composés selon leur taille. Les HAPs légers sont lessivés en premier et se volatilisent rapidement (Van Metre et al. 2012a). En conséquence leurs concentrations baissent dans les eaux de ruissellement avec le temps, alors que celle des HAPs les plus lourds augmentent, car ils sont lessivés plus tardivement et principalement avec la phase particulaire. Des analyses complémentaires dans l'air, donc de la fraction volatile des HAPs et des hétérocycles aromatiques ont également été réalisées et les résultats sont également en cours de publication par l'USGS.

Tous ces éléments traduisent la complexité de la composition des eaux de ruissellement étudiées, celle-ci variant quantitativement et qualitativement avec le temps écoulé après l'application du revêtement. Par ailleurs, ces analyses chimiques ne renseignent que sur une partie de tous les composés présents dans les échantillons. Il est donc très difficile d'évaluer un risque toxique de ces matrices sur la seule base de l'analyse chimique, mais les analyses

nous orientent sur les grandes familles de composés présents et sur les risques associés pour les écosystèmes récepteurs sur la base de ce qui est connu de leur activité biologique. L'application de biomarqueurs de génotoxicité sur des lignées cellulaires constitue dans un tel cas une approche adaptée à la problématique.

Enfin, signalons que les eaux ont été reçues congelées et stockées à -80°C. Cette congélation, rendue indispensable par le transport des échantillons depuis les Etats-Unis, puis nécessaire compte tenu de leur septicité potentielle, a pu modifier des propriétés physico-chimiques des matrices, engendrer la perte de molécules volatiles et au bilan légèrement modifier leur composition.

2.3 Evaluation écotoxicologique des eaux de ruissellement « CTB » et « ASB sealcoat » : tests monospécifiques

Des tests d'écotoxicité³ ont été conduits par le Columbia Environmental Research Center sur des daphnies (*Ceriodaphnia dubia*) et sur des embryons de cyprinidés (*Pimephales promelas*). Ces tests consistaient en une exposition de 48h des deux organismes sous lumière ambiante. Leur survie/mobilité a été déterminée après 2h, 4h, 24 et 48h d'exposition aux eaux de ruissellement pour chaque échantillon et pour 2 taux de dilution des eaux brutes : 10 et 100%, plus un contrôle. Les organismes survivants ont été transférés dans des chambres d'exposition propres contenant l'eau du contrôle et exposés pendant 4h à un faible niveau d'irradiations aux UVA-B de 0.04 J/m²/s afin de tester une potentielle augmentation de la toxicité par l'irradiation aux UV. La survie/mobilité des organismes a été déterminée immédiatement après les 4h d'irradiation et après une période de récupération de 20h sous lumière ambiante.

Ces études rapportent 100% de mortalité chez les deux espèces après 24h d'exposition à l'eau de ruissellement de type CTB non diluée (100%) pour les échantillons prélevés 4h, 24h et 7 jours après l'application. Aucune mortalité n'a été observée après exposition aux eaux de ruissellement de type CTB diluée à 10%, excepté quand l'exposition est suivie par une exposition de 4h aux UV, auquel cas 100% de mortalité est observée chez *Cerodaphnia dubia* pour tous les échantillons, ce qui souligne l'importance de la photoactivation des HAPs dans leur écotoxicité. Par ailleurs, aucune mortalité n'est observée après exposition aux eaux de ruissellement de type ASB diluées à 10%, avec ou sans exposition aux UV ; après exposition

³ Les résultats détaillés sont en cours de publication par l'USGS et l'Université de Columbia (Columbia Environmental Research Center)

aux eaux de ruissellement de type ASB non diluée, une mortalité est observée uniquement après exposition aux UV.

Les résultats de ces tests montrent clairement, malgré la différence de sensibilité entre les deux espèces, que le « CTB sealcoat » est plus toxique que l'« ASB sealcoat » pour des expositions de 24h à 100% d'eaux brutes, et que cette toxicité perdure dans le temps jusqu'à 36 jours après l'application (Mahler et al. 2012b).

2.4 Evaluation écotoxicologique des eaux de ruissellement « CTB » et « ASB sealcoat » : cytotoxicité et génotoxicité sur la lignée cellulaire RTL-W1. Publication V en préparation

Résumé : Cette étude a pour objectif l'évaluation de la cytotoxicité et de la génotoxicité d'eau de ruissellement de deux revêtements urbains, un à base de goudron de houille (CTB), et un à base d'Asphalte (ASB), faisant office de témoin. Ces eaux de ruissellement représentent une source majeure de contamination aux HAPs et aux hétérocycles azotés des lacs urbains américains. Trois biomarqueurs ont été étudiés sur la lignée cellulaire RTL-W1: la viabilité cellulaire, la mesure du dommage primaire à l'ADN par un essai comète Fpg-modifié, et la mesure des capacités d'incision de la Réparation par Excision des Bases (BERc). Les expositions ont été réalisées avec et sans activation des HAPs aux UVA.

Aucune cytotoxicité n'a été mise en évidence quelles que soit les eaux de ruissellement testées et la dilution testée (0,01 ; 0,10 ; 1 et 10%). Par contre, un potentiel génotoxique des deux types d'eaux de ruissellement est mis en évidence par l'essai des comètes Fpg-modifié. Ce potentiel génotoxique est supérieur pour les eaux de ruissellement type « CTB », et il augmente avec le temps post-application.

L'exposition aux UVA augmente la génotoxicité des deux types d'eaux de ruissellement, et plus particulièrement celle des eaux de ruissellement « CTB ». Les capacités d'incision des extraits cellulaires tendent à diminuer après 24h d'exposition aux deux types d'eaux de ruissellement avec ou sans exposition aux UV, mais cette diminution n'est significative que pour les eaux de type « CTB ».

Ces résultats confirment le potentiel génotoxique de ces eaux de ruissellement, et plus particulièrement des eaux « CTB ».

Assessment of coal-tar and asphalt based sealcoat runoff cytotoxicity and genotoxicity on the RTL-W1 fish cell line

Aude Kienzler¹, Barbara J. Mahler², Peter C. Van Metre², Jennifer T. Wilson², Alain Devaux¹ and Sylvie Bony¹

¹ Université de Lyon, UMR LEHNA 5023, USC INRA IGH, ENTPE, rue Maurice Audin, Vaulx-en-Velin F-69518, France

² U.S. Geological Survey, 8027 Exchange Drive, Austin, Texas 78754, United States

Abstract

In a context of growing awareness of aquatic pollution impacts, *in vitro* biological models such as fish cell lines warrant to be evaluated as possible alternative to *in vivo* fish testing, and new toxicity endpoints such as genotoxicity deserve to be considered. This study assesses the cytotoxicity and genotoxicity of runoff water from two pavement sealcoating product, one coal-tar based (CTB), and one asphalt-based (ASB). The Formamido pyrimidine glycosylase(Fpg)-modified Comet assay and the Base Excision Repair comet assay (BERc) were used on the RTL-W1 fish cell lines to assess both primary DNA damage and Base Excision Repair incision capacity of cell extracts after exposure to runoff water, with and without HAP activation by UVA exposure. No cytotoxicity was shown with both runoff waters. A genotoxic effect was shown with ASB and CTB runoff water, which seems to increase with the time post-application. The ASB and especially the CTB genotoxic effect were increased by exposure to UVA. The excision repair capacities of cell extracts were decreased by exposure to both ASB and CTB runoff water, for every sampling time, but this decrease was significant only after exposure to CTB runoff water. Those results confirm the genotoxic potential of CTB-runoff water.

Keywords: Genotoxicity, RTL-W1, Comet assay, Formamido pyrimidine glycosylase, Base Excision Repair Comet assay

1. Introduction

Pavement sealants and in particular coal-tar-based ones have been described as an important cause of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contamination in the urban environment (Mahler et al. 2005; Van Metre et al. 2009). They are identified both as a source of volatile PAHs to the atmosphere (Van Metre et al. 2012a; Van Metre et al. 2012b), and as a major PAHs contamination source for urban lakes and streams in the US and Canada (Van Metre et Mahler 2010). Due to their relative persistence to degradation, PAHs are ubiquitous and important contaminants of ecotoxicological concern. They have been shown to induce oxidative stress and persistent DNA adducts in exposed aquatic organisms (Stein et al. 1994; McFarland et al. 1999).

Most sealcoat products have either a refined coal-tar or an asphalt (crude oil) base. Sealcoat products that are coal-tar-based (CTB) typically contain 20-35 % coal-tar pitch, a known carcinogen containing itself up to 50% PAHs. The medium concentration of the sum of 16 PAHs (US-EPA priority list) in CTB sealcoat products can reach more than 50,000 mg/kg (dry weight basis) when the average for asphalt-based sealcoat (ASB) products is about 50 mg/kg (Van Metre et Mahler 2010). After application and once dry, the sealcoat product is abraded into a powder and becomes part of the dust in the pavement, which is transported by storm runoff to storm water management devices or to receiving streams and lakes (Mahler et al. 2012a). Thus, the annual loss of sealcoat from parking lots or driving areas is about 2.4 to 5% of total sealcoat applied. Besides HAPs, runoff water from CTB sealcoat also contains significant amounts of N-heterocyclic aromatic compounds such as carbazole, quinoline and acridine also known to affect the aquatic biota. Thus, runoff water stemming from such sealant contains complex mixtures of contaminants and deserves a thorough ecotoxicological risk assessment with the major challenge to take into account changes in its chemical complexity along time.

The aims of this study was to assess both cytotoxicity and genotoxicity (primary DNA damage and DNA repair activity) of runoff water samples from parking lots at various time post-application of CTB and ASB sealcoats. This was realized with the RTL-W1 liver fish cell line which is frequently used in ecotoxicity studies including genotoxicity testing of chemicals and of complex environmental matrixes (Schirmer et al. 2004; Schnell et al. 2009a; Boettcher et al. 2010; Perovic et al. 2012). This cell line possesses the Aryl hydrocarbon receptor (AhR) and biotransformation capacities including both constitutive and inductive CYP450-dependent activities (Bols et al. 1999; Babín et al. 2005b), allowing PAHs

biotransformation into potent genotoxic byproducts in the form of diol epoxide that covalently bind to DNA, such DNA lesions being highly mutagenic (Durant et al. 1996; Kawanaka et al. 2008). As PAHs can also interfere with DNA *via* the quinone pathway, leading to ROS formation and subsequent DNA bases oxidation, genotoxicity has been measured in this work by means of a Fpg-modified comet assay previously shown to reveal with a good sensitivity the oxidative DNA damage stemming from the model PAH, Benzo(a)Pyrene in the RTL-W1 cell line and as a whole, to improve the panel of DNA lesions detected, especially towards oxidation and alkylation. Additionally, as oxidation and UV radiation can modify parent PAHs making them more or less toxic (Monson et al. 1999; Albers 2002), the effect of a concomitant UV exposure has also been investigated in the present study.

As DNA repair capacities have been shown to be possibly inhibited by exposure to environmental pollutants such as HAPs (Espina et Weis 1995), runoff water effect on base excision repair capacity was here studied using the Base Excision Repair comet assay recently adapted to fish cell lines (Kienzler et al. 2013).

2. Materials and Methods

2.1 Cell culture

RTL-W1 is a non-transformed rainbow trout liver cell line established by Lee *et al.* (1993). Cells were cultured routinely at 20°C in Leibovitz's (L-15) medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL) in CO₂ free incubators. Cells were trypsinized twice a week using 0.25% trypsin with 0.03% EDTA. Experiments were carried out with cells aged from passage 65 to 75. Culture medium and all cell culture reagents were provided by Gibco® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

2.2 Sealant application and simulation of rain water runoff

Water used to simulate rain runoff was prepared at the USGS Columbia Environmental Research Center (CERC) and shipped to Austin, Texas, in cooled CUBITAINERS®. The water was prepared as a mixture of USGS-CERC well water and of deionized water to create a diluted water with the following water-quality characteristics: 100 mg/L hardness and 90 mg/L alkalinity expressed as CaCO₃, pH 8.3 (mg/L: Ca 28, Mg 10, K 1.0, Na 10, Cl 12, SO₄ 19, and dissolved organic carbon 0.5). This water was also used as negative control (mentioned as “control water” hereinafter).

Sealant (CTB or ASB) was applied by a commercial applicator following industry norms to two test plots on the Pickle Research Campus, University of Texas, Austin, USA. Runoff was simulated at specified times after application (4h, 24h, 7 and 36 days) following the procedure described by Mahler et al. (2005). Briefly, spill berms were used to contain water lightly sprayed onto an area of 10 m² and the water was recovered from behind the spill berms by pumping into a churn splitter with a high-volume peristaltic pump. For each sample, runoff was obtained from a 10 m² area not previously sampled. Applying 25 L to the 10 m² area is equivalent to a depth of 0.25 cm of rain (about 0.1 inches). Recovered water was split, during churning, into several 1-L baked amber glass bottles for analysis of PAHs and archival (frozen). Frozen samples were sent to France and toxicity measurements were realized immediately after defrost on samples homogenized by a 5 min sonication followed by 5 min vortexing, in order to homogenize the solution.

2.3 Exposure protocol

Twenty-four hours prior to exposure, RTL-W1 were seeded in black 96-well plates (Fluonunc, 100 µL/well) at a density of 200 000 cells/mL for cytotoxicity, and in transparent 24-well plates (Nunc, 500 µL/well) at a density of 150 000 cells/mL for genotoxicity measurement.

In order to maximize the availability of contaminants, a 24-hour exposure was performed in L-15/ex medium (1.14 M NaCl; 45 mM KCl; 13 mM MgSO₄; 17 mM MgCl₂; 10 mM CaCl₂; 11 mM Na₂PO₄; 3,66 mM KH₂PO₄; 42 mM sodium pyruvate; 42 mM galactose) complemented with penicillin (100 IU/mL) and streptomycin (100 µg/mL). In order to prevent osmolarity variation, exposure medium was constituted of 9 parts of the a X1.1 L-15/ex medium and 1 part of runoff water (collected 4h, 1, 7, and 36 days post-sealants application) at an appropriate dilution in demineralized water in order to obtain the various dilution rates: 0.01, 0.10, 1 and 10% of runoff water for cytotoxicity examination, in order to obtain environmentally realistic dilution. The highest concentrations without cytotoxic effect were chosen (1 and 10%) for genotoxicity assessment. Cells were also exposed (or not) to UVA (using two Vilbert Lourmat T15- L lamps (365 nm) for 2h (2.4 J/cm²) at the beginning of the runoff water exposure to assess a possible increased toxicity due to photoactivation of some runoff contaminants.

2.4 Cytotoxicity

Cell viability was evaluated by the Cell Titer Blue® viability assay (Promega, France). Twenty hours after exposure, 20 µL of the cell Titer Blue® solution were added to each well and let to incubate for 4h. Fluorescence was recorded (λ_{Ex} 560 nm, λ_{Ex} 590 nm) using a fluorescence plate reader (Fluostar Optima BMG Labteck, France). Each test was realized in triplicate with 6 wells per concentration per replicate. Cytotoxicity is expressed as mean \pm SEM of the three replicates.

2.5 Fpg-modified Comet Assay

Following exposure, cells were processed for the Fpg-modified comet assay under alkaline condition according to the method previously described (Kienzler et al. 2012).

2.6 Base Excision Repair Comet assay

The protocol of the Base Excision Repair comet assay (BERc) is based on the method proposed by Collins et al. (2001b) adapted to the RTL-W1 fish cell line as previously described (Kienzler et al. 2013. *In press*). This assay measures the capacity of a cell free extract to perform the initial step (i.e. damage recognition and incision) of the BER pathway when applied on a substrate DNA carrying 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) lesions. This cell free extract is prepared after exposure to run-off water or to a model BER inhibitor, 3-aminobenzamide (2.5 mM), used as a positive control. Cells were trypsinized, centrifuged (10 min, 800g, 4°C), and the cell pellet suspended in cold PBS at a final cell density of 3.10^6 cells/mL. One mL aliquots were then centrifuged and the resulting “dry cell pellet” were flash-frozen for 1 minute in liquid nitrogen and then stored at -80°C until use. Three totally independent cell extracts realized were prepared per condition.

For BERc assay, aliquots of cell extracts were thawed and lysed with 65 µL buffer A (45 mM HEPES, 0.4 M KCl, 1 mM EDTA, 0.1 mM dithiothreitol, 10% glycerol, 0.25% Triton X-100, pH 7.8); lysate was centrifuged to remove nuclei and cell debris. Fifty-five µL of the supernatant were then mixed with 245 µL of reaction buffer F (0.1M KCl, 0.5 mM Na₂EDTA, 40 mM HEPES, 0.2 mg/mL bovine serum albumin, pH 8.0), and 30µL of this suspension was let to incubate 45 min on substrate DNA mixed in agarose gel on microscope slides. Control gels incubated with F buffer alone or with Fpg enzymes (0.4 UI/gel as a positive control) were also done. The total protein content of the cell extract was determined in the remaining 10 µL with the fluorescamine assay according to Lorenzen and Kennedy (1993).

Then, DNA unwinding, electrophoresis and comet scoring were performed as described previously (Kienzler et al. 2013. In press). Percentage tail intensity (%TI) of 50 randomly selected cells was scored per gel and 2 gels were realized per sample.

3. Results

3.1 Cytotoxicity

No significant cytotoxicity was shown after the 24h exposure to runoff water from coal-tar-based or asphalt-based pavement sealants, and no significant difference between CTB and ASB treatments were observed. No additional cytotoxic effect due to UVA exposure was demonstrated (Table 1 and 2).

		CTB			
		0,01%	0,1%	1%	10%
No UVA	4h	106,4±6,1	116,8±5,2	115,1±3,1	105,8±3,8
	24h	104,5 ±7,1	114,3±3,4	119,7±0,7	119,4±2,0
	7j	89,8±6,1	115,0±5,2	110,9±3,1	108,2±3,8
	36j	105,7±6,4	112,4±7,9	109,9±9,9	115,3±9,9
UVA	4h	117,4±7,21	105,4±3,0	118,6±5,2	113,5±4,1
	24h	102,5±4,6	107,5±5,2	102,8±4,1	98,3±4,9
	7j	102,9±8,5	115,4±5,6	107,1±6,4	97,5±1,3
	36j	94,4±5,6	105,0±7,5	116,7±4,1	111,5±4,9

Table 1: Cell viability after a 24h exposure to coal-tar-based runoff water collected at different times, in combination or not with UVA exposure (2.4 J.cm⁻²). Results are expressed as % viability compared to control and are mean ± SEM of 3 independent replicates. *: significant difference with the control, p<0.05

		ASB			
		0,01%	0,1%	1%	10%
No UVA	4h	115,6±6,8	114,2±1,7	113,8±2,0	109,3±9,3
	24h	122,2±2,3	122,3±0,9	122,7±1,4	112,1±9,5
	7j	119,9±2,9	118,5±5,3	124,±0,83	119,7±6,2
	36j	108,6±2,1	114,0±3,5	113,47±6,7	112,9±5,3
UVA	4h	111,1±4,6	113,8±0,1	126,8±4,8	109,1±3,2
	24h	113,8±9,8	103,3±8,4	120,6±5,2	85,4±0,3
	7j	118,8±13,3	113,2±8,5	112,3±10,1	116,1±6,9
	36j	106,2±10,4	103,2±10,4	102,8±7,3	99,1±8,4

Table 2: Cell viability after a 24h exposure to asphalt-based runoff water collected at different time, in combination or not with UVA exposure (2.4 J.cm⁻²). Results are expressed as % viability compared to control and are mean ± SEM of 3 independent replicates. *: significant difference with the control, p<0.05

3.2 Genotoxicity (Fpg-modified comet assay)

As the results obtained with the standard version of the comet assay failed to detect genotoxicity, they are not presented here for the sake of clarity. After exposure to ASB runoff water without UV, only the sample collected on day 7 (10%) and 36 (1%) showed a significant increase when compared to their respective control (Fig. 1).

A significant genotoxic effect was also shown after co-exposure to 1% ASB runoff water and UVA at day 7 and 36 after exposure to 1% ASB runoff water alone at day 36 (Fig. 1). When exposure to UVA (2,4 J/cm²) was added to 10% ASB runoff water exposure, a significant genotoxicity effect was noticed in RTL-W1 cells from day 1 to day 36.

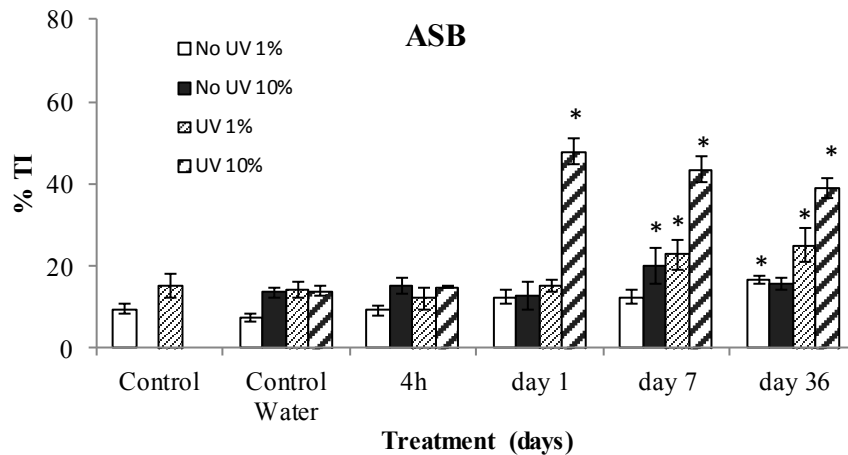


Figure 1: Genotoxicity of asphalt-based runoff water collected at different times measured by the Fpg-modified comet assay; with (striped bars) or without (full colored bars) exposure to UVA (2.4 J/cm²). Control: non-exposed cells; Control Water: cells exposed to 1 or 10% control water. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent replicates. *: significant difference with the corresponding control ($p < 0.05$).

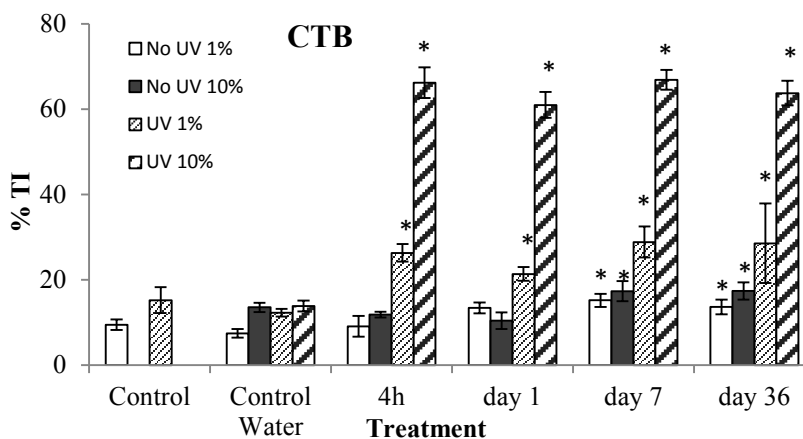


Figure 2: Genotoxicity of coal-tar-based runoff water collected at different times measured by the Fpg-modified comet assay; with (striped bars) or without (full colored bars) exposure to UVA (2.4 J/cm^2). Control: non-exposed cells; Control Water: cells exposed to 1 or 10% control water. Results are expressed as the mean \pm SD of three independent replicates. *: significant difference with the corresponding control ($p < 0.05$).

After exposure to CTB runoff water alone, a significant genotoxic effect was shown on day 7 and 36 at both rate of dilution. When exposed to both UVA ($2,4 \text{ J/cm}^2$) and 1 or 10% CTB runoff water, RTL-W1 cells suffered a significant genotoxicity whatever the time (Fig. 2).

	Control Water	0.2	1	7	36 (days)
CTB runoff	1.1 \pm 0.2	5.6 \pm 1.0*	5.7 \pm 1.9*	3.8 \pm 1.2*	4.0 \pm 1.3*
ASB runoff	1.1 \pm 0.2	1.1 \pm 0.4	3.4 \pm 1.4*	1.8 \pm 0.5	2.5 \pm 0.55

Table 3: Induction factor in DNA damage after co-exposure to 10% of runoff water collected at different time and to UVA (2.4 J.cm^{-2}) when compared with exposure to 10% runoff water alone. * significant difference when compared to control water induction factor.

Depending on the sampling time, increase in DNA damage reached a 1.1 to 3.4 fold value in cells co-exposed to 10 % ASB runoff water and UVA when compared to cells exposed to ASB runoff water alone, and a 3.8 to 5.7 fold value in cells co-exposed to 10% CTB runoff water and to UVA when compared to cells exposed to CTB runoff water alone

(Table 3). A significant difference when compared to control water induction factor was observed for every CTB sample, and for the day 1 ASB sample.

3.3 Base excision repair activity (BERc assay)

In the present work no non-specific endonuclease activity of the cell extracts was observed i.e. low incision level of undamaged DNA was obtained (1.7 +/- 0.8 %TI) assessing the quality of extract preparation. The basal incision level of the RTL-W1 cell line measured on cells exposed to 10% control water only was not modified by 2h UVA exposure. Data were analyzed using a multifactorial ANOVA (UV and samples effects). Among treatments, there was a significant sample effect ($p < 0.001$) but no significant overall UV effect was shown. A significant decrease was observed in extract incision capacity after exposure to the model BER inhibitor 3AB. After exposure to ASB and CTB runoff water samples (co-exposed or not to UV) collected at day 1 and 36, a global trend to a decreasing incision capacity of the cell extracts was measured, but this decrease was significant only for CTB samples (Table 4).

	Controls			ASB		CTB	
	Control Water	Positive control (Fpg)	Negative control (3AB)	Day 1	Day 36	Day 1	Day 36
No UV	47.2±3.7	67.6±1.6	19.8±5.8 ^a	37.7± 3.4	36.4±4.6	30.4±2.3 ^a	32.9±6.2 ^a
UV	46.4±2.9			43.1±5.3	43.5±6.2	28.7±5.7 ^b	24.1±5.5 ^b

Table 4: BER capacity of cell extract after exposure to 24h of coal-tar-based (CTB) or asphalt-based (ASB) 10% runoff water collected at different times with or without co-exposure to UVA (2.4 J/cm²). Positive control: Fpg digestion of DNA damaged substrate. Control Water and Water + UV: cells exposed to 10% control water only. 3AB: model BER inhibitor (2.5 mM). Results are expressed as the mean ± SD of three independent replicates. *a*: significant difference vs the control water, *b*: significant difference vs control water+UV (ANOVA, Dunett Post'hoc test).

4. Discussion

All runoff water samples were analyzed at USDS (Austin, Texas, USA) for PAHs and heterocyclic aromatic compounds. Coal-tar-based sealant runoff samples were found 10 and 30 times more contaminated by PAHs and N-heterocyclic compounds respectively than asphalt-based runoff samples, with total PAHs concentrations (16 US-priority PAHs) ranging from 30.5 to 61 and 197 to 485 µg.L⁻¹ in ASB and CTB runoff samples respectively. Total N-

heterocyclic aromatic compounds concentrations ranged from 10 to 30 and 102 to 904 $\mu\text{g.L}^{-1}$ in ASB and CTB runoff respectively depending on sampling time (B. Malher, personal communication⁴). Chemical composition of runoff water changed with time of sampling, the proportion of more complex PAHs (4, 5 and 6 cycles) increasing from 38 to 95% from 4h to day 36 whereas the proportion of lighter PAHs (2 and 3 cycles) decreased from 62 to 14% in the same time, probably due to their higher volatility. The amount of N-heterocyclic compounds decreased rapidly with the sampling time, with a 20% loss during the first 24h.

Heterocyclic aromatic compounds (NSO-HET) have been shown to be cytotoxic to the H4IIE-luc rat hepatoma cell line after a 24h exposure, with a LOEc range of 0.02 to 0.03 g.L^{-1} for acridine, carbazole, quinoline and isoquinoline (Sovadinová et al. 2006), and carbazole leads to *Daphnia* immobilization at EC_{50} values below 10 mg.L^{-1} (Eisentraeger et al. 2008). Carbazole and acridine have also been shown to have dioxin-like effects on RTL-W1, with EC_{25} effect of 1.88 and 1.72 mg.L^{-1} respectively (Hinger et al. 2011), and to induce a 10% reduction of reproductive output in *Enchytraeus crypticus* at 19 and 310 mg.kg^{-1} soil respectively (Sverdrup et al. 2002). Those concentrations reported in literature are much higher than the concentration tested here (10 to 90 $\mu\text{g.L}^{-1}$ of total aromatic heterocycles), which is coherent with the fact that the present study did not show any cytotoxic effect of runoff water, from both coal-tar-based and asphalt-based sealant pavement.

Concerning effects of PAHs found in sealcoat, *in-vivo* studies showed a significant decrease in amphibian survival, growth, swimming ability and development after exposure water containing CTB sealcoat dust corresponding to 30 ppm total PHAs (Bryer et al. 2006). An interactive effect of sealant and UV radiation on swimming behavior has been observed in spotted salamander for concentration TPAHs water concentration as low as 72.2 $\mu\text{g.L}^{-1}$, which is in the same order of magnitude than concentration tested in this study (30 to 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ TPAHs) (Bommarito et al. 2010). Coal-tar-based sealcoat has also been demonstrated to increase embryonic and larvae mortality in fish at PAHs concentrations of 0.470 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Kocan et al. 1996) and to inhibit growth and biodiversity of macro invertebrates and benthic phytoplankton (Oberholster et al. 2005; Mahler et al. 2012a). However, in the rainbow trout cell line RTGill-W1, PAHs were shown to have a low acute toxicity (EC_{50} of 6.4 mg.L^{-1} for naphthalene, the only one showing a significant cytotoxicity well below its water solubility limit) (Schirmer et al. 1998). In North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) cell lines,

⁴ Cf. Chapitre V § 1-3-2

cytotoxicity was highlighted after a 24h exposure to 2.52 mg/L benzo[a]pyrene (B[a]P) (Godard et al. 2006), which is in line with our results. However in the same study, a significant B[a]P cytotoxicity was found after a 48 h exposure to 2.52 $\mu\text{g.L}^{-1}$. This point highlights the necessity for PHAs to be bioactivated in order to fully express their toxicity. Thus, it should have been interesting in the present study to test the runoff water cytotoxicity after 48h exposure as well, but this was not possible because of the sepsis of the samples. Therefore, results obtained after a 24h exposure may have underestimate the acute toxicity of the samples, what highlights the necessity to consider other additional endpoints such as genotoxicity in the ecotoxicological assessment of such runoff water. As a whole, since runoff water would probably be even more diluted in the environment than in the present work, on the basis of the results obtained one could consider acute toxicity of CTB sealcoat as being negligible at least up to a 10% dilution rate. This is in accordance with another study showing no acute toxicity on two aquatic organisms, *Ceriodaphnia dubia* and *Pimephales promelas* exposed for 24h to a 10% dilution of the same ASB and CTB runoff samples (Mahler et al. 2012b).

Both ASB and CTB runoff waters exhibited a genotoxic potential, detected in the majority of the tested samples by the Fpg-modified comet assay. The interest of the Fpg-modified comet assay was shown to assess genotoxic potential of model genotoxicant by broadening the panel of lesions detected and to improve the detection of benzo[a]pyrene genotoxicity due to reactive oxygen species in RTL-W1 cell line (Kienzler et al. 2012). Those results confirm its interest for assessing a genotoxic potential of complex mixtures in an environmental context, keeping in mind the fact that PAHs genotoxicity closely depends on the composition of the mixture (Tarantini et al. 2009; Tarantini et al. 2011).

The present study results also validates the use of the Fpg-comet assay to assess specific DNA damages after exposure to PAHs, such as base oxidation *via* the quinone pathway, in complement to assays measuring other endpoints such as DNA adduct formation. UVA exposure of PAHs, by forming reactive oxygen species, increases DNA damage such as oxidized bases (Toyooka et Ibuki 2007), and allows simulating what would happen in the aquatic environment exposed to sunlight. Without UVA photoactivation, no difference between the genotoxic potential from coal-tar-based and asphalt-based runoff water is noticed. However, after co-exposure to coal-tar based runoff water and UVA, the increase in genotoxicity is significant, which can be explained by its higher content in PAHs than in ASB runoff samples. The fact that genotoxicity was detected after photoactivation in 1 % ABS

runoff water, 7 days after application of the sealant, and in CTB runoff water at every sampling times, highlights the genotoxic hazard in aquatic ecosystems at environmentally relevant dilution of runoff water. Genotoxicity detected *via* the primary DNA damage measurement in runoff water remains constant along the time, in spite of the highly variable composition of the runoff water, which underlines the interest in using such a biomarker to highlight potential long-term genotoxic effects.

As L-15ex was used as exposure medium, without serum, the risk of limiting pollutant bioavailability due to interaction with organic matter is decreased as well as possible interference between ultraviolet radiation and amino acids or vitamins present in standard L-15 medium (Schirmer et al. 1997; Schirmer et al. 2004). Moreover, the knowledge of the runoff water composition has to be improved, as its detailed composition is not known and other compounds than PAHs and N-heterocyclic aromatics compounds can also be present and interact (Thami et Sarkar 2002). Thus, a genotoxic potential has also been shown in asphalt-based sealant despite its low PAHs and N-heterocyclic aromatic contents.

Concerning DNA repair activity, a 24h exposure to all samples exposed or not to UV induces a decrease in BER capacity of the RTL-W1 extracts up to day 36, showing that this inhibitory effect on cell incision capacity persists in the long-term. There are few data in literature concerning possible effect of HAPs and heterocyclic compounds on DNA repair in general and on BER in particular. Gagné et al. (2012) found that exposure of rainbow trout hepatocytes to oil-sand process-affected waters induced the expression of DNA ligase gene, implied in DNA repair. Contamination by PAHs has also been reported to upregulate *XRCC5* gene expression, a gene participating in Non Homologous End Joining (Rossner Jr et al. 2011). Moreover, the presence of BDPE adducts on DNA was shown to limit Base Excision Repair of AP sites (Skosareva et al. 2012). Thus, incision decrease shown here could have stemmed from a gene expression modulation, or from the presence of other DNA lesions due to PAHs exposure. Altogether, this work shows that simultaneous observation of primary DNA damage and DNA repair modulation could allow for a better assessment of the genotoxic risk in an environmental context, as illustrated by the fact that BER might also be implied in the repair of minor BDPE adducts (Braithwaite et al. 1998; Yu et al. 2012).

Conclusion

This study shows that both CTB and ASB sealcoat can lead to a long term environmental risk related to their genotoxic potential, especially in the case of the CTB when associated to UV exposure.

According to Claxton et al. (1998), about a third of aquatic environmental pollutants are susceptible to have a genotoxic potential. In this context, this work validates the use of *in vitro* tools such as the RTL-W1 fish cell line to assess the genotoxic hazard of environmental matrices such those stemming from the use of coal-tar and to a lesser extent of asphalt-based sealants which are still of great concern in some countries.

References

- Albers, P. (2002). Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. Handbook of Ecotoxicology, Second Edition. D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton Jr and J. Cairns Jr, CRC Press.
- Babín, M., S. Casado, A. Chana, B. Herradón, H. Segner, J. V. Tarazona and J. M. Navas (2005). Cytochrome P4501A induction caused by the imidazole derivative Prochloraz in a rainbow trout cell line. *Toxicology in Vitro* **19** (7): 899-902.
- Boettcher, M., S. Grund, S. Keiter, T. Kosmehl, G. Reifferscheid, N. Seitz, P. S. Rocha, H. Hollert and T. Braunbeck (2010). Comparison of *in vitro* and *in situ* genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **700** (1-2): 11-17.
- Bols, N. C., K. Schirmer, E. M. Joyce, D. G. Dixon, B. M. Greenberg and J. J. Whyte (1999). Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44** (1): 118-128.
- Bommarito, T., D. W. Sparling and R. S. Halbrook (2010). Toxicity of coal-tar pavement sealants and ultraviolet radiation to *Ambystoma Maculatum*. *Ecotoxicology* **19** (6): 1147-1156.
- Braithwaite, E., X. Wu and Z. Wang (1998). Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms *in vitro*. *Carcinogenesis* **19** (7): 1239-1246.
- Bryer, P., J. N. Elliott and E. Willingham (2006). The effects of Coal Tar Based pavement sealer on amphibian development and metamorphosis. *Ecotoxicology* **15** (3): 241-247.
- Claxton, L. D., V. S. Houk and T. J. Hughes (1998). Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **410** (3): 237-243.
- Collins, A. R., M. Dušinská, E. Horvathova, E. Munro, M. Savio and R. Štětina (2001). Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured *in vitro* with the comet assay. *Mutagenesis* **16** (4): 297-301.
- Durant, J. L., W. F. Busby Jr, A. L. Lafleur, B. W. Penman and C. L. Crespi (1996). Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutation Research. Genetic Toxicology* **371** (3-4): 123-157.
- Eisentraeger, A., C. Brinkmann, H. Hollert, A. Sagner, A. Tiehm and J. Neuwoehner (2008). Heterocyclic compounds: Toxic effects using algae, daphnids, and the Salmonella/microsome test

taking methodical quantitative aspects into account. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27** (7): 1590-1596.

Espina, N. G. and P. Weis (1995). DNA Repair in fish from polluted estuaries. *Marine Environmental Research* **39** (1-4): 309-312.

Gagné, F., M. Douville, C. André, T. Debenest, A. Talbot, J. Sherry, L. M. Hewitt, R. A. Frank, M. E. McMaster, J. Parrott and G. Bickerton (2012). Differential changes in gene expression in rainbow trout hepatocytes exposed to extracts of oil sands process-affected water and the Athabasca River. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **155** (4): 551-559.

Godard, C. A. J., S. S. Wise, R. S. Kelly, B. Goodale, S. Kraus, T. Romano, T. O'Hara and J. P. Wise Sr (2006). Benzo[a]pyrene cytotoxicity in right whale (*Eubalaena glacialis*) skin, testis and lung cell lines. *Marine Environmental Research* **62**, **Supplement 1** (0): S20-S24.

Hinger, G., M. Brinkmann, K. Bluhm, A. Sagner, H. Takner, A. Eisenträger, T. Braunbeck, M. Engwall, A. Tiehm and H. Hollert (2011). Some heterocyclic aromatic compounds are Ah receptor agonists in the DR-CALUX assay and the EROD assay with RTL-W1 cells. *Environmental Science and Pollution Research* **18** (8): 1297-1304.

Kawanaka, Y., E. Matsumoto, N. Wang, S.-J. Yun and K. Sakamoto (2008). Contribution of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons to the mutagenicity of ultrafine particles in the roadside atmosphere. *Atmospheric Environment* **42** (32): 7423-7428.

Kienzler, A., S. Bony, X. Tronchère and A. Devaux (2013). Assessment of base excision repair activity in fish cell lines: towards a new biomarker of contaminant exposure? *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. **753** (2) 107-13.

Kienzler, A., X. Tronchère, A. Devaux and S. Bony (2012). Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. *Toxicology in Vitro* **26** (3): 500-510.

Kocan, R. M., M. B. Matta and S. M. Salazar (1996). Toxicity of weathered coal tar for shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) embryos and larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **31** (2): 161-165.

Lee, L. E. J., J. H. Clemons, D. G. Bechtel, S. J. Caldwell, K.-B. Han, M. Pasitschniak-Arts, D. D. Mosser and N. C. Bols (1993). Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biology and Toxicology* **9** (3): 279-294.

Lorenzen, A. and S. W. Kennedy (1993). A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Analytical biochemistry* **214** (1): 346-348.

Mahler, B. J., Van Metre P.C, J. L. Crane, A. W. Watts, M. Scoggins and E. S. Willams (2012a). Coal-tar-based pavement sealcoat and PAHs: implications for the environment, human health, and stormwater management. *Environmental Science and Technology* **46** (6): 3039-3045.

Mahler, B. J., P. C. Van Metre, T. J. Bashara, J. T. Wilson and D. A. Johns (2005). Parking lot sealcoat: an unrecognized source of urban polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* **39**: 5560-5566.

Mahler, B. J., P. C. Van Metre and J. L. Kunz (2012b). Acute toxicity of runoff from coal-tar- and asphalt-based pavement sealants to two aquatic organisms SETAC North America 33rd annual Meeting. Longbeach, California, Society of Environmental Toxicology and Chemistry. **n° 697**: 167-168.

McFarland, V. A., L. S. Inouye, C. H. Lutz, A. S. Jarvis, J. U. Clarke and D. D. McCant (1999). Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37** (2): 236-241.

Monson, P. D., D. J. Call, D. A. Cox, K. Liber and G. T. Ankley (1999). Photoinduced toxicity of fluoranthene to northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **18** (2): 308-312.

Oberholster, P. J., A. M. Botha and T. E. Cloete (2005). Using a battery of bioassays, benthic phytoplankton and the AUSRIVAS method to monitor long-term coal tar contaminated sediment in the Cache la Poudre River, Colorado. *Water Research* **39** (20): 4913-4924.

Perovic, A., S. Perovic, L. Erdinger and H. Hollert (2012). Assessment of the genotoxic potential of lake Skadar sediments using Ames test and comet assay on the fish cell line RTL-W1. *Archives of Biological Sciences* **64** (1): 249-256.

Rossner Jr, P., K. Uhlirova, O. Beskid, A. Rossnerova, V. Svecova and R. J. Sram (2011). Expression of XRCC5 in peripheral blood lymphocytes is upregulated in subjects from a heavily polluted region in the Czech Republic. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **713** (1-2): 76-82.

Schirmer, K., A. G. J. Chan, B. M. Greenberg, D. G. Dixon and N. C. Bols (1997). Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in Vitro* **11** (107-119).

Schirmer, K., V. R. Dayeh, S. Bopp, S. Russold and N. C. Bols (2004). Applying whole water samples to cell bioassays for detecting dioxin-like compounds at contaminated sites. *Toxicology* **205** (3): 211-221.

Schirmer, K., D. G. Dixon, B. M. Greenberg and N. C. Bols (1998). Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* **127** (1-3): 129-141.

Schnell, S., N. C. Bols, C. Barata and C. Porte (2009). Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1. *Aquatic Toxicology* **93** (4): 244-252.

Skosareva, L. V., N. A. Lebedeva, N. I. Rechkunova, A. Kolbanovskiy, N. E. Geacintov and O. I. Lavrik (2012). Human DNA polymerase λ catalyzes lesion bypass across benzo[a]pyrene-derived DNA adduct during base excision repair. *DNA Repair* **11** (4): 367-373.

Sovadinová, I., L. Bláha, J. Janosek, K. Hilscherová, J. P. Giesy, P. D. Jones and I. Holoubek (2006). Cytotoxicity and aryl hydrocarbon receptor mediated activity of N-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons: structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**: 1291-1297.

Stein, J. E., W. L. Reichert and U. Varanasi (1994). Molecular epizootiology: assessment of exposure to genotoxic compounds in teleosts. *Environmental Health Perspectives* **102** (12): 19-23.

Sverdrup, L. E., J. Jensen, A. E. Kelley, P. H. Krogh and J. Stenersen (2002). Effects of eight polycyclic aromatic compounds on the survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Clitellata). *Environmental Toxicology and Chemistry* **21** (1): 109-114.

Tarantini, A., A. Maitre, E. Lefebvre, M. Marques, C. Marie, J.-L. Ravanat and T. Douki (2009). Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **671** (1-2): 67-75.

Tarantini, A., A. Maître, E. Lefebvre, M. Marques, A. Rajhi and T. Douki (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells *Toxicology* **279**: 36-44.

Thami, G. P. and R. Sarkar (2002). Coal tar: past, present and future. *Clinical and Experimental Dermatology* **27** (2): 99-103.

Toyooka, T. and Y. Ibuki (2007). DNA damage induced by coexposure to PAHs and light. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **23** (2): 256-263.

Van Metre, P. C. and B. J. Mahler (2010). Contribution of PAHs from coal-tar pavement sealcoat and other sources to 40 U.S. lakes. *Science of The Total Environment* **409**: 334-344.

Van Metre, P. C., B. J. Mahler and J. T. Wilson (2009). PAHs underfoot: contaminated dust from coal-tar sealcoat pavements is widespread in the United States. *Environmental Science and Technology* **43** (1): 20-25.

Van Metre, P. C., M. S. Majewski, B. J. Mahler, W. T. Foreman, C. L. Braun, J. T. Wilson and T. L. Burbank (2012a). PAH volatilization following application of coal-tar-based pavement sealant. *Atmospheric Environment* **51**: 108-115.

Van Metre, P. C., M. S. Majewski, B. J. Mahler, W. T. Foreman, L. B. Braun, J. T. Wilson and T. L. Burbank (2012b). Volatilization of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal-tar-sealed pavement *Chemosphere* **88** (1): 1-7.

Yu, H., H. Zhao, L.-E. Wang, Z. Liu, D. Li and Q. Wei (2012). Correlation between base-excision repair gene polymorphisms and levels of *in-vitro* BPDE-induced DNA adducts in cultured peripheral blood lymphocytes. *PLoS ONE*(7): 7.

Chapitre VI - Discussion générale et perspectives

Le travail présenté ici avait d'emblée un caractère fortement prospectif avec pour objectif principal de développer de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité sur plusieurs modèles cellulaires de poisson, à l'aide de diverses versions de l'essai des comètes. Si la mesure des dommages primaires à l'ADN constitue d'assez longue date un biomarqueur de génotoxicité communément mis en œuvre, les mesures d'activités de réparation des dommages à l'ADN et du niveau de méthylation de ce dernier ont été très peu explorées jusqu'à présent dans le contexte de l'écotoxicologie. De ce fait, elles représentaient un challenge scientifique et technique à relever avec une prise de risque inhérente assumée. De plus, le choix d'aborder la mise en place de tels biomarqueurs sur des lignées cellulaires de poisson, constituant de tous nouveaux outils biologiques pour le laboratoire a représenté un défi supplémentaire. De ce fait, un certain nombre de difficultés ont été rencontrées qui n'ont pas toujours été surmontées malgré des efforts réitérés, en particulier dans le cas de la mise en place d'un biomarqueur épigénétique via la mesure du niveau de méthylation de l'ADN.

De manière générale, les résultats ayant été discutés dans les différentes parties de ce travail et les articles correspondants, nous nous limiterons dans cette discussion générale à ce qui paraît essentiel, en dégagant un certain nombre de perspectives. De manière explicite, il s'agira de proposer des solutions pour lever certains des verrous méthodologiques qui ont été rencontrés, et de valider plus avant les biomarqueurs étudiés. Par souci de simplicité, nous proposons de reprendre la chronologie des différentes parties de la thèse pour cette discussion générale, sachant que certains éléments seront à l'évidence transversaux.

1 Validation d'un essai des comètes Fpg-modifié pour augmenter la sensibilité de détection de dommages primaires à l'ADN dans des lignées cellulaires de poisson

L'évaluation de la génotoxicité *via* l'essai des comètes dans ses différentes déclinaisons exige de l'expérimentateur une évaluation préalable du potentiel cytotoxique de la molécule ou de la matrice à tester. Ceci est important dans le but de s'assurer que l'effet mesuré relève bien d'une génotoxicité vraie et non pas d'un effet artefactuel de type nécrotique et/ou apoptotique (Devaux et Bony 2013, In press). En ayant pris soin dans ce travail de veiller systématiquement à ce prérequis, nous avons observé à de nombreuses reprises qu'un effet génotoxique était mesurable à des doses très infra-cytotoxiques contribuant ainsi avec d'autres auteurs à mettre en évidence la capacité des biomarqueurs de génotoxicité à constituer des

indices particulièrement précoces de la dangerosité de substances pures ou de mélanges (Aramphongphan et al. 2009; Para et al. 2010). De tels résultats confortent l'intérêt de prendre en compte plus systématiquement l'information sur la génotoxicité dans les critères d'évaluation du risque environnemental, ceci en s'adossant sur le fait qu'un tiers des contaminants des milieux aquatiques sont suspectés génotoxiques (Claxton et al. 1998 ; Ohe et al. 2004).

Puisque la génotoxicité de nombreux contaminants peut s'exercer à des concentrations très faibles, sa mesure exige des techniques présentant la plus grande fiabilité et la plus grande sensibilité possible. Cette nécessité est par ailleurs justifiée dans les contextes de pluricontamination et à faible niveau de contamination qui sont les plus fréquemment rencontrés dans les écosystèmes aquatiques. Il devient alors particulièrement nécessaire que les biomarqueurs utilisés présentent le meilleur niveau de sensibilité possible, à la fois en terme quantitatif (seuil bas de détection) mais également qualitatif (prise en compte d'un large panel de mécanismes possibles conduisant à l'effet toxique mesuré) (Amiard et Amiard-Trinquet 2008). Ensuite (ou avant...), des critères de simplicité, de praticité et de faible coût viennent s'ajouter aux éléments de décision. C'est sur cette base que nous avons construit la première partie de notre travail en visant la mise en place d'un système simple mais fiable et sensible d'évaluation du dommage primaire à l'ADN en combinant essai des comètes et modèles cellulaires de poisson.

Bien que l'essai des comètes dans sa version alcaline standard fasse l'objet d'une reconnaissance et d'une utilisation très significative en écotoxicologie aquatique depuis plus d'une décennie, ses limites, notamment en terme de sensibilité de détection de certaines lésions à l'ADN non alcali-labiles telles que adduits stables, lésions oxydatives de type 8-oxo Gua ou purines adduites à cycle ouvert de type fapy-G et fapy-A, ont été soulignées par certains auteurs (Olive et Banath 1993; Tice et al. 2000; Jha 2004). Comme proposé historiquement par Collins et ses collaborateurs (Collins et al. 1997; Collins 2004), nous avons choisi dans ce travail de coupler l'essai des comètes standard à une étape de digestion enzymatique utilisant des endonucléases, non plus dans un objectif de caractérisation de la nature des lésions mais pour proposer une méthode de mesure des dommages primaires à l'ADN la plus sensible et ubiquiste possible. Le présent travail a ainsi contribué à une amélioration de la sensibilité évoquée pouvant atteindre dans certains cas un facteur X 1000 (publication II). A titre d'exemple, cet essai des comètes modifié a permis la mesure du potentiel génotoxique du B[a]P, HAP modèle dont la génotoxicité n'est généralement pas ou

médiocrement détectée par la version standard de l'essai. Ici, l'ajout d'une étape de digestion avec la Fpg a permis de révéler les lésions à l'ADN de nature oxydative probablement issues de la voie des quinones généralement décrite comme secondaire dans le potentiel génotoxique de cette molécule, (Tan et Melius 1986; Xue et Warshawsky 2005). De même, et cette fois dans un contexte d'évaluation de la dangerosité de matrices complexes, nous avons pu grâce à la technique proposée, révéler le risque génotoxique d'effluents urbains lié à l'utilisation de revêtements routiers à base de goudrons de houille, contaminés par des mélanges de HAPs et de composés hétérocycliques azotés sans avoir recours aux techniques lourdes et coûteuses classiquement mises en œuvre pour ces composés (mesures d'adduits stables à l'ADN) (publication V).

Afin de compléter ce travail d'amélioration de la sensibilité de l'essai, une perspective serait de combiner dans un même tampon plusieurs enzymes en vue d'élargir encore le pouvoir de détection de la gamme de dommages primaires par l'essai. Sur cette base, combiner par exemple les enzymes Endo III, AlkA, T4 endoV à la Fpg, pourrait permettre d'ajouter la reconnaissance de lésions comme par exemple des oxydations de pyrimidines, d'autres types d'alkylation que les Méthyl-fapy, certains adduits cycliques ou encore des dimères de pyrimidine cyclobutane. Toute combinaison d'enzymes serait alors à choisir en fonction de la connaissance éventuelle du contexte de contamination (pour plus de précisions voir tableau 4 de la partie bibliographie de la thèse). Un effort expérimental significatif est cependant à prévoir en préalable, notamment afin de vérifier l'absence de phénomène de compétition entre les différentes enzymes et de valider la composition d'un tampon d'activité polyvalent permettant un fonctionnement optimum et consensuel de chacune des enzymes.

En outre, l'utilisation d'inhibiteurs de réparation de l'ADN agissant plus particulièrement sur les étapes de resynthèse et de ligation, comme par exemple l'hydroxyurée, l'aphidicoline, ou la cytosine arabinoside proposée par certains auteurs, pourrait également contribuer à augmenter la sensibilité de l'essai (Speit et Hartmann 1995; Martin et al. 1999; Speit et al. 2003; Speit et al. 2004b; Güerci et al. 2009) ; ceci en gardant à l'esprit que certains des inhibiteurs comme l'aphidicoline par exemple peuvent toutefois perturber le cycle cellulaire, et ne sont envisageables que dans le cas d'expositions courtes (Speit et Schütz 2008).

Il convient cependant de garder à l'esprit que cette volonté de disposer d'un système d'alerte très sensible (évaluation de la génotoxicité sur systèmes *in vitro*) qui se justifie dans le scénario extrême du « pire-cas » admis au sens de l'évaluation du risque, pourrait toutefois

conduire à une surestimation du risque. Un tel élément étant considéré par les industriels et/ou les gestionnaires du risque comme tout aussi important à prendre en considération qu'un risque de générer des faux négatifs, car ses conséquences en terme de coût notamment peuvent être très importantes (Kirkland et al. 2007).

Dans ce contexte du développement d'un biomarqueur de génotoxicité le plus sensible possible, il faut bien entendu intégrer, outre les limites propres à l'outil utilisé (ici l'essai des comètes), celles inhérentes au modèle biologique exposé (ici des lignées cellulaires de poisson). A ce titre, les conditions d'exposition sont essentielles à prendre en compte lorsque que l'on utilise des systèmes *in vitro*. Par exemple, la présence de sérum indispensable à la croissance cellulaire, ainsi que d'autres composants du milieu, peut diminuer la biodisponibilité de certains contaminants conditionnant la réponse génotoxique mesurée en général, et en particulier la valeur du seuil d'effet (Hestermann et al. 2000; Schirmer 2006). Cependant, supprimer le sérum du milieu de culture, ou plus généralement changer la composition du milieu, peut aboutir à une modulation des capacités métaboliques des cellules, élément essentiel à l'expression de certaines formes de toxicité (Segner et al. 2000; Hestermann et al. 2002). Certaines lignées de poisson, comme RTG-2 et PLHC-1 ont pu être adaptées à des milieux sans sérum (Ackermann et Fent 1998), voire à des milieux très simplifiés comme le L-15 ex. Ce type de conditions d'exposition limite efficacement le risque d'interactions potentielles entre constituants du milieu de culture et agents (géo)toxiques (Schirmer et al. 1997). A titre d'exemple, notre travail montre que la lignée RTL-W1 peut être exposée indifféremment en milieu L-15 complet, L-15 sans sérum, ou L-15ex, sans que cela n'influe de façon significative sur la capacité d'incision lors du BERc (voir publications III et V). Ce type de résultat contribue à souligner la robustesse des lignées cellulaires de poissons comparé aux lignées de mammifères en général et humaines en particulier.

Une autre façon d'augmenter la sensibilité et la fiabilité de ces essais *in vitro* serait de raisonner en concentration biodisponible des contaminants, qui peut être considérablement plus basse que la concentration nominale. Ceci pourrait être basé sur le principe d'une évaluation du danger par rapport à la dose réelle plutôt qu'à la dose initiale telle que proposée dans le cadre des biomarqueurs de cytotoxicité (Ecu50 vs l'EC50). Cependant, une telle approche implique la réalisation d'analyses chimiques des composés évalués dans les milieux d'exposition, étape qui alourdit significativement le processus d'évaluation du risque, et reste principalement utilisable dans le cas des substances pures ou en mélange simple et dont le rapport coût/bénéfice est à évaluer au cas par cas (Gülden et Seibert 2007).

Un autre élément sur lequel l'expérimentateur devrait porter son attention dans le cadre de l'évaluation de la génotoxicité sur ces modèles biologiques est selon nous, la nature cancéreuse ou pas des lignées cellulaires. En effet, la dérégulation du cycle cellulaire, une certaine instabilité génomique, des différences possibles de capacités métaboliques et de réparation, ainsi que des modifications du niveau de méthylation des cytosines en particulier au niveau des oncogènes, représentent des inconvénients qu'il faut considérer en général, et en particulier dans la perspective d'une extrapolation des effets mesurés à des cellules non cancéreuses (Roy et al. 2004; Ertel et al. 2006; Windhofer et al. 2008; Borel 2010). Certes les lignées cellulaires pisciaires d'origine cancéreuse utilisées en écotoxicologie sont très minoritaires (voir tableau 5), mais leur vitesse de croissance élevée par rapport à la plupart des lignées non transformées représente un avantage méthodologique avéré pris en compte par les expérimentateurs comme dans le cas de la lignée PLHC-1, même si cette dernière présente d'autres qualités objectives. Pour illustration, il est possible que le niveau de dommage de base à l'ADN plus élevé observé chez PLHC-1 (conditionnant en partie la sensibilité de la réponse génotoxique avec l'essai des comètes) comparé aux lignées RTL-W1 et RTG-W1 soit lié pour partie à sa nature cancéreuse (voir publication II).

2 Caractérisation des activités de réparation de type BER, NER et PER de 2 lignées cellulaires de poisson et développement de biomarqueurs utilisant ce potentiel de réparation

L'intérêt de l'utilisation des lignées cellulaires de poisson en évaluation de la génotoxicité a été discuté, notamment parce qu'elles étaient supposées n'avoir que de faibles capacités de réparation. Ceci est perçu comme un avantage par certains auteurs (Castaño et al. 2003; Sussman 2007), arguant que de faibles capacités de réparation augmentent *de facto* la sensibilité du modèle biologique aux agents génotoxiques, ou bien comme un inconvénient par d'autres. En effet, une réparation incomplète ou trop lente de l'ADN rend des essais tel que l'UDS difficile à utiliser et peut contribuer à limiter la sensibilité d'autres essais tels que l'essai des comètes. Il est en effet classiquement admis que le niveau de fractionnement de l'ADN révélé par l'essai est en partie dû aux sites de réparation incomplète donc aux cassures générées lors des étapes d'excision des bases et des nucléotides lors des processus BER et NER (Eastman et Barry 1992; Collins et al. 1997). Cette contribution des activités de réparation au message lu par l'essai peut devenir très significative dans le cas des lésions non

alcali-labiles comme dans le cas des adduits stables, de lésions oxydatives de type 8-oxoGua ou de purines adduites à cycle ouvert de type fapy-G et fapy-A. Ainsi la caractérisation des activités de réparation de type BER et NER des lignées cellulaires utilisées en évaluation du risque génotoxique, outre l'intérêt qu'elle représente dans une perspective de développement d'un biomarqueur *per se*, contribue également directement à répondre aux questions posées dans la première partie de notre travail, visant à évaluer et à optimiser la sensibilité de l'essai des comètes lorsqu'appliqué à ces systèmes biologiques. En effet, la très faible sensibilité de l'essai dans sa version standard avec des agents génotoxiques de type B[a]P ou des radiations UVC est probablement à mettre pour partie en relation avec la lente activité NER retrouvée dans les deux lignées de truite étudiées, générant peu ou pas de sites de réparation incomplète, contrairement à ce qui a pu être montré avec d'autres types cellulaires (lymphocytes humains) présentant une activité NER rapide (Cipollini et al. 2006). Il résulte de ces constatations et du travail réalisé ici que l'évaluation du potentiel génotoxique à l'aide de lignées cellulaires de poisson par l'essai des comètes en conditions alcalines requiert selon nous, l'ajout d'une étape de digestion enzymatique ; cette condition devenant absolument indispensable lorsque des matrices environnementales telles que des sédiments, généralement à forte suspicion de contamination par des contaminants de type HAPs, sont examinées.

La connaissance des capacités de réparation des dommages à l'ADN de lignées cellulaires de poisson aide d'une part, comme discuté ci-dessus, à l'interprétation des résultats de mesure de la génotoxicité et du choix des biomarqueurs à mettre en œuvre ; elle aide également d'une manière plus générale, à mieux évaluer la représentativité de ces modèles pisciaires *in vitro* vis-à-vis de l'approche *in vivo*, en particulier dans le cadre des tests réglementaires. Les résultats issus des mesures d'activités BER, NER et PER réalisées dans ce travail sur deux lignées cellulaires de truite démontrent une bonne adéquation entre leurs capacités de réparations et celles déjà caractérisées *in vivo* ou sur cultures primaires. Dans les grandes lignes il s'agit 1) de l'existence d'une activité de type BER significative et du même ordre de grandeur dans les cellules branchiales et hépatocytaires que celle observée *in vivo* (Walter et al. 2001b), 2) une activité NER lente, ce point ayant déjà été démontré dans le cas du foie de truite, sur des cultures primaires et d'autres lignées permanentes de poisson (voir publication I), 3) l'existence d'une activité PER très efficace démontrant l'expression de la photolyase chez ces lignées au même titre que chez la truite *in vivo* (Mitchell et al. 2009). Au bilan ces résultats originaux contribuent à légitimer l'utilisation des lignées RTG-W1 et RTL-

W1 pour l'évaluation de la génotoxicité et au-delà puisqu'ils renforcent leur représentativité vis-à-vis de leur modèle biologique d'origine.

En matière de caractérisation détaillée de l'activité NER, il nous semble que ce travail mériterait d'être poursuivi. En effet, comme rapporté dans la publication I, ce système de réparation, de loin le mieux exploré chez le poisson jusqu'à présent, est décrit comme très polymorphe : des différences importantes dans son efficacité et les familles d'enzymes concernées existent entre espèces, tissus, stades de développement, régions du génome endommagées (transcrites ou non) et nature des lésions concernées.

Concernant ce dernier point, notre travail s'est limité à la mesure de la réparation d'adduits de type dimères de pyrimidine cyclobutane. Or, il serait important d'explorer les cinétiques de réparation d'adduits stables de type BPDE-ADN compte tenu de leur grande prévalence environnementale. De plus, la meilleure capacité des processus du NER chez les stades précoces de développement comparativement au stade adulte, plusieurs fois décrite chez le poisson (Applegate et Ley 1988; Mitchell et al. 2009) et à mettre en relation avec la nécessité que ces cellules ont de se diviser de manière intensive, invite à tester le potentiel NER de lignées embryo-larvaires de poisson (telles que ZF4, CHSE ou PLH) afin d'améliorer la sensibilité de la détection de lésions substrats du NER par l'essai des comètes, notamment *via* la création de cassures additionnelles issues de sites de réparation incomplète.

Identifier des lignées possédant une meilleure activité NER que celle détectée ici chez RTL-W1 et RTG-W1 pourraient aussi motiver la mise en place d'une mesure du NER comme biomarqueur, au même titre que ce qui a été réalisé pour le BER dans le cadre de notre travail. Même si peu évoquée dans ce manuscrit par souci de concision, la validation d'un protocole du NERc n'a pu être obtenue à partir des deux lignées de truites utilisées, en grande partie à cause de la présence de magnésium dans le tampon d'activité des extraits conduisant à des niveaux de dommages de base très élevés et très variables. L'hypothèse d'activités endonucléasiques endogènes a déjà été proposée par Willet et al. (2001) pour expliquer des difficultés comparables lors d'une tentative d'application d'un essai d'excision à des extraits cellulaires hépatiques *in vivo*. Langie et al. (2011) ont publié récemment les conditions d'un essai BERc appliqué au tissu hépatique de souris pour lequel des problèmes méthodologiques de même ordre ont été rencontrés et résolus (principalement par modification des conditions de lyse). Ce travail constitue donc une base encourageante pour l'application future de l'essai à des lignées cellulaires de poisson.

En ce qui concerne l'activité BER, nos essais ont par contre permis d'aboutir à la validation d'un protocole d'essai des comètes modifié de type BERc satisfaisant (publication III). Un tel essai applicable aux lignées cellulaires RTG-W1 et RTL-W1 ouvre des perspectives intéressantes en matière de développement d'un nouveau biomarqueur de génotoxicité basé sur la mesure d'activités de réparation.

Le premier cadre d'application d'un tel biomarqueur sera de pouvoir fournir des hypothèses et des explications mécanistiques au mode d'action des contaminants au laboratoire. Pour cela, il sera rapidement nécessaire d'élargir la palette de molécules à tester au-delà des composés étudiés dans cette thèse. Ceci permettra de mieux appréhender la capacité de réponse du biomarqueur et son sens de variation. En effet, à l'instar de ce qui est connu pour d'autres biomarqueurs tels que certains impliqués dans la biotransformation des xénobiotiques, la connaissance du sens de variation de la réponse du BER (i.e. induction ou inhibition) en fonction de la nature du contaminant est essentiel à son utilisation ultérieure. Il reste ainsi à analyser l'inductibilité de l'activité BER dans les lignées RTL-W1 et RTG-W1 préalablement exposées à des stress génotoxiques de nature variée, comme cela a été étudié chez le poisson *in vivo* et sur d'autres types cellulaires (voir publication I, paragraphe 3). Il sera nécessaire de tester également la réponse du biomarqueur à des familles de contaminants non décrits comme des agents génotoxiques avérés.

Le principe du BERc étant d'évaluer la modulation des capacités d'excision du dommage à l'ADN, l'interprétation du sens de variation du biomarqueur pourrait être obtenue par des mesures complémentaires de type transcriptomique ou protéomique, ces dernières ciblant en priorité les gènes codant et/ou les enzymes agissant sur la reconnaissance du dommage (ADN glycosylases) et leur excision (endonucléases). De plus, dans une démarche d'explication du mécanisme d'action, le protocole d'ajout direct du/ des contaminants à l'extrait que nous avons testé peut apporter de manière simple des informations pertinentes sur l'existence d'une interaction directe avec les activités enzymatiques concernées (comme c'est le cas pour le cadmium d'après notre travail).

Un autre cadre possible (et souhaitable) serait l'utilisation du BERc dans des contextes d'évaluation de la toxicité de matrices complexes pluricontaminées. Compte tenu du caractère inductible possible du biomarqueur en réponse à certains agents génotoxiques et de la probable inhibition par d'autres familles de molécules, l'interprétation de l'effet résultant d'une exposition à des cocktails complexes de contaminants se pose et soulève la question de la sensibilité du biomarqueur et de sa valeur prédictive en matière d'évaluation du risque dans

des scénarii complexes. Là encore, la prochaine étape devra consister à tester des mélanges complexes de nature contrastée afin d'évaluer la réponse du biomarqueur dans un premier temps. Dans ce contexte, il serait utile de chercher à caractériser sur ces échantillons complexes, les relations entre paramètres d'activité de réparation tels que le BER et d'autres paramètres de génotoxicité tels que le niveau de dommages primaires, la fréquence de micronoyaux ou le taux de mutation.

Enfin, cet essai modifié BERc pourrait également à terme, être appliqué *in vivo*, permettant de comparer le niveau d'activité de réparation de populations de poissons provenant d'hydrosystèmes soumis à des pressions anthropiques contrastées. Il serait alors intéressant d'étudier en parallèle le niveau d'activité BER et plus généralement du potentiel global de réparation de l'ADN et l'état d'endommagement du génome des populations concernées afin d'étudier le lien entre deux paramètres qui conditionnent l'expression génotoxique finale.

Une corrélation négative entre niveau de dommage à l'ADN et activité de réparation pourrait renseigner sur l'existence d'un risque accru. Une augmentation du niveau de capacité de réparation sur les sites fortement contaminés associée ou non à une augmentation du niveau de dommage à l'ADN pourrait signifier l'existence de capacités d'adaptation des populations concernées au stress génotoxique comme décrit par certains auteurs (Larno 2004). Pour adapter la mesure des différentes activités de réparation dans les cellules d'organismes exposés, il restera cependant un important travail méthodologique à réaliser. Dans un premier temps, il serait judicieux de privilégier des essais sur lymphocytes et érythrocytes, deux types cellulaires relativement simples à collecter et sur lesquels les essais BERc et NERc fonctionnent bien chez d'autres espèces animales.

3 Mesure du niveau de méthylation globale de l'ADN des lignées cellulaires de poisson et perspectives d'utilisation en écotoxicologie

En écotoxicologie aquatique, le niveau de méthylation de l'ADN génomique total a principalement été utilisé dans le cadre d'expositions *in vivo* chez le poisson et chez certains microcrustacés (voir revue de (Vandegheuchte et Janssen 2011)). En effet, jusqu'à présent, les écotoxicologues ont porté une attention particulière à l'épigénétique principalement pour l'intérêt que représente la transmission possible de modifications de l'épigénome aux générations suivantes. Or il y a aujourd'hui nécessité d'évaluer les effets des contaminants sur l'épigénome d'organismes aquatiques sans devoir explorer dans un premier temps cet aspect

trans-générationnel. Pour se faire, les modèles cellulaires de poisson représentent des candidats potentiels. En effet, nos résultats ont montré l'existence d'un niveau de méthylation de l'ADN génomique suffisant dans les deux lignées RTL-W1 et RTG-W1 pour envisager l'utilisation ultérieure de ce paramètre comme biomarqueur d'un effet hypo ou hyper méthylant des grandes familles de contaminants. Ces niveaux sont en adéquation avec des données *in vivo* décrivant les poissons comme possédant des niveaux de méthylation en moyenne supérieurs à celui des mammifères (Varriale et Bernardi 2006). Cependant, les essais de modulation du niveau de 5-meCyt par exposition des cellules aux quelques contaminants testés ont été relativement infructueux et seul un des deux agents déméthylants modèles utilisé (5-azacytidine) a conduit à une modification significative du niveau de méthylation du génome. Pour compléter ce travail il faudra faire varier la nature et les doses des composés testés ainsi que les temps d'exposition afin d'évaluer les fenêtres de réponse et la sensibilité de ces modèles cellulaires vis-à-vis du paramètre méthylation. Un tel travail devrait se focaliser selon nous en priorité sur des agents déméthylants modèles d'une part et sur les grandes familles de contaminants déjà décrites comme ayant des effets épigénétiques tels que certains métaux lourds, HAPs et perturbateurs endociniens (Sadikovic et Rodenhiser 2006 ; Salnikow et Zhitkovich 2007; Aniagu et al. 2008).

Au plan méthodologique, il est à regretter que nous n'ayons pas pu mettre au point l'application d'un essai des comètes modifié dédié à l'évaluation du niveau de méthylation du génome comme ambitionné au début de cette thèse. Compte tenu du nombre déjà élevé de paramètres que nous avons explorés afin de lever les verrous méthodologiques rencontrés, il semble peu probable que l'essai soit applicable à terme même si une ultime tentative reste envisageable consistant à utiliser la méthyl transférase McrBC, qui clive l'ADN sur les sites méthylés (5'...Pu^{me}C (N40-300)Pu^{me} C...3'). L'échec de mise au point de cet essai restreint l'avantage qu'aurait représenté la possibilité de disposer au laboratoire d'une seule et même technique, l'essai des comètes en conditions alcalines, pour évaluer les trois paramètres de génotoxicité complémentaires que sont les dommages primaires, les activités de réparation et le niveau de méthylation du génome.

Pour conclure, soulignons que malgré ce point qui pourrait être contourné par l'utilisation d'une autre approche méthodologique, telle que mesure HPLC, pour la partie méthylation du génome, les perspectives possibles pour exploiter la complémentarité entre des différents biomarqueurs de génotoxicité qui nous ont animés au cours de cette thèse demeurent. Il serait par exemple très pertinent d'explorer les liens entre niveau de dommage

oxydatif à l'ADN et niveau de méthylation du génome. En effet, chez les mammifères, les dommages oxydatifs à l'ADN et en particulier l'adduit majoritaire de type 8-oxoGua altèrent profondément la capacité d'une cytosine adjacente dans un dinucléotide CpG à être méthylé par les méthyl-transférases. Cette lésion a donc de ce fait, un potentiel pour modifier le niveau de méthylation de l'ADN (LeBaron et al. 2010). Les agents hyperméthylants seraient également à considérer avec attention puisque les cytosines méthylées ont été décrites chez *E. coli* comme une cible préférentielle des mutations de type C:G > T:A *via* un taux accru de désamination spontanée (Coulondre et al. 1978). Ainsi, de tels contaminants pourraient avoir un potentiel génotoxique voire mutagène indirect. Enfin, le lien entre niveau d'activité de réparation de l'ADN et régulation épigénétique fait l'objet de nombreuses attentions en toxicologie humaine en particulier en cancérogénèse et en biologie du vieillissement (Niehrs 2009; Collins et al. 2012). Ainsi, le mécanisme expliquant l'effet inhibiteur de certains contaminants sur les activités de réparation de l'ADN pourrait être d'ordre épigénétique et la mesure conjointe des deux biomarqueurs pourrait alors s'avérer très pertinente en évaluation du risque génotoxique.

Références Bibliographiques

- Achey, P. M., A. D. Woodhead and R. B. Setlow (1979). Photoreactivation of pyrimidine dimers in DNA from thyroid cells of the teleost, *Poecilia formosa*. . Photochemistry and Photobiology. **29** (2): 305-310.
- Ackermann, G. E. and K. Fent (1998). The adaptation of the permanent fish cell lines PLHC-1 and RTG-2 to FS-free media results in similar growth rates compared to FCS-containing conditions. Marine Environmental Research **46**: 363-367.
- Agrawal, R. C., S. Kumar and N. K. Mehrotra (1996). Micronucleus induction by diuron in mouse bone marrow. Toxicology Letters **89** (1): 1-4.
- Ahmed, F. E., R. B. Setlow, E. Grist and N. Setlow (1993). DNA damage, photorepair, and survival in fish and human cells exposed to UV radiation. Environmental and Molecular Mutagenesis **22** (1): 18-25.
- Ahmed, M. K., M. Habibullah-Al-Mamun, M. A. Hossain, M. Arif, E. Parvin, M. S. Akter, M. S. Khan and M. M. Islam (2011). Assessing the genotoxic potentials of arsenic in tilapia (*Oreochromis mossambicus*) using alkaline comet assay and micronucleus test. Chemosphere **84** (1): 143-149.
- Aizawa, K., H. Mitani, N. Kogure, A. Shimada, Y. Hirose, T. Sasado, C. Morinaga, A. Yasuoka, H. Yoda, T. Watanabe, N. Iwanami, S. Kunimatsu, M. Osakada, H. Suwa, K. Niwa, T. Deguchi, T. Hennrich, T. Todo, A. Shima, H. Kondoh and M. Furutani-Seiki (2004). Identification of radiation-sensitive mutants in the medaka, *Oryzias latipes*. Mechanisms of Development **121** (7-8): 895-902.
- Al Sabti, K. and C. D. Metcalf (1995). Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. Mutation Research **343**: 121-135.
- Albers, P. (2002). Petroleum and individual polycyclic aromatic hydrocarbons. Handbook of Ecotoxicology, Second Edition. D. J. Hoffman, B. A. Rattner, G. A. Burton Jr and J. Cairns Jr, CRC Press.
- Albertini, R. J., D. Anderson, G. R. Douglas, L. Hagmar, K. Hemminki, F. Merlo, A. T. Natarajan, H. Norppa, D. E. G. Shuker, R. Tice, M. D. Waters and A. Aitio (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. Mutation Research. Reviews in Mutation Research **463** (2): 111-172.
- Ali, D., N. S. Nagpure, S. Kumar, R. Kumar, B. Kushwaha and W. S. Lakra (2009). Assessment of genotoxic and mutagenic effects of chlorpyrifos in freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus assay and alkaline single-cell gel electrophoresis. Food and Chemical Toxicology **47** (3): 650-656.
- Allen, J. I. and M. N. Moore (2004). Environmental prognostics: Is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? Marine Environmental Research **58**: 227-232.
- Ames, B. N., J. McCann and E. Yamasaki (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mutation Research **31**: 347-364.
- Ames, B. N., M. K. Shigenaga and L. S. Gold (1993). DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. Environmental Health Perspectives **101** (Suppl 5): 35-44.
- Amiard, J. C. and C. Amiard-Trinquet (2008). Les biomarqueurs dans l'évolution de l'état écologique des milieux aquatiques. TEC&DOC Eds. Paris.
- Anderson, S. L. and G. C. Wild (1994). Linking genotoxic response and reproductive success in ecotoxicology. Environmental Health Perspectives **102** (S12): 9-12.

Aniagu, S. O., T. D. Williams, Y. Allen, I. Katsiadaki and J. K. Chipman (2008). Global genomic methylation levels in the liver and gonads of the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) after exposure to hexabromocyclododecane and 17- β oestradiol. *Environment International* **34** (3): 310-317.

Anway, M. D., A. S. Cupp, M. Uzumcu and M. K. Skinner (2005). Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science* **308**: 1466-1469.

Aoki, K., Y. Nakatsuru, J. Sakurai, A. Sato, P. Masahito and T. Ishikawa (1993). Age dependence of O₆-methylguanine-DNA methyltransferase activity and its depletion after carcinogen treatment in the teleost medaka (*Oryzias latipes*). *Mutation Research. DNA Repair* **293** (3): 225-231.

Aoufouchi, S. and S. Shall (1997). Regulation by phosphorylation of *Xenopus laevis* poly(ADP-ribose) polymerase enzyme activity during oocyte maturation. *Biochemical Journal* **325** (2): 543-551.

Applegate, L. A. and R. D. Ley (1988). Ultraviolet radiation-induced lethality and repair of pyrimidine dimers in fish embryos. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **198** (1): 85-92.

Aramphongphan, A., S. Laovithayanggoon and L. Himakoun (2009). Snakehead-fish cell line, SSN-1 (*Ophicephalus striatus*) as a model for cadmium genotoxicity testing. *Toxicology in Vitro* **23** (5): 963-968.

Arkhipchuk, V. V. and N. N. Garanko (2005). Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on *in vivo* fish fin cells. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **62** (1): 42-52.

Armstrong, T. N., R. Reimschuessel and B. P. Bradley (2002). DNA damage, histological changes and DNA repair in larval Japanese medaka (*Oryzias latipes*) exposed to ultraviolet-B radiation. *Aquatic Toxicology* **58** (1-2): 1-14.

Aso, M., M. Kondo, H. Suemune and S. M. Hecht (1999). Chemistry of the bleomycin-induced alkali-labile DNA lesion. *Journal of the American Chemical Society* **121** (39): 9023-9033.

Auerswald, L., U. Freier, A. Lopata and B. Meyer (2008). Physiological and morphological colour change in Antarctic krill, *Euphausia superba*: a field study in the Lazarev Sea. *Journal of Experimental Biology* **211** (24): 3850-3858.

Avishai, N., C. Rabinowitz, E. Moiseeva and B. Rinkevich (2002). Genotoxicity of the Kishon River, Israel: the application of an *in vitro* cellular assay. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **518** (1): 21-37.

Azqueta, A., S. Shaposhnikov and A. R. Collins (2009). DNA oxidation: investigating its key role in environmental mutagenesis with the comet assay. *Mutation Research* **674**: 101-108.

Babich, H. and E. Borenfreund (1991). Cytotoxicity and genotoxicity assays with cultured fish cells: A review. *Toxicology in Vitro* **5** (1): 91-100.

Babich, H., D. W. Rosenberg and E. Borenfreund (1991). *In vitro* cytotoxicity studies with the fish hepatoma cell line, PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **21** (3): 327-336.

Babín, M., S. Boleas and J. V. Tarazona (2005a). *In vitro* toxicity of antimicrobials on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **20** (1): 125-134.

Babín, M., S. Casado, A. Chana, B. Herradón, H. Segner, J. V. Tarazona and J. M. Navas (2005b). Cytochrome P4501A induction caused by the imidazole derivative Prochloraz in a rainbow trout cell line. *Toxicology in Vitro* **19** (7): 899-902.

Babín, M. M. and J. V. Tarazona (2005). *In vitro* toxicity of selected pesticides on RTG-2 and RTL-W1 fish cell lines. *Environmental Pollution* **135** (2): 267-274.

Bailey, G. S., D. Selivonchick and J. D. Hendricks (1987). Carcinogenesis in rainbow trout. *Environmental Health Perspectives* **71**: 147-153.

Bailey, G. S., D. E. Williams, J. S. Wilcox, P. M. Loveland, R. A. Coulombe and J. D. Hendricks (1988). Aflatoxin B1 carcinogenesis and its relation to DNA adduct formation and adduct persistence in sensitive and resistant salmonid fish. *Carcinogenesis* **9** (11): 1919-1926.

Bailey, G. S., D. E. William and J. D. Hendricks (1996). Fish models for environmental carcinogenesis: the rainbow trout. *Environmental Health Perspectives* **104** (1): 5-21.

Banu, B. S., K. Danadevi, M. F. Rahman, Y. R. Ahuja and J. Kaiser (2001). Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay. *Food and Chemical Toxicology* **39** (4): 361-366.

Barker, C. J. and B. D. Rackman (1979). The induction of sister-chromatid exchanges in cultured fish cells (*Amea splendens*) by carcinogenic mutagen. *Mutation Research* **68**: 381-387.

Barrows, L. R. and P. N. Magee (1982). Nonenzymatic methylation of DNA by S-adenosylmethionine *in vitro*. *Carcinogenesis* **3** (3): 349-351.

Bartek, J. and J. Lukas (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Current Opinion in Cell Biology* **13** (6): 738-747.

Bechtel, D. G. and L. E. J. Lee (1994). Effects of aflatoxin B1 in a liver cell line from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology in Vitro* **8** (3): 317-328.

Belpaeme, K., K. Delbeke, L. Zhu and M. Kirsch-Volders (1996). Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis* **11** (5): 485-492.

Benjamin, R. and D. Gill (1980). Poly(ADP-ribose) synthesis *in-vitro* programmed by damaged DNA. A comparison of DNA molecules containing different types of strand breaks. *Journal of Biological Chemistry* **1980** (255): 21.

Bertin, G. and D. Averbeck (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* **88** (11): 1549-1559.

Besaratinia, A., J.-i. Yoon, C. Schroeder, S. E. Bradforth, M. Cockburn and G. P. Pfeifer (2011). Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *The FASEB Journal* **25** (9): 3079-3091.

Besse, J.-P., J.-F. Latour and J. Garric (2012). Anticancer drugs in surface waters: What can we say about the occurrence and environmental significance of cytotoxic, cytostatic and endocrine therapy drugs? *Environment International* **39** (1): 73-86.

Bhatt, I. and B. N. Tripathi (2011). Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment. *Chemosphere* **82**: 308-317.

Bickham, J. W. and M. J. Smolen (1994). Somatic and heritable effects of environmental genotoxins and the emergence of evolutionary toxicology. *Environmental Health Perspectives* **102** (Suppl12): 25-28.

Blouin, M. S., V. Thuillier, B. Cooper, V. Amarasinghe, L. Cluzel, H. araki and C. Grunau (2010). No evidence for large differences in genomic methylation between wild and hatchery steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **67**: 217-224.

Boettcher, M., S. Grund, S. Keiter, T. Kosmehl, G. Reifferscheid, N. Seitz, P. S. Rocha, H. Hollert and T. Braunbeck (2010). Comparison of *in vitro* and *in situ* genotoxicity in the Danube River by means of the comet assay and the micronucleus test. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **700** (1-2): 11-17.

Bolognesi, C., R. Rabboni and P. Roggeri (1996). Genotoxicity biomarkers in *M. galloprovincialis* as indicators of marine pollutants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **113** (2): 319-323.

- Bols, N. C., A. Barlian, M. Chirino-Trejo, S. J. Caldwell, P. Goegan and L. E. J. Lee (1994). Development of a cell line from primary cultures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), gills. *Journal of Fish Diseases* **17** (6): 601-611.
- Bols, N. C., K. Schirmer, E. M. Joyce, D. G. Dixon, B. M. Greenberg and J. J. Whyte (1999). Ability of polycyclic aromatic hydrocarbons to induce 7-ethoxyresorufin-o-deethylase activity in a trout liver cell line. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44** (1): 118-128.
- Bols, N. C., V. R. Dayeh, L. E. J. Lee and K. Schirmer (2005). Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. *Piscine cell lines in environmental toxicology. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes* **6**: 43-84.
- Bommarito, T., D. W. Sparling and R. S. Halbrook (2010). Toxicity of coal-tar pavement sealants and ultraviolet radiation to *Ambystoma Maculatum*. *Ecotoxicology* **19** (6): 1147-1156.
- Bonacker, D., T. Stoiber, M. Wang, K. J. Böhm, I. Prots, E. Unger, R. Thier, H. M. Bolt and G. H. Degen (2004). Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function. *Archives of Toxicology* **78** (10): 575-583.
- Bony, S., C. Gillet, A. Bouchez, C. Margoum and A. Devaux (2008). Genotoxic pressure of vineyard pesticides in fish: Field and mesocosm surveys. *Aquatic Toxicology* **89** (3): 197-203.
- Bony, S., I. Gaillard and A. Devaux (2010). Genotoxicity assessment of two vineyard pesticides in zebrafish. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **90** (3): 421-428.
- Boonanuntasarn, S., G. Yoshizaki and T. Takeuchi (2003). Specific gene silencing using small interfering RNAs in fish embryos. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **310** (4): 1089-1095.
- Bopp, S. K., H. K. Abicht and K. Knauer (2008). Copper-induced oxidative stress in rainbow trout gill cells. *Aquatic Toxicology* **86** (2): 197-204.
- Borel, B. (2010). How accurate are cancer cell lines? *Nature* **463**: 858.
- Bouilly, K., M. Bonnard, B. Gagnaire, T. Renault and S. Lapègue (2007). Impact of diuron on aneuploidy and hemocyte parameters in Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **52** (1): 58-63.
- Bracchini, L., A. Cózar, A. M. Dattilo, M. P. Picchi, C. Arena, S. Mazzuoli and S. A. Loïselle (2005). Modelling the components of the vertical attenuation of ultraviolet radiation in a wetland lake ecosystem. *Ecological Modelling* **186** (1): 43-54.
- Braithwaite, E., X. Wu and Z. Wang (1998). Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms *in vitro*. *Carcinogenesis* **19** (7): 1239-1246.
- Braunbeck, T. and D. Neumüller (1996). The comet assay in permanent and primary fish cell cultures: A novel system to detect genotoxicity. *In Vitro Cellular and Developmental Biology: Animal*. **32**: 61.
- Braunbeck, T., M. Bottcher, H. Hollert, T. Kosmehl, E. Lammer, E. Leist, M. Rudolf and N. Seitz (2005). Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - an update. *Altex-Alternativen Zu Tierexperimenten* **22** (2): 87-102.
- Brendler-Schwaab, S., A. Hartmann, S. Pfuhler and G. Speit (2005). The *in vivo* comet assay: Use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* **20** (4): 245-254.
- Browman, H. I., R. D. Vetter, C. A. Rodriguez, J. J. Cullen, R. F. Davis, E. Lynn and J.-F. St Pierre (2003). Ultraviolet (280-400nm)-induced DNA damage in the eggs and larvae of *Calanus finmarchicus* G. (copepoda) and atlantic cod (*Gadus morhua*). *Photochemistry and Photobiology* **77** (4): 397-404.

Brüschweiler, B. J., F. E. Würzler and K. Fent (1995). Cytotoxicity *in vitro* of organotin compounds to fish hepatoma cells PLHC-1 (*Poeciliopsis lucida*). *Aquatic Toxicology* **32** (2-3): 143-160.

Bryer, P., J. N. Elliott and E. Willingham (2006). The effects of Coal Tar Based pavement sealer on amphibian development and metamorphosis. *Ecotoxicology* **15** (3): 241-247.

Buerge, I. J., H. R. Buser, T. Poiger and M. D. Müller (2006). Occurrence and fate of the cytostatic drugs cyclophosphamide and ifosfamide in wastewater and surface waters. *Environmental Science and Technology* **40** (23): 7242-7250.

Burlinson, B., R. R. Tice, G. Speit, E. Agurell, S. Brendler-Schwaab, A. R. Collins, P. Escobar, M. Honma, T. S. Kumaravel, M. Nakajima, Y. F. Sasaki, V. Thybaud, Y. Uno, M. Vasquez and A. Hartmann (2007). Fourth International Workgroup on genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutation Research* **627**: 31-35.

Burtscher, H. J., R. Schneider, H. Klocker, B. Auer, M. Hirsch-Kauffmann and M. Schweiger (1987). ADP-riboseyltransferase is highly conserved: Purification and characterization of ADP-riboseyltransferase from a fish and its comparison with the human enzyme. *Journal of Comparative Physiology. Part B: Biochemical, Systemic and Environmental Physiology* **157** (5): 567-572.

Caldwell, J. C. (2012). DEHP: Genotoxicity and potential carcinogenic mechanisms - A review. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **751** (2): 82-157.

Caminada, D., C. Escher and K. Fent (2006). Cytotoxicity of pharmaceuticals found in aquatic systems: Comparison of PLHC-1 and RTG-2 fish cell lines. *Aquatic Toxicology* **79** (2): 114-123.

Caminada, D., R. Zaja, T. Smital and K. Fent (2008). Human pharmaceuticals modulate P-gp1 (ABCB1) transport activity in the fish cell line PLHC-1. *Aquatic Toxicology* **90** (3): 214-222.

Canna-Michaelidou, S. and A.-S. Nicolaou (1996). Evaluation of the genotoxicity potential (by MutatoxTM test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus. *Science of The Total Environment* **193** (1): 27-35.

Castaño, A., M. J. Cantarino, P. Castillo and J. V. Tarazona (1996). Correlations between the RTG-2 cytotoxicity test EC₅₀ and *in vivo* LC₅₀ rainbow trout bioassay. *Chemosphere* **32** (11): 2141-2157.

Castaño, A., P. Sanchez, M. T. Llorente, M. Carballo, A. de la Torre and M. J. Muñoz (2000). The use of alternative systems for the ecotoxicological screening of complex mixtures on fish populations. *Science of The Total Environment* **247** (2-3): 337-348.

Castaño, A., N. Bols, T. Braunbeck, P. Dierickx, M. Halder and B. Isomaa (2003). The use of fish cells in ecotoxicology - The report and recommendations of ECVAM Workshop 47. *ATLA. Alternatives to Laboratory Animals*. **31**: 317-351.

Catastini, C., J. U. Mullot, S. Boukari, P. Mazellier, Y. Levi, P. Cervantes and J. N. Ormsby (2008). Assessment of antineoplastic drugs in effluents of two hospitals. *European Journal of Water Quality* **39**: 171-180.

Çavas, T. and S. Könen (2008). *In vivo* genotoxicity testing of the amnesic shellfish poison (domoic acid) in piscine erythrocytes using the micronucleus test and the comet assay. *Aquatic Toxicology* **90** (2): 154-159.

Celander, M., M. E. Hahn and J. J. Stegeman (1996). Cytochromes P450 (CYP) in the *Poeciliopsis lucida* hepatocellular carcinoma cell line (PLHC-1): Dose- and time-dependent glucocorticoid potentiation of CYP1A induction without induction of CYP3A. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **329** (1): 113-122.

Černá, M., A. Pastorková, J. Smíd, H. Bavorová, D. Očadlíková, P. Rössner and J. Zavadil (1996). Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and *in vitro* cytogenetic assay. *Toxicology Letters* **88** (1-3): 191-197.

Chao, M.-R., Y.-Z. Chang, R.-H. Wong and C.-W. Hu (2009). Time course evaluation of N-nitrosodialkylamines-induced DNA alkylation and oxidation in liver of mosquito fish. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **660** (1-2): 33-39.

Cheng, J. C., C. B. Matsen, F. A. Gonzales, W. Ye, S. Greer, V. E. Marquez, P. A. Jones and E. U. Selker (2003). Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *Journal of the National Cancer Institute* **95** (5): 399-409.

Cheng, J. C., D. J. Weisenberger, F. A. Gonzales, G. Liang, G.-L. Xu, Y.-G. Hu, V. E. Marquez and J. P.A. (2004). Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Molecular and Cellular Biology* **24** (3): 1270-1278.

Cheng, T. F., S. Choudhuri and K. Muldoon-Jacobs (2012). Epigenetic targets of some toxicologically relevant metals: A review of the literature *Journal of Applied Toxicology* **32** (9): 643-653.

Ching, E. W. K., W. H. L. Siu, P. K. S. Lam, L. Xu, Y. Zhang, B. J. Richardson and R. S. S. Wu (2001). DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to Benzo[a]pyrene: Dose- and time-dependent relationships. *Marine Pollution Bulletin* **42** (7): 603-610.

Chio, C.-P., W.-Y. Chen, W.-C. Chou, N.-H. Hsieh, M.-P. Ling and C.-M. Liao (2012). Assessing the potential risks to zebrafish posed by environmentally relevant copper and silver nanoparticles. *Science of The Total Environment* **420** (111-118).

Christman, J. K. (2002). 5-azacytidine and 5-aza-2'deoxyctidine as inhibitors of DNA methylation: Mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**: 5483-5495.

Christmann, M., M. T. Tomicic, W. P. Roos and B. Kaina (2003). Mechanisms of human DNA repair: An update. *Toxicology* **193**: 3-34.

Cipollini, M., J. He, P. Rossi, F. Baronti, A. Micheli, A. M. Rossi and R. Barale (2006). Can individual repair kinetics of UVC-induced DNA damage in human lymphocytes be assessed through the comet assay? *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **601** (1-2): 150-161.

Claxton, L. D., V. S. Houk and T. J. Hughes (1998). Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **410** (3): 237-243.

Clemons, J. H., C. R. Myers, L. E. J. Lee, D. G. Dixon and N. C. Bols (1998). Induction of cytochrome P4501A by binary mixtures of polychlorinated biphenyls (PCBs) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in liver cell lines from rat and trout. *Aquatic Toxicology* **43** (2-3): 179-194.

Cloutier, J.-F. and A. Castonguay (1998). Modulation of DNA repair by various inhibitors of DNA synthesis following 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) induced DNA damage. *Chemico-Biological Interactions* **110** (1-2): 7-25.

Coecke, S., H. Ahr, B. Blaauboer, S. Bremer, S. Casati, J. Casterll, R. Combes and R. Corvi (2006). Metabolism: A bottleneck in *in vitro* toxicological test development. The report and recommendations of ECVAM workshop 54. *ATLA. Alternatives to Laboratory Animals*. **34** (1): 49-84.

Collins, A. R., A.-G. Ma and S. J. Duthie (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutation Research* **336**: 69-77.

Collins, A. R., M. Dušinská, C. M. Gedik and R. Štětina (1996). Oxidative DNA damage to DNA: Do we have a reliable biomarker? *Environmental Health Perspectives*(104): 465-469.

Collins, A. R., V. L. Dobson, M. Dušinská, G. Kennedy and R. Štětina (1997). The comet assay: What can it really tell us? *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **375** (2): 183-193.

Collins, A. R., M. Dušinská and A. Horska (2001a). Detection of alkylation damage in human lymphocyte DNA with the comet assay. *Acta Biochimica Polonica* **48** (3): 611-614.

Collins, A. R., M. Dušinská, E. Horvathova, E. Munro, M. Savio and R. Štětina (2001b). Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured *in vitro* with the comet assay. *Mutagenesis* **16** (4): 297-301.

Collins, A. R. and E. Horváthová (2001). Oxidative DNA damage, antioxidants and DNA repair: Applications of the comet assay. *Biochemical Society Transactions* **29**: 337-341.

Collins, A. R. (2004). The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology* **26**: 249-261.

Collins, A. R. and I. Gaivão (2007). DNA base excision repair as a biomarker in molecular epidemiology studies. *Molecular Aspects of Medicine* **28**: 307-322.

Collins, A. R., A. A. Osoz, G. Brunborg, I. Gaivão, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C. C. Smith and R. Štětina (2008). The comet assay: Topical issues. *Mutagenesis* **23** (3): 143-151.

Collins, A. R. (2009). Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. *Mutation Research* **681**: 24-32.

Collins, A. R., A. Azqueta and S. S. Langie (2012). Effects of micronutrients on DNA repair. *European Journal of Nutrition* **51** (3): 261-279.

COM (2000). United Kingdom Committee on mutagenicity of chemicals in food, consumer products, and the environment. Guidance on strategy for testing of chemicals for mutagenicity. <http://www.advisorybodies.doh.gov.uk/COM/guidance.pdf>.

Cooke, M. S., M. D. Evans, M. Dizdaroglu and J. Lunec (2003). Oxidative DNA damage: Mechanisms, mutation, and disease. *Faseb Journal* **17** (10): 1195-1214.

Cosnefroy, A., F. Brion, B. Guillet, N. Laville, J. M. Porcher, P. Balaguer and S. Aït-Aïssa (2009). A stable fish reporter cell line to study estrogen receptor transactivation by environmental (xeno)estrogens. *Toxicology in Vitro* **23** (8): 1450-1454.

Cosnefroy, A., F. Brion, E. Maillot-Maréchal, J. M. Porcher, F. Pakdel, P. Balaguer and S. Aït-Aïssa (2012). Selective activation of zebrafish estrogen receptor subtypes by chemicals by using stable reporter gene assay developed in a zebrafish liver cell line. *Toxicological Sciences* **125** (2): 439-449.

Cotelle, S. and J. F. Ferard (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **34** (4): 246-255.

Coulondre, C., J. H. Miller, P. J. Farabaugh and W. Gilbert (1978). Molecular basis of base substitution hotspots in *Escherichia coli*. *Nature* **274** (5673): 775-780.

Cromie, G. A., J. C. Connelly and D. R. F. Leach (2001). Recombination at double-strand breaks and DNA ends: Conserved mechanisms from phage to humans. *Molecular Cell* **8** (6): 1163-1174.

Dahms, H.-U. and J.-S. Lee (2010). UV radiation in marine ectotherms: Molecular effects and responses. *Aquatic Toxicology* **97** (1): 3-14.

David, W. M., D. L. Mitchell and R. B. Walter (2004). DNA repair in hybrid fish of the genus *Xiphophorus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **138** (3): 301-309.

Dayeh, V. R., K. Schirmer and N. C. Bols (2002). Applying whole-water samples directly to fish cell cultures in order to evaluate the toxicity of industrial effluent. *Water Research* **36** (15): 3727-3738.

Dayeh, V. R., D. H. Lynn and N. C. Bols (2005). Cytotoxicity of metals common in mining effluent to rainbow trout cell lines and to the ciliated protozoan, *Tetrahymena thermophila*. *Toxicology in Vitro* **19** (3): 399-410.

de Kok, T. M. C. M., H. J. J. Moonen, J. van Delft and F. J. van Schooten (2002). Methodologies for bulky DNA adduct analysis and biomonitoring of environmental and occupational exposures. *Journal of Chromatography B* **778** (1-2): 345-355.

Decome, L., M. De Méo, A. Geffard, O. Doucet, G. Duménil and A. Botta (2005). Evaluation of photolyase (Photosome) repair activity in human keratinocytes after a single dose of ultraviolet B irradiation using the comet assay. *Journal of Photochemistry and Photobiology. Part B: Biology* **79**: 101-108.

Decordier, I. and M. Kirsch-Volders (2006). Editorial. The *in vitro* micronucleus test: From past to future. *Mutation Research*(607): 2-4.

Degrassi, F. and C. Tanzarella (1988). Immunofluorescent staining of kinetochores in micronuclei: A new assay for the detection of aneuploidy. *Mutation Research* **203**: 33-345.

Depledge, M. H. (1998). The ecotoxicological significance of genotoxicity in marine invertebrates. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **399** (1): 109-122.

Depledge, M. H. and T. S. Galloway (2005). Healthy animals, healthy ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment*. **3** (5): 254-258.

Devaux, A., M. Pesonen and G. Monod (1997). Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicology in Vitro* **11** (1-2): 71-79.

Devaux, A., P. Flammarion, V. Bernardon, J. Garric and G. Monod (1998). Monitoring of the chemical pollution of the river Rhône through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Marine Environmental Research* **46**: 257-262.

Devaux, A., L. Fiat, C. Gillet and S. Bony (2011). Reproduction impairment following paternal genotoxin exposure in brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquatic Toxicology* **101** (2): 405-411.

Devaux, A. and S. Bony, Eds. (2013. In press.). Genotoxicity of contaminants: Comet assay. In "Encyclopedia of Aquatic Ecotoxicology", Springer Publishers.

Dianov, G. L. and J. L. Parsons (2007). Co-ordination of DNA single strand break repair. *DNA Repair* **6** (4): 454-460.

Dixon, D. R. and J. T. Wilson (2000). Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia* **420** (1): 29-43.

Dizdaroglu, M., P. Jaruga, M. Birincioglu and H. Rodriguez (2002). Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement. *Free Radical Biology and Medicine* **32** (11): 1102-1115.

Drabløs, F., E. Feyzi, P. A. Aas, C. B. Vaagbø, B. Kavli, M. S. Bratlie, J. Peña-Díaz, M. Otterlei, G. Slupphaug and H. E. Krokan (2004). Alkylation damage in DNA and RNA - Repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair* **3** (11): 1389-1407.

Durant, J. L., W. F. Busby Jr, A. L. Lafleur, B. W. Penman and C. L. Crespi (1996). Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutation Research. Genetic Toxicology* **371** (3-4): 123-157.

Dyer, S. D., M. J. Bernhard, C. Cowan-Ellsberry, E. Perdu-Durand, S. Demmerle and J.-P. Cravedi (2008). *In vitro* biotransformation of surfactants in fish. Part I: Linear alkylbenzene sulfonate (C12-LAS) and alcohol ethoxylate (C13EO8). *Chemosphere* **72** (5): 850-862.

Dyer, S. D., M. Jo Bernhard, C. Cowan-Ellsberry, E. Perdu-Durand, S. Demmerle and J.-P. Cravedi (2009). *In vitro* biotransformation of surfactants in fish. Part II - Alcohol ethoxylate (C16EO8) and alcohol ethoxylate sulfate (C14EO2S) to estimate bioconcentration potential. *Chemosphere* **76** (7): 989-998.

Eastman, A. and M. A. Barry (1992). The origins of DNA breaks - A consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis *Cancer Investigation* **10** (3): 229-240.

Eisentraeger, A., C. Brinkmann, H. Hollert, A. Sagner, A. Tiehm and J. Neuwoehner (2008). Heterocyclic compounds: Toxic effects using algae, daphnids, and the Salmonella/microsome test taking methodical quantitative aspects into account. *Environmental Toxicology and Chemistry* **27** (7): 1590-1596.

Ema, M., J. Tanaka, N. Kobayashi, M. Naya, S. Endoh, J. Maru, M. Hosoi, M. Nagai, M. Nakajima, M. Hayashi and J. Nakanishi (2012). Genotoxicity evaluation of fullerene C60 nanoparticles in a comet assay using lung cells of intratracheally instilled rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **62** (3): 419-424.

Epe, B., M. Pflaum, M. Häring, J. Hegler and H. Rüdiger (1993). Use of repair endonucleases to characterize DNA damage induced by reactive oxygen species in cellular and cell-free systems. *Toxicology Letters* **67** (1-3): 57-72.

Ericson, G. and L. Balk (2000). DNA adduct formation in northern pike (*Esox lucius*) exposed to a mixture of benzo[a]pyrene, benzo[k]fluoranthene and 7H-dibenzo[c,g]carbazole: time-course and dose-response studies. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **454** (1-2): 11-20.

Ertel, A., A. Verghese, S. Byers, M. Ochs and A. Tozeren (2006). Pathway-specific differences between tumor cell lines and normal and tumor tissue cells. *Molecular Cancer* **5** (1): 55.

Esaka, Y., S. Inagaki and M. Goto (2003). Separation procedures capable of revealing DNA adducts. *Journal of Chromatography B* **797** (1-2): 321-329.

Espina, N. G. and P. Weis (1995). DNA Repair in fish from polluted estuaries. *Marine Environmental Research* **39** (1-4): 309-312.

Evans, M. D., M. Dizdaroglu and M. S. Cooke (2004). Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **567** (1): 1-61.

Everaarts, J. M. (1995). DNA integrity as a biomarker of marine pollution: Strand breaks in seastar (*Asterias rubens*) and dab (*Limanda limanda*). *Marine Pollution Bulletin* **31** (4-12): 431-438.

Evrard, E., J. Marchand, M. Theron, K. Pichavant-Rafini, G. Durand, L. Quiniou and J. Laroche (2010). Impacts of mixtures of herbicides on molecular and physiological responses of the European flounder *Platichthys flesus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **152** (3): 321-331.

Falcioni, M. L., M. Pellei and R. Gabbianelli (2008). Interaction of tributyltin(IV) chloride and a related complex [Bu₃Sn(LSM)] with rat leukocytes and erythrocytes: Effect on DNA and on plasma membrane. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **653** (1-2): 57-62.

Fan, L., J. Moon, J. Crodian and P. Collodi (2006). Homologous recombination in zebrafish ES cells. *Transgenic Research* **15**: 21-30.

Farmer, P. B. (2004). DNA and protein adducts as markers of genotoxicity. *Toxicology Letters* **149** (1-3): 3-9.

Farooqi, Z., F. Darroudi and A. T. Natarajan (1993). Use of fluorescence *in situ* hybridisation for the detection of aneuploids in cytokinesis-blocked mouse splenocytes. *Mutagenesis* **3**: 415-418.

Fatima, M., S. N. M. Mandiki, J. Douxfils, F. Silvestre, P. Coppe and P. Kestemont (2007). Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune-endocrine interactions in goldfish: Immune and antioxidant effects. *Aquatic Toxicology* **81** (2): 159-167.

Fatur, T., T. T. Lah and M. Filipič (2003). Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **529** (1-2): 109-116.

FDA (2006). FDA, Guidance for industry and review staff recommended approaches to integration of genetic toxicology study results. <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.

Fenech, M. and A. Morley (1985). Solution to the kinetic problem in the micronucleus assay. *Cytobios* **43** (172): 233-246.

Fent (2007). Permanent fish cell cultures as important tools in ecotoxicology. *ALTEX* **24**: 26-28.

Fent, K. (2001). Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: Assessment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and environmental samples. *Toxicology in Vitro* **15** (4-5): 477-488.

Ferraro, M. V. M., A. S. Fenocchio, M. S. Mantovani, C. D. Ribeiro and M. M. Cestari (2004). Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (PbII) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. *Genetics and Molecular Biology* **27**: 103-107.

Filipič, M. (2012). Mechanisms of cadmium induced genomics instability. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **733** (1-2): 69-77.

Fischer, S., J. Loncar, R. Zaja, S. Schnell, K. Schirmer, T. Smital and T. Luckenbach (2011). Constitutive mRNA expression and protein activity levels of nine ABC efflux transporters in seven permanent cell lines derived from different tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* **101** (2): 438-446.

Flammarion, P., A. Devaux, S. Nehls, B. Migeon, P. Nourry and J. Garric (2002). Multibiomarker responses in fish from the Moselle River (France). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **51**: 145-153.

Flohr, C., A. Bürkle, J. P. Radicella and B. Epe (2003). Poly(ADP-ribosylation) accelerates DNA repair in a pathway dependent on Cockayne syndrome B protein. *Nucleic Acids Research* **31** (18): 5332-5337.

Flowers, L., W. F. Bleczynski, M. E. Burczynski, R. G. Harvey and T. M. Penning (1996). Disposition and biological activity of benzo[a]pyrene-7,8-dione. A genotoxic metabolite generated by dihydrodiol dehydrogenase. *Biochemistry* **35** (42): 13664-13672.

Forbes, V. E., A. Palmqvist and L. Bach (2006). The use and misuse of biomarkers in ecotoxicology. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25** (1): 272-280.

Forchhammer, L., C. Johansson, S. Loft, L. Möller, R. W. L. Godschalk, S. A. S. Langie, G. D. D. Jones, R. W. L. Kwok, A. R. Collins, A. Azqueta, D. H. Phillips, O. Sozeri, M. Stepnik, J. Palus, U. Vogel, H. Wallin, M. N. Routledge, C. Handforth, A. Allione, G. Matullo, J. P. Teixeira, S. Costa, P. Riso, M. Porrini and P. Møller (2009). Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis* **25** (2): 113-123.

Ford, J. M. (2005). Regulation of DNA damage recognition and nucleotide excision repair: Another role for p53. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **577** (1-2): 195-202.

Fortier, S., X. Yang, Y. Wang, R. A. Benett and P. R. Strauss (2009). Base excision repair in early zebrafish development: Evidence for DNA polymerase switching and standby AP endonuclease activity. *Biochemistry* **48** (23): 5396-5404.

Fragou, D., A. Fragou, S. Kouidou, S. Njau and L. Kovatsi (2011). Epigenetic mechanisms in metal toxicity. *Toxicology Mechanisms and Methods* **21** (4): 343-352.

Frankenberg-Schwager, M. (1990). Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eukaryotic cells. *Radiation and Environmental Biophysics* **29** (4): 273-292.

Frassinetti, S., C. Barberio, L. Caltavuturo, F. Fava and D. Di Gioia (2011). Genotoxicity of 4-nonylphenol and nonylphenol ethoxylate mixtures by the use of *Saccharomyces cerevisiae* D7 mutation assay and use of this test to evaluate the efficiency of biodegradation treatments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **74** (3): 253-258.

Frelon, S., T. Douki, J.-L. Ravanat, J.-P. Pouget, C. Tornabene and J. Cadet (2000). High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement of radiation-induced base damage to isolated and cellular DNA. *Chemical Research in Toxicology* **13** (10): 1002-1010.

French, B. L., W. L. Reichert, T. Hom, M. Nishimoto, H. R. Sanborn and J. E. Stein (1996). Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to a gradient of contaminated sediments. *Aquatic Toxicology* **36** (1-2): 1-16.

Frenzilli, G., M. Nigro and B. P. Lyons (2009). The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **681** (1): 80-92.

Frosina, G., P. Fortini, O. Rossi, A. Carrozzino, A. Abbondandolo and E. Dogliotti (1994). Repair of abasic sites by mammalian cell extracts. *Biochemical Journal* **304**: 699-705.

Gagné, F., M. Douville, C. André, T. Debenest, A. Talbot, J. Sherry, L. M. Hewitt, R. A. Frank, M. E. McMaster, J. Parrott and G. Bickerton (2012). Differential changes in gene expression in rainbow trout hepatocytes exposed to extracts of oil sands process-affected water and the Athabasca River. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **155** (4): 551-559.

Garcia, O., T. Mandina, A. I. Lamadrid, A. Diaz, A. Remigio, Y. Gonzalez, J. Piloto, J. E. Gonzalez and A. Alvarez (2004). Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an inter-laboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **556** (1-2): 25-34.

Gates, K. S., T. Nooner and S. Dutta (2004). Biologically relevant chemical reactions of N7-alkylguanine residues in DNA. *Chemical Research in Toxicology* **17** (7): 839-856.

Gedik, C. M., S. W. Ewen and A. R. Collins (1992). Singel-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *International Journal of Radiation Biology* **62** (3): 313-320.

Geffroy, B., C. Ladhar, S. Cambier, M. Trequer-Delapierre, D. Brèthes and J. P. Bourdineaud (2012). Impact of dietary gold nanoparticles in zebrafish at very low contamination pressure: The role of size, concentration and exposure time. *Nanotechnology* **6** (2): 144-160.

Gentile, M., L. Latonen and M. Laiho (2003). Cell cycle arrest and apoptosis provoked by UV radiation-induced DNA damage are transcriptionally highly divergent responses. *Nucleic Acids Research* **31** (16): 4779-4790.

Giacomazzi, S. and N. Cochet (2004). Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* **56** (11): 1021-1032.

Giaginis, C., E. Gatzidou and S. Theocharis (2006). DNA repair systems as targets of cadmium toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* **213** (3): 282-290.

Glei, M., G. Hovhannisyan and B. L. Pool-Zobel (2009). Use of comet-FISH in the study of DNA damage and repair: Review. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **681**: 33-43.

Godard, C. A. J., S. S. Wise, R. S. Kelly, B. Goodale, S. Kraus, T. Romano, T. O'Hara and J. P. Wise Sr (2006). Benzo[a]pyrene cytotoxicity in right whale (*Eubalaena glacialis*) skin, testis and lung cell lines. *Marine Environmental Research* **62**, **Supplement 1** (0): S20-S24.

Gonzalez, P., Y. Dominique, J. C. Massabuau, A. Boudou and J. P. Bourdineau (2005). Comparative effects of dietary methylmercury on gene expression in liver, skeletal muscle, and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Science and Technology* **39** (11): 3972-3980.

Gonzalez, P., M. Baudrimont, A. Boudou and J. P. Bourdineaud (2006). Comparative effects of direct cadmium contamination on gene expression in gills, liver, skeletal muscles and brain of the zebrafish (*Danio rerio*). *BioMetals* **19** (3): 225-235.

Gottschalk, F., T. Sonderer, R. W. Scholz and B. Nowack (2009). Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental Science & Technology* **43** (24): 9216-9222.

Goudable, J. and A. Favier (1997). Radicaux libres oxygénés et antioxydants. *Nutrition Clinique et Métabolisme* **11** (2): 115-120.

Grafstrom, R. C., A. E. Pegg, B. F. Trump and C. C. Harris (1984). O⁶-Alkylguanine-DNA alkyltransferase activity in normal human tissues and cells. *Cancer Research* **44**: 2855-2857.

Gravato, C. and M. A. Santos (2003a). Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax L.* *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55**: 352-358.

Gravato, C. and M. A. Santos (2003b). *Dicentrarchus labrax* biotransformation and genotoxicity responses after exposure to a secondary treated industrial/urban effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **55** (3): 300-306.

Groff, A. A., J. da Silva, E. A. Nunes, M. Ianistcki, T. N. Guecheva, A. M. de Oliveira, C. P. F. de Oliveira, A. L. Val and J. A. P. Henriques (2010). UVA/UVB-induced genotoxicity and lesion repair in *Colossoma macropomum* and *Arapaima gigas* Amazonian fish. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B: Biology* **99** (2): 93-99.

Grombacher, T. and B. Kaina (1995). Constitutive expression and inducibility of O⁶-Methylguanine-DNA methyltransferase and N-Methylpurin-DNA glycosylase in rat-liver cells exhibiting different status of differentiation. *Biochimica Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease* **1270** (1): 63-72.

Gu, A., X. Shi, C. Yuan, G. Ji, Y. Zhou, Y. Long, L. Song, S. Wang and X. Wang (2010). Exposure to fenvalerate causes brain impairment during zebrafish development. *Toxicology Letters* **197** (3): 188-192.

Guengerich, F. P. (2000). Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **21** (3): 345-351.

Güerci, A., D. Liviac and R. Marcos (2009). Detection of excision repaired DNA damage in the comet assay by using Ara-C and hydroxyurea in three different cell types. *Cell Biology and Toxicology* **25** (1): 73-80.

Gülden, M. and H. Seibert (2007). The improvement of *in vitro* cytotoxicity testing for the assessment of acute toxicity in fish. *ATLA. Alternatives to Laboratory Animals* **35**: 39-46.

Gupta, R. C., M. V. Reddy and K. Randerath (1982). ³²P-postlabeling analysis of non-radioactive aromatic carcinogen-DNA adducts. *Carcinogenesis* **3**: 1081-1092.

Haber, J. E. (2000). Partners and pathways: repairing a double-strand break. *Trends in Genetics* **16** (6): 259-264.

Häder, D.-P., H. D. Kumar, R. C. Smith and R. C. Worrest (2007). Effects of solar UV radiation on aquatic ecosystems and interactions with climate change *Photochemical and Photobiological Sciences* **6**: 267-285.

Hagmann, M., R. Bruggmann, L. Xue, O. Georgiev, W. Schaffner and D. Rungger (1998). Homologous recombination and DNA-end joining reactions in zygotes and early embryos of zebrafish (*Danio rerio*) and *Drosophila melanogaster*. *Biological Chemistry* **379** (6): 673-681.

Hahn, M. E., T. M. Lamb, M. E. Schultz, R. M. Smolowitz and J. J. Stegeman (1993). Cytochrome P4501A induction and inhibition by 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl in an Ah receptor-containing fish hepatoma cell line (PLHC-1). *Aquatic Toxicology* **26** (3-4): 185-208.

Hall, J. and R. Montesano (1990). DNA alkylation damage: Consequences and relevance to tumour production. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **233** (1-2): 247-252.

Halling-Sørensen, B., S. Nors Nielsen, P. F. Lanzky, F. Ingerslev, H. C. Holten Lützhøft and S. E. Jørgensen (1998). Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment - A review. *Chemosphere* **36** (2): 357-393.

Halliwell, B. and O. I. Aruoma (1991). DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters* **281** (1-2): 9-19.

Hamer, B., N. Bihari, G. Reifferscheid, R. K. Zahn, W. E. G. Müller and R. Batel (2000). Evaluation of the SOS/umu-test post-treatment assay for the detection of genotoxic activities of pure compounds and complex environmental mixtures. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **466** (2): 161-171.

Hartmann, A., E. Agurell, C. Beevers, S. Brendler-Schwaab, B. Burlinson, P. Clay, A. Collins, A. Smith, G. Speit, V. Thybaud and R. R. Tice (2003). Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. *Mutagenesis* **18** (1): 45-51.

Hartwig, A. (1998). Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicology Letters* **102-103** (0): 235-239.

Hašplová, K., A. Hudecová, Z. Magdalénová, M. Bjøras, E. Gálová, E. Miadoková and M. Dušinská (2012). DNA alkylation lesions and their repair in human cells: modification of the comet assay with 3-methyladenine DNA glycosylase (AlkD). *Toxicology Letters* **208**: 76-81.

Havliš, J. and M. Trbušek (2002). 5-Methylcytosine as a marker for the monitoring of DNA methylation. *Journal of Chromatography B* **781** (1-2): 373-392.

Heater, S. J., L. P. Oehlers Jr, J. D. Rains and R. B. Walter (2004). DNA polymerase β mRNA and protein expression in *Xiphophorus fish*. *Comparative Biochemistry Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **138** (3): 325-334.

Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: A review of recent research data. *Toxicology Letters* **131** (1-2): 5-17.

Hebert, P. D. and M. M. Luiker (1996). Genetic effects of contaminant exposure - Towards an assessment of impacts on animal populations. *The Science of The Total Environment* **191**: 23-58.

Heddle, J. A. (1973). A rapid *in vivo* test for chromosome damage. *Mutation Research* **18**: 187-192.

Hendricks, A. J., J. L. Maas-Diepeveen, A. Noordsij and M. A. van der Gaag (1994). Monitoring response of XAD-concentrated water in the Rhine delta: A major part of the toxic compounds remains unidentified. *Water Research* **28**: 581-98.

Hestermann, E. V., J. J. Stegeman and M. E. Hahn (2000). Cell culture serum alters the uptake and relative potencies of halogenated aromatic hydrocarbons in PLHC-1 cells. *Marine Environmental Research* **50** (1-5): 545-546.

Hestermann, E. V., J. J. Stegeman and M. E. Hahn (2002). Serum withdrawal leads to reduced aryl hydrocarbon receptor expression and loss of cytochrome P4501A inducibility in PLHC-1 cells. *Biochemical Pharmacology* **63** (8): 1405-1414.

Hidaka, M., S. Oda, Y. Kuwahara, M. Fukumoto and H. Mitani (2010). Cell lines derived from a medaka radiation-sensitive mutant have defects in DNA double strand break responses. *Journal of Radiation Research* **51**: 165-171.

Hightower, L. E. and J. L. Renfro (1988). Recent applications of fish cell culture to biomedical research, Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company. **248**: 290-302.

Higurashi, M., T. Ohtsuki, A. Inase, R. Kusumoto, C. Masutani, F. Hanaoka and S. Iwai (2003). Identification and characterization of an intermediate in the alkali degradation of (6-4) photoproduct-containing DNA. *Journal of Biological Chemistry* **278** (51): 51968-51973.

Hildrestrand, G. A., S. Duggal, M. Bjøras, L. Luna and J. E. Brinchmann (2009). Modulation of DNA glycosylase activities in mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research* **315**: 2558-2567.

Hinger, G., M. Brinkmann, K. Bluhm, A. Sagner, H. Takner, A. Eisenträger, T. Braunbeck, M. Engwall, A. Tihm and H. Hollert (2011). Some heterocyclic aromatic compounds are Ah receptor agonists in the DR-CALUX assay and the EROD assay with RTL-W1 cells. *Environmental Science and Pollution Research* **18** (8): 1297-1304.

- Hirayama, J., N. Miyamura, Y. Uchida, Y. Asaoka, R. Honda, K. Sawanobori, T. Todo, T. Yamamoto, P. Sassone-Corsi and H. Nishina (2009). Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish. *Cell Cycle* **8** (17): 2794-2801.
- Hoeymakers, J. H. J. (2001). DNA repair mechanisms. *Maturitas* **38**: 17-23.
- Holth, T. F., B. A. Beylich, H. Sharphédinsdottir, B. Liewenborg, M. Grung and K. Hylland (2009). Genotoxicity of environmentally relevant concentrations of water-soluble oil components in cod (*Gadus morhua*). *Environmental Science and Technology* **43** (9): 3329-3334.
- Horton, J. K. and S. H. Wilson (2007). Hypersensitivity phenotypes associated with genetic and synthetic inhibitor-induced base excision repair deficiency. *DNA Repair* **6** (4): 530-543.
- Horváthová, E., D. Slameňová, L. Hlinčíková, T. K. Mandal, A. Gábelová and A. R. Collins (1998). The nature and origin of DNA-single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutation Research* **409**: 163-171.
- Hose, J. E. (1994). Large-scale genotoxicity assessments in the marine environment. *Environmental Health Perspectives* **102**: 29-32.
- Houk, V. S. (1992). The genotoxicity of industrial wastes and effluents: A review. *Mutation Research. Reviews in Genetic Toxicology* **277** (2): 91-138.
- Huff, D. D., G. Grad and C. E. Williamson (2004). Environmental constraints on spawning depth of yellow perch: The roles of low temperature and high solar ultraviolet radiation. *Transactions of the American Fisheries Society* **133**: 718-726.
- Huuskonen, S., K. Koponen, O. Ritola, M. Hahn and P. Lindström-Seppä (1998a). Induction of CYP1A and porphyrin accumulation in fish hepatoma cells (PLHC-1) exposed to sediment or water from a PCB-contaminated lake (Lake Kernaala, Finland). *Marine Environmental Research* **46** (1-5): 379-384.
- Huuskonen, S. E., M. E. Hahn and P. Lindström-Seppä (1998b). A fish hepatoma cell line (PLHC-1) as a tool to study cytotoxicity and CYP1A induction properties of cellulose and wood chip extracts. *Chemosphere* **36** (14): 2921-2932.
- Huuskonen, S. E., T. E. Ristola, A. Tuvikene, M. E. Hahn, J. V. K. Kukkonen and P. Lindström-Seppä (1998c). Comparison of two bioassays, a fish liver cell line (PLHC-1) and a midge (*Chironomus riparius*), in monitoring freshwater sediments. *Aquatic Toxicology* **44** (1-2): 47-67.
- Ishikawa, T., P. Masahito and S. Takayama (1984). Usefulness of the medaka, *Oryzias latipes*, as a test animal: DNA repair processes in medaka exposed to carcinogens. *National Cancer Institute Monograph* **1984** (65): 35-43.
- Jahngen-Hodge, J., M. S. Obin, X. Gong, F. Shang, T. R. Nowell, J. Gong, H. Abasi, J. Blumberg and A. Taylor (1997). Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry* **272** (45): 28218-28226.
- Jemec, A., D. Drobne, T. Tišler and K. Sepčić (2010). Biochemical biomarkers in environmental studies - Lessons learnt from enzymes catalase, glutathione S-transferase and cholinesterase in two crustacean species. *Environmental Science and Pollution Research* **17** (3): 571-581.
- Jha, A. N., J. A. Hagger and S. J. Hill (2000). Tributyltin induces cytogenetic damage in the early life stages of the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **35** (4): 343-350.
- Jha, A. N. (2004). Genotoxicological studies in aquatic organisms: An overview. *Mutation Research* **552**: 1-17.
- Jha, A. N. (2008). Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis* **23** (3): 207-221.

Jin, H. H., J. H. Lee and C. E. Hyun (2004). Detection of DNA damage in carp using single-cell gel electrophoresis assay for genotoxicity monitoring. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **14** (2): 268-275.

Jolibois, B. and M. Guerbet (2006). Hospital Wastewater Genotoxicity. *Annals of Occupational Hygiene* **50** (2): 189-196.

Jones, O. A. H., N. Voulvoulis and J. N. Lester (2002). Aquatic environmental assessment of the top 25 English prescription pharmaceuticals. *Water Research* **36** (20): 5013-5022.

Jones, P. A. and D. Takay (2001). The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**: 1068-1070.

Jos, A., G. Repetto, J. C. Ríos, A. Del Peso, M. Salguero, M. J. Hazen, M. L. Molero, P. Fernández-Freire, J. M. Pérez-Martín, V. Labrador and A. Cameán (2004). Ecotoxicological evaluation of the additive butylated hydroxyanisole using a battery with six model systems and eighteen endpoints. *Aquatic Toxicology* **71** (2005): 183-192.

Jung, D., Y. Cho, L. B. Collins, J. A. Swenberg and R. T. di Giulio (2009a). Effects of benzo[a]pyrene on mitochondrial and nuclear DNA damage in Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) from a creosote-contaminated and reference site. *Aquatic Toxicology* **95** (1): 44-51.

Jung, D., Y. Cho, J. N. Meyer and R. T. Di Giulio (2009b). The long amplicon quantitative PCR for DNA damage assay as a sensitive method of assessing DNA damage in the environmental model, Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **149** (2): 182-186.

Kamer, I. and B. Rinkevich (2002). *In vitro* application of the comet assay for aquatic genotoxicity: Considering a primary culture *versus* a cell line. *Toxicology in Vitro* **16** (2): 177-184.

Kammann, U., J. C. Riggers, N. Theobald and H. Steinhart (2000). Genotoxic potential of marine sediments from the North Sea. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **467** (2): 161-168.

Kaneko, T., S. Tahara, T. Taguchi and H. Kondo (2001). Accumulation of oxidative DNA damage, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, and change of repair systems during *in vitro* cellular aging of cultured human skin fibroblasts. *Mutation Research* **487**: 19-30.

Karentz, D., J. E. Cleaver and D. L. Mitchell (1991). Cell survival characteristics and molecular responses of antarctic phytoplankton to ultraviolet-B radiation *Journal of Phycology* **27** (3): 326-341.

Kator, K. (1984). Dynamic analysis of repair mechanisms of UV-induced damages in cultured fish cells. *Photomedicine Photobiology* **6** (2): 30-32.

Kawanaka, Y., E. Matsumoto, N. Wang, S.-J. Yun and K. Sakamoto (2008). Contribution of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons to the mutagenicity of ultrafine particles in the roadside atmosphere. *Atmospheric Environment* **42** (32): 7423-7428.

Keiter, S., A. Rastall, T. Kosmehl, K. Wurm, L. Erdinger, T. Braunbeck and H. Henner (2006). Ecotoxicological assessment of sediment, suspended matter and water samples in the upper Danube river. A pilot study in search for the causes for the decline of fish catches. *Environmental Science and Pollution Research International* **13** (5): 308-319.

Kelly, C. M. and J. J. Latimer (2005). Unscheduled DNA Synthesis - A functional assay for global genomic nucleotide excision repair. *Molecular Toxicology Protocols. Methods in molecular biology*. S. G. G. P. Keohavong. Totowa, Humana Press Inc. **291**: 303-320.

Khan, S. G., K.-S. Oh, T. Shahlavi, T. Ueda, D. B. Busch, H. Inui, S. Emmert, K. Imoto, V. Muniz-Medina, C. C. Baker, J. J. DiGiovanna, D. Schmidt, A. Khadavi, A. Metin, E. Gozukara, H. Slor, A. Sarasin and K. H. Kraemer (2006). Reduced XPC DNA repair gene mRNA levels in clinically normal parents of *xeroderma pigmentosum* patients. *Carcinogenesis* **27** (1): 84-94.

Kienzler, A., X. Tronchère, A. Devaux and S. Bony (2012). Assessment of RTG-W1, RTL-W1, and PLHC-1 fish cell lines for genotoxicity testing of environmental pollutants by means of a Fpg-modified comet assay. *Toxicology in Vitro* **26** (3): 500-510.

Kienzler, A., S. Bony, X. Tronchère and A. Devaux (2013). In press. Assessment of base excision repair activity in fish cell lines: Towards a new biomarker of contaminant exposure? *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.

Kilemade, M. and B. Quinn (2003). *In vitro/in vivo* bridging approaches - Validating the relevance of *in vitro* techniques with references to the whole organism in the natural environment. *In vitro methods in aquatic toxicology*. C. Motersill and B. Austin. UK, Springer Praxis: 377-393.

Kim, I.-Y. and C.-K. Hyun (2006). Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64** (3): 288-297.

Kino, K. and H. Sugiyama (2000). GC > CG transversion mutation might be caused by 8-oxoguanine oxidation product. *Nucleic Acids Symposium Series* **44** (1): 139-140.

Kirkland, D., S. Pfuhler, D. Tweats, M. Aardema, R. Corvi, F. Darroudi, A. Elhajouji, H. Glatt, P. Hastwell, M. Hayashi, P. Kasper, S. Kirchner, A. Lynch, D. Marzin, D. Maurici, J.-R. Meunier, L. Müller, G. Nohynek, J. Parry, E. Parry, V. Thybaud, R. Tice, J. van Benthem, P. Vanparys and P. White (2007). How to reduce false positive results when undertaking *in vitro* genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **628** (1): 31-55.

Klien, K. and J. Godnić-Cvar (2012). Genotoxicity of metal nanoparticles: Focus on *in-vivo* studies. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **63** (2): 133-145.

Knauer, K., C. Lampert and J. Gonzalez-Valero (2007). Comparison of *in vitro* and *in vivo* acute fish toxicity in relation to toxicant mode of action. *Chemosphere* **68** (8): 1435-1441.

Köberle, B. and G. Speit (1991). Molecular characterization of mutations at the hprt locus in V79 Chinese hamster cells induced by bleomycin in the presence of inhibitors of DNA repair. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **249** (1): 161-167.

Köberle, B., V. Roginskaya and R. D. Wood (2006). XPA protein as a limiting factor for nucleotide excision repair and UV sensitivity in human cells. *DNA Repair* **5** (5): 641-648.

Kocan, R. M., M. L. Landolt and K. M. Sabo (1979). *In vitro* toxicity of eight mutagens/carcinogens for three fish cell lines. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **23** (1): 269-274.

Kocan, R. M., K. M. Sabo and M. L. Landolt (1985). Cytotoxicity/genotoxicity: The application of cell culture techniques to the measurement of marine sediment pollution. *Aquatic Toxicology* **6** (3): 165-177.

Kocan, R. M., M. B. Matta and S. M. Salazar (1996). Toxicity of weathered coal tar for shortnose sturgeon (*Acipenser brevirostrum*) embryos and larvae. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **31** (2): 161-165.

Komura, J.-I., H. Mitani and A. Shima (1989). More efficient excision repair of pyrimidine dimers in the specific DNA sequence than in the genome overall in goldfish cells. *Photochemistry and Photobiology* **49** (4): 419-422.

Komura, J.-I., H. Mitani, N. Nemoto, T. Ishikawa and A. Shima (1991). Preferential excision repair and non-preferential photoreactivation of pyrimidine dimers in the *c-ras* sequence of cultured goldfish cells. *Mutation Research. DNA Repair* **254** (3): 191-198.

Kopeika, J., E. Kopeika, T. Zhang, D. M. Rawson and W. V. Holt (2004). Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology* **61** (9): 1661-1673.

Kosmehl, T., A. V. Hallare, T. Braunbeck and H. Hollert (2008). DNA damage induced by genotoxicants in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after contact exposure to freeze-dried sediment and sediment extracts from Laguna Lake (The Philippines) as measured by the comet assay. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **650** (1): 1-14.

Kouwenberg, J. H. M., H. I. Browman, J. J. Cullen, R. F. Davis, J. F. St-Pierre and J. A. Runge (1999). Biological weighting of ultraviolet (280-400 nm) induced mortality in marine zooplankton and fish. I. Atlantic cod (*Gadus morhua*) eggs. *Marine Biology* **134** (2): 269-284.

Kramer, N. I., J. L. M. Hermens and K. Schirmer (2009). The influence of modes of action and physicochemical properties of chemicals on the correlation between *in vitro* and acute fish toxicity data. *Toxicology in Vitro* **23** (7): 1372-1379.

Kuehl, D. W., J. Serrano and S. Naumann (1994). Identification of potentially mutagenic contaminants in the aquatic environment by liquid chromatographic-thermospray mass spectrometric characterization of *in vitro* DNA adducts. *Journal of Chromatography A* **684** (1): 113-119.

Kumaravel, T. S., B. Vilhar, S. P. Faux and A. N. Jha (2009). Comet Assay measurements: A perspective. *Cell Biology and Toxicology* **25**: 53-64.

Lacaze, E., A. Devaux, R. Mons, S. Bony, J. Garric, A. Geffard and O. Geffard (2011a). DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution* **159** (6): 1682-1691.

Lacaze, E., O. Geffard, D. Goyet, S. Bony and A. Devaux (2011b). Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. *Environmental Research* **111** (5): 626-634.

Lacoste, S., A. Castonguay and R. Drouin (2006). Formamidopyrimidine adducts are detected using the comet assay in human cells treated with reactive metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **600** (1-2): 138-149.

Lagerqvist, A., D. Håkansson, G. Prochazka, C. Lundin, K. Dreij, B. Jernström, M. Trönqvist, A. Seidel, K. Erixon and D. Jenssen (2008). Both replication bypass fidelity and repair efficiency influence the yield of mutations per target dose in intact mammalian cells induced by benzo[a]pyrene-diol-epoxide and dibenzo[a,l]pyrene-diol-epoxide. *DNA Repair* **7** (8): 1202-1212.

Lakra, W. S., T. R. Swaminathan and K. P. Joy (2011). Development, characterization, conservation and storage of fish cell lines: A review. *Fish Physiology and Biochemistry* **37**: 1-20.

Lamare, M. D. and J. Hoffman (2004). Natural variation of carotenoids in the eggs and gonads of the echinoid genus, *Strongylocentrotus*: Implications for their role in ultraviolet radiation photoprotection. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **312** (2): 215-233.

Lammer, E., G. J. Carr, K. Wendler, J. M. Rawlings, S. E. Belanger and T. Braunbeck (2009). Is the fish embryo toxicity test (FET) with the zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the fish acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology and Toxicology*

Lange, M., W. Gebauer, J. Markl and R. Nagel (1995). Comparison of testing acute toxicity on embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, and RTG-2 cytotoxicity as possible alternative to the acute fish test. *Chemosphere* **30**: 2087-2102.

Langie, S. A. S., A. M. Knaapen, K. J. J. Brauers, D. van Berlo, F. J. van Schooten and W. L. Godschalk (2006). Development and validation of a modified comet assay to phenotypically assess nucleotide excision repair. *Mutagenesis* **21** (2): 153-158.

Langie, S. A. S., K. M. Cameron, K. J. Waldron, K. P. R. Fletcher, T. von Zglinicki and J. C. Mathers (2011). Measuring DNA repair incision activity of mouse tissue extracts towards singlet oxygen-induced DNA damage: A comet-based *in vitro* repair assay. *Mutagenesis* **26** (3): 461-471.

Lankoff, A., A. Banasik, A. Diuma, E. Ochniak, H. Lisowska, T. Kuszewski, S. Gozdz and A. Wojcik (2006). A comet assay study reveals that aluminium induces DNA damage and inhibits the repair of radiation-induced lesions in human peripheral blood lymphocytes. *Toxicology Letters*(161): 27-36.

Latonen, L., Y. Taya and M. Laiho (2001). UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulate p53-HDM2 interaction in human fibroblast. *Oncogene* **20** (46): 6784-6793.

Latonen, L. and M. Laiho (2005). Cellular UV damage responses. Functions of tumor suppressor p53. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* **1755** (2): 71-89.

Latt, S. A. and J. W. Allen (1977). *In-vitro* and *in-vivo* analysis of sister-chromatid exchange formation. Handbook of mutagenicity test procedures. B. J. Kilbey, M. Legator, W. Nichols and C. Ramel. Amsterdam, Elsevier: 275-291.

Laval, F. (1990). Induction of proteins involved in the repair of alkylated bases in mammalian cells by DNA-damaging agents. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **233** (1-2): 211-218.

Laval, F. (1991). Increase of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase and N³-methyladenine glycosylase RNA transcripts in rat hepatoma cells treated with DNA-damaging agents. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **176** (3): 1086-1092.

Laville, N., S. Ait-Aïssa, E. Gomez, C. Casellas and J. M. Porcher (2004). Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology* **196** (1-2): 41-55.

LeBaron, M. J., R. J. Rasoulpour, J. Klapacz, R. G. Ellis-Hutchings, H. M. Hollnagel and B. B. Gollapudi (2010). Epigenetics and chemical safety assessment. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **705** (2): 83-95.

Lee, K. W. and H. J. Lee (2006). Biphasic effects of dietary antioxidants on oxidative stress-mediated carcinogenesis. *Mechanisms of Ageing and Development* **127** (5): 424-431.

Lee, L., V. Dayeh, K. Schirmer and N. Bols (2009). Applications and potential uses of fish gill cell lines: Examples with RTgill-W1. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal* **45** (3): 127-134.

Lee, L. E. J., J. H. Clemons, D. G. Bechtel, S. J. Caldwell, K.-B. Han, M. Pasitschniak-Arts, D. D. Mosser and N. C. Bols (1993). Development and characterization of a rainbow trout liver cell line expressing cytochrome P450-dependent monooxygenase activity. *Cell Biology and Toxicology* **9** (3): 279-294.

Lee, L. E. J., V. R. Dayeh, K. Schirmer and N. C. Bols (2008). Fish cell lines as rapid and inexpensive screening and supplemental tools for whole effluent testing. *Integrated Environmental Assessment and Management* **4** (3): 372-4.

Lee, R. F. and S. Steinert (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **544** (1): 43-64.

Leguen, I., C. Carlsson, E. Perdu-Durand, P. Prunet, P. Pärt and J. P. Cravedi (2000). Xenobiotic and steroid biotransformation activities in rainbow trout gill epithelial cells in culture. *Aquatic Toxicology* **48** (2-3): 165-176.

Lewis, C. and T. Galloway (2009). Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. *Environmental Science and Technology* **43** (3): 928-933.

Ley, R. D. (1993). Photoreactivation in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90** (10): 4337.

Li, Q., J. Laval and D. B. Ludlum (1997). Fpg protein releases a ring-opened N-7 guanine adduct from DNA that has been modified by sulfur mustard. *Carcinogenesis* **18** (5): 1035-1038.

Li, W.-M., D.-Q. Yin, Y. Zhou, S.-Q. Hu and L.-S. Wang (2003). 3,4-Dichloroaniline-induced oxidative stress in liver of crucian carp (*Carassius auratus*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56** (2): 251-255.

Li, Y., D. H. Chen, J. Yan, Y. Chen, R. A. Mittelstaedt, Y. Zhang, A. S. Biris, R. H. Heflich and T. Chen (2012). Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **745** (1-2): 4-10.

Lindström-Seppä, P., S. Huuskonen, S. Kotelevtsev, P. Mikkelsen, T. Räänen, L. Stepanova and O. Hänninen (1997). Toxicity and mutagenicity of waste waters from Baikalsk Pulp and Paper Mill: Evaluation of pollutant contamination in Lake Baikal. *Marine Environmental Research* **46** (1-5): 273-277.

Liu, H.-G., Y. Wang, L. Lian and L.-H. Xu (2006). Tributyltin induces DNA damage as well as oxidative damage in rats. *Environmental Toxicology* **21** (2): 166-171.

Liu, M., C. Tee, F. Zeng, J. P. Sherry, B. Dixon, N. C. Bols and B. P. Duncker (2011). Characterization of p53 expression in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **154** (4): 326-332.

Loeb, L. A. and B. D. Preston (1986). Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites. *Annual Review of Genetics* **20** (1): 201-230.

Loenarz, C. and C. J. Schofield (2009). Oxygenase catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation. *Chemistry & biology* **16** (6): 580-583.

Lorenzen, A. and S. W. Kennedy (1993). A fluorescence-based protein assay for use with a microplate reader. *Analytical biochemistry* **214** (1): 346-348.

Lorenzo, Y., A. Azqueta, L. Luna, F. Bonilla, G. Dominguez and A. R. Collins (2009). The carotenoid β -cryptoxanthin stimulates the repair of DNA oxidation damage in addition to acting as an antioxidant in human cells. *Carcinogenesis* **30** (2): 308-314.

Lutsenko, E. and A. S. Bhagwat (1999). Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells: A model, its experimental support and implications. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **437** (1): 11-20.

Lutz, W. K. (1979). *In vivo* covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. *Mutation Research. Reviews in Genetic Toxicology* **65** (4): 289-356.

Mahler, B. J., P. C. Van Metre, T. J. Bashara, J. T. Wilson and D. A. Johns (2005). Parking lot sealcoat: an unrecognized source of urban polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environmental Science and Technology* **39**: 5560-5566.

Mahler, B. J., V. M. P.C., J. T. Wilson, M. Musgrove, T. L. Burbank, T. E. Ennis and T. J. Bashara (2010). Coal-tar-based lot sealcoat: An unrecognized source of PAHs to settled house dust. *Environmental Science and Technology* **44**: 894-900.

Mahler, B. J., Van Metre P.C, J. L. Crane, A. W. Watts, M. Scoggins and E. S. Williams (2012a). Coal-tar-based pavement sealcoat and PAHs: Implications for the environment, human health, and stormwater management. *Environmental Science and Technology* **46** (6): 3039-3045.

Mahler, B. J., P. C. Van Metre and J. L. Kunz (2012b). Acute toxicity of runoff from coal-tar- and asphalt-based pavement sealants to two aquatic organisms SETAC North America 33rd annual Meeting. Longbeach, California, Society of Environmental Toxicology and Chemistry. n° **697**: 167-168.

Maier, A., B. L. Schuman, X. Chang, G. Talaska and A. Puga (2002). Arsenic co-exposure potentiates benzo[a]pyrene genotoxicity. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **517**: 101-111.

Malloy, K. D., M. H. Holman, D. L. Mitchell and H. W. Detrich (1997). Solar UVB-induced DNA damage and photoenzymatic DNA repair in Antarctic zooplankton. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**: 1259-1263.

Mano, Y., K. Kator and N. Egami (1982). Photoreactivation and excision repair of thymine dimers in ultraviolet-irradiated cultured fish cells. *Radiation Research* **90** (3): 501-508.

Marabini, L., R. Calò and S. Fucile (2011). Genotoxic effects of polychlorinated biphenyls (PCB 153, 138, 101, 118) in a fish cell line (RTG-2). *Toxicology in Vitro* **25** (5): 1045-1052.

Marie, C. (2007). Recherche de nouveaux biomarqueurs d'exposition aux hydrocarbures aromatiques polycycliques à travers l'étude des lésions de l'ADN chez l'homme. Thèse de Doctorat. Grenoble-Université Joseph Fourier.

Marie, C., A. Maitre, T. Douki, M. Gateau, A. Tarantini, P. Guiraud, A. Favier and J. L. Ravanat (2008). Influence of the metabolic properties of human cells on the kinetic of formation of the major benzo[a]pyrene DNA adducts. *Journal of Applied Toxicology* **28** (5): 579-590.

Marnett, L. J. and P. C. Burcham (1993). Endogenous DNA-adducts: Potential and paradox. *Chemical Research in Toxicology* **6** (6): 771-785.

Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* **21** (3): 361-370.

Maron, D. M. and B. N. Ames (1983). Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research* **113**: 173-215.

Martin, F. L., K. J. Cole, M. H. Orme, P. L. Grover, D. H. Phillips and S. Venitt (1999). The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis ('comet') assay in metabolically-competent MCL-5 cells. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **445** (1): 21-43.

Martin, F. L., K. J. Cole, J. A. Williams, B. C. Millar, D. Harvey, G. Weaver, P. L. Grover and D. H. Phillips (2000). Activation of genotoxins to DNA-damaging species in exfoliated breast milk cells. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **470** (2): 115-124.

Masahito, P., T. Ishikawa and H. Sugano (1988). Fish tumors and their importance in cancer research. *Cancer Science* **79** (5): 545-555.

Masahito, P., K. Aoki, N. Egami, T. Ishikawa and H. Sugano (1989). Life-span studies on spontaneous tumor development in the medaka (*Oryzias latipes*). *Japanese Journal of Cancer Research* **80** (11): 1058-1065.

Matsumoto, Y., K. Kim and D. F. Bogenhagen (1994). Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: An alternative pathway of base excision DNA repair. *Molecular and Cellular Biology* **14** (9): 6187-6197.

McCarthy, J. F. and L. R. Shugart, Eds. (1990). Biomarkers of environmental contamination. Boca Raton, Floride, USA, Lewis Publishers.

Mc Neil, D. R., A. Narayana, H.-K. Wong and D. M. Wilson (2004). Inhibition of Ape1 nuclease activity by lead, iron, and cadmium. *Environmental Health Perspective* **112**: 799-804.

McFarland, V. A., L. S. Inouye, C. H. Lutz, A. S. Jarvis, J. U. Clarke and D. D. McCant (1999). Biomarkers of oxidative stress and genotoxicity in livers of field-collected brown bullhead, *Ameiurus nebulosus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37** (2): 236-241.

McGlynn, A., G. Wasson, S. O'Reilly, V. Mc Kelvey-Martin, H. Mc Nulty, J. Strain, G. McKerr, F. Mullan, N. Nahmud, J. Scott, D. Weir and C. Downes (2003). Detection of replicative integrity in small colonic biopsies using the BrdUrd comet assay. *British Journal of Cancer* **88** (6): 895-901.

McGlynn, A. P., G. Wasson, J. O'Connor, V. J. McKelvey-Martin and C. S. Downes (1999). The bromodeoxyuridine comet assay: Detection of maturation of recently replicated DNA in individual cells. *Cancer Research* **59** (23): 5912-5916.

Meador, J. A., R. B. Walter and D. L. Mitchell (2000). Induction, distribution and repair of UV photodamage in the Platyfish, *Xiphophorus signum*. *Photochemistry and Photobiology* **72** (2): 260-266.

Meador, J. A., Y. Su, J.-L. Ravanat and A. S. Balajee (2010). DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)-deficient human glioblastoma cells are preferentially sensitized by Zebularine. *Carcinogenesis* **31** (2): 184-191.

Mekkawy, I. A., U. M. Mahmoud and A. E.-D. H. Sayed (2011). Effects of 4-nonylphenol on blood cells of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822). *Tissue and Cell* **43** (4): 223-229.

Mellon, I., V. A. Bohr, C. A. Smith and P. C. Hanawalt (1986). Preferential DNA repair of an active gene in human cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. **83** (23): 8878-8882.

Mellon, I. and P. C. Hanawalt (1989). Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand. *Nature* **342** (6245): 95-98.

Memisoglu, A. and L. Samson (2000). Base excision repair in yeast and mammals. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **451** (1-2): 39-51.

Merk, O. and G. Speit (1999). Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **33** (2): 167-172.

Micael, J., M. A. Reis-Henriques, A. P. Carvalho and M. M. Santos (2007). Genotoxic effects of binary mixtures of xenoandrogens (tributyltin, triphenyltin) and a xenoestrogen (ethinylestradiol) in a partial life-cycle test with Zebrafish (*Danio rerio*). *Environment International* **33** (8): 1035-1039.

Miller, M. R., J. B. Blair and D. E. Hinton (1989). DNA repair synthesis in isolated rainbow trout liver cells. *Carcinogenesis* **10** (6): 995-1001.

Mitchell, D. L. and P. S. Hartman (1990). The regulation of DNA repair during development. *BioEssays* **12** (2): 74-79.

Mitchell, D. L., J. T. Scoggins and D. C. Morizot (1993). DNA repair in the variable platyfish (*Xiphophorus variatus*) irradiated *in vivo* with ultraviolet B light. *Photochemistry and Photobiology* **58** (3): 455-459.

Mitchell, D. L., J. A. Meador, M. Byrom and R. B. Walter (2001). Resolution of UV-induced DNA damage in *Xiphophorus* fishes. *Marine Biotechnology* **3**: 61-71.

Mitchell, D. L., R. S. Nairn, D. A. Johnston, M. Byrom, S. Kazianis and R. B. Walter (2004). Decreased levels of (6-4) photoproduct excision repair in hybrid fish of the Genus *Xiphophorus*. *Photochemistry and Photobiology* **79** (5): 447-452.

Mitchell, D. L., T. Adams-Deutsch and M. H. Olson (2009). Dose dependence of DNA repair in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae exposed to UV-B radiation. *Photochemical and Photobiological Sciences* **8**: 75-81.

Mitchellmore, C. L. and J. K. Chipman (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **399** (2): 135-147.

Mohanty, G., J. Mohanty, A. Nayak, S. Mohanty and S. Dutta (2011). Application of comet assay in the study of DNA damage and recovery in rohu (*Labeo rohita*) fingerlings after an exposure to phorate, an organophosphate pesticide. *Ecotoxicology* **20** (1): 283-292.

Monson, P. D., D. J. Call, D. A. Cox, K. Liber and G. T. Ankley (1999). Photoinduced toxicity of fluoranthene to northern leopard frogs (*Rana pipiens*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **18** (2): 308-312.

Moore, M. M., M. W. Breedveld and A. P. Autor (1989). The role of carotenoids in preventing oxidative damage in the pigmented yeast, *Rhodotorula mucilaginosa*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **270** (2): 419-431.

Morin, B., J. Filatreau, L. Vicquelin, I. Barjhou, S. Guinel, J. Leray-Forget and J. Cachot (2011). Detection of DNA damage in yolk-sac larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **399**: 2235-2242.

Mouchet, F., C. Gauthier, C. Mailhes, V. Ferrier and A. Devaux (2005). Comparative study of the comet assay and the micronucleus test in amphibian larvae (*Xenopus laevis*) using benzo(a)pyrene, ethyl methanesulfonate and methyl methanesulfonate. Establishment of a positive control in the amphibian comet assay. *Environmental Toxicology* **20**: 74-84.

Nakatsuru, Y., N. Nemoto, K. Nakagawa, P. Masahito and T. Ishikawa (1987). O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase activity in liver from various fish species. *Carcinogenesis* **8**: 1123-1127.

Nakatsuru, Y., K. Aoki and T. Ishikawa (1989). Age and strain dependence of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase activity in mice. *Mutation Research. DNAging* **219** (1): 51-56.

Nakatsuru, Y., X. Qin, P. Masahito and T. Ishikawa (1990). Immunological detection of *in vivo* aflatoxin B1-DNA adduct formation in rats, rainbow trout and coho salmon. *Carcinogenesis* **11** (9): 1523-1526.

Natarajan, A. T. and G. Obe (1982). Mutagenicity testing with cultured mammalian cells: Cytogenetic assays. *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*. H. J.A. New York, Academic Press: 171-213.

Nehls, S. and H. Segner (2001). Detection of DNA damage in two cell lines from rainbow trout, RTG-2 and RTL-W1, using the comet assay. *Environmental Toxicology* **16** (4): 321-329.

Nehls, S. and H. Segner (2005). Comet assay with the fish cell line rainbow trout gonad-2 for *in vitro* genotoxicity testing of xenobiotics and surface waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* **24** (8): 2078-2087.

Neužil, J., P. K. Witting and R. Stocker (1997). α -Tocopheryl hydroquinone is an efficient multifunctional inhibitor of radical-initiated oxidation of low density lipoprotein lipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94** (15): 7885-7890.

Niehers, C. (2009). Active DNA demethylation and DNA repair. *Differentiation* **77** (1): 1-11.

Notch, E. G., D. M. Miniutti and G. D. Mayer (2007). 17- α Ethinylestradiol decreases expression of multiple hepatic nucleotide excision repair genes in zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology* **84** (3): 301-309.

Notch, E. G. and G. D. Mayer (2009a). Wastewater treatment effluent alters nucleotide excision repair in zebrafish (*Danio rerio*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **150** (2): 307-313.

Notch, E. G. and G. D. Mayer (2009b). 17 α -Ethinylestradiol hinders nucleotide excision repair in zebrafish liver cells. *Aquatic Toxicology* **95** (4): 273-278.

Oberholster, P. J., A. M. Botha and T. E. Cloete (2005). Using a battery of bioassays, benthic phytoplankton and the AUSRIVAS method to monitor long-term coal tar contaminated sediment in the Cache la Poudre River, Colorado. *Water Research* **39** (20): 4913-4924.

Oconnor, T. R., S. Boiteux and J. Laval (1988). Ring-opened 7-methylguanine residues in DNA are a block to *in-vitro* DNA synthesis. *Nucleic Acids Research* **16** (13): 5879-5894.

Oehlers Jr, L. P., S. J. Heater, J. D. Rains, M. C. Wells, W. M. David and R. B. Walter (2004). Gene structure, purification and characterization of DNA polymerase β from *Xiphophorus maculatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **138** (3): 311-324.

Ohe, T., T. Watanabe and K. Wakabayashi (2004). Mutagens in surface waters: A review. *Mutation Research. Reviews in Mutation Research* **567** (2-3): 109-149.

Olive, P. L., J. P. Banáth and R. E. Durand (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet assay". *Radiation Research* **122**: 86-94.

Olive, P. L. and J. P. Banath (1993). Detection of DNA double-strand breaks through the cell-cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and (125)IdUrD. *International Journal of Radiation Biology* **64** (4): 349-358.

Olson, M. H. and D. L. Mitchell (2006). Interspecific variation in UV defense mechanisms among temperate freshwater fishes. *Photochemistry and Photobiology* **82**: 606-610.

Olsson, M. and T. Lindahl (1980). Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O⁶-methylguanine to a protein cysteine residue. *Journal of Biological Chemistry* **255** (22): 10569-10571.

Osano, O., W. Admiraal, H. J. C. Klamer, D. Pastor and E. A. J. Bleeker (2002). Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution* **119** (2): 195-202.

Palii, S. S., B. O. Van Emburgh, U. T. Sankpal, K. D. Brown and K. D. Robertson (2008). DNA methylation inhibitor 5-aza-2'deoxyctidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Molecular and Cellular Biology* **28** (2): 752-771.

Para, J. M., S. Sánchez-Fortún and A. Castaño (2010). Assessment of genotoxic effects induced by selected pesticides in RTG-2 fish cells by means of a modified fast micromethod assay. *Environmental Toxicology* **27**: 238-243.

Park, E.-H. and A.-K. Yi (1989). Photoreactivation rescue and dark repair demonstrated in UV-irradiated embryos of the self-fertilizing fish *Rivulus ocellatus marmoratus* (Teleostei; Aplocheilidae). *Mutation Research. DNA Repair* **217** (1): 19-24.

Parsons, J. L., I. I. Dianova, S. L. Allinson and G. L. Dianov (2005). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts. *FEBS Journal* **272** (8): 2012-2021.

Parveen, N. and G. Shadab (2012). Cytogenetic evaluation of cadmium chloride on *Channa punctatus*. *Journal of Environmental Biology* **33** (3): 663-666.

Peakall, D. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (1). Introduction. *Ecotoxicology* **3** (3): 157-160.

Pegg, A. E., M. E. Dolan, D. Scicchitano and K. Morimoto (1985). Studies of the repair of O⁶-alkylguanine and O⁴-alkylthymine in DNA by alkyltransferase from mammalian cells and bacteria. *Environmental Health Perspectives* **62**: 109-114.

Pellacani, C., A. Buschini, M. Furlini, P. Poli and C. Rossi (2006). A battery of *in vivo* and *in vitro* tests useful for genotoxic pollutant detection in surface waters. *Aquatic Toxicology* **77**: 1-10.

Penders, E. J. M., A. Spenkeliink, W. Hoogenboezem, S. G. P. Rotteveel, J. L. Maas and G. M. Alink (2012). Genotoxic effects in the Eastern mudminnow (*Umbra pygmaea*) after prolonged exposure to River Rhine water, as assessed by use of the *in vivo* SCE and Comet assays. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **53** (4): 304-310.

Penning, T. M. (1993). Dihydrodiol dehydrogenase and its role in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism. *Chemico-Biological Interactions* **89** (1): 1-34.

Pereira, S., V. Camilleri, M. Floriani, I. Cavalié, J. Garnier-Laplace and C. Adam-Guillermin (2012). Genotoxicity of uranium contamination in embryonic zebrafish cells. *Aquatic Toxicology* **109**: 11-16.

Perovic, A., S. Perovic, L. Erdinger and H. Hollert (2012). Assessment of the genotoxic potential of lake Skadar sediments using Ames test and comet assay on the fish cell line RTL-W1. *Archives of Biological Sciences* **64** (1): 249-256.

Pfaller, W., M. Balls, R. Clothier, S. Coecke, P. Dierickx and B. Ekwall (2001). Novel advanced *in vitro* methods for long-term toxicity testing: The report and recommendations of ECVAM workshop 45. *ATLA. Alternatives to Laboratory Animals* **29** (4): 393-426.

Pfuhler, S. and H. U. Wolf (1996). Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **27** (3): 196-201.

Pierrard, M.-A., P. Kestemont, E. Delaive, M. Dieu, M. Raes and F. Silvestre (2012). Malachite green toxicity assessed on Asian catfish primary cultures of peripheral blood mononuclear cells by a proteomic analysis. *Aquatic Toxicology* **114-115**: 142-152.

Poirier, L. A. and T. Vlasova (2002). The prospective role of abnormal methyl metabolism in cadmium toxicity. *Environmental Health Perspectives* **110** (Suppl 5): 793-795.

Pourquier, P. (2006). La réparation de l'ADN, cible potentielle d'un développement thérapeutique en cancérologie. *Bulletin du Cancer* **93**: 214-144.

Preston, R. J., J. A. Ross and A. M. Charlene (2010). DNA-Reactive Agents. *Comprehensive Toxicology*. Oxford, Elsevier: 349-360.

Prieto Gonzales, E. A., M. Ortega Soler, A. G. Fuch, R. Brito, A. M. Palermo, M. Martinez and E. Fuentes (2011). Differences in DNA repair kinetics of lesions induced by hydrogen peroxide in lymphocytes from premenopausal breast cancer patients and healthy women resident in great Buenos Aires. *Journal of Medicine and Medical Sciences* **2** (8): 1036-1046.

Primel, E. G., R. Zanella, M. H. S. Kurz, F. F. Goncalves, M. L. Martins, S. L. O. Machado and E. Marchesan (2007). Risk assessment of surface water contamination by herbicide residues: Monitoring of propanil degradation in irrigated rice field waters using HPLC-UV and confirmation by GC-MS. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **18** (3): 585-589.

Puerto, M., S. Pichardo, Á. Jos and A. M. Cameán (2009). Oxidative stress induced by microcystin-LR on PLHC-1 fish cell line. *Toxicology in Vitro* **23** (8): 1445-1449.

Quillardet, P., O. Huisman, R. D'Ari and M. Hofnung (1982). SOS chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K-12 to measure genotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **79**: 5971-5975.

Rabiet, M., C. Coquery, C. Margoum, C. Guillemain, V. Gouy and N. Carluer (2007). Distribution and fate of pesticides and traces metals in a small stream draining an agricultural watershed - Assessing the effect of hydrological conditions on the transport of contaminants. *Geophysical Research Abstracts* **9**.

Ramos, A. A., C. Pereira-Wilson and A. R. Collins (2010). Protective effects of Ursolic acid and Luteolin against oxidative DNA damage include enhancement of DNA repair in Caco-2 cells. *Mutation Research*(692): 6-11.

Ravanat, J.-L., T. Douki and J. Cadet (2001). Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *Journal of Photochemistry and Photobiology. Part B: Biology* **63** (1-3): 88-102.

Regan, J. D. and J. S. Cook (1967). Photoreactivation in an established vertebrate cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **58** (6): 2274-2279.

Regan, J. D., W. L. Carrier, C. Samet and B. L. Olla (1982). Photoreactivation in two closely related marine fishes having different longevities. *Mechanisms of Ageing and Development* **18** (1): 59-66.

Regan, J. D., R. D. Snyder, A. A. Francis and B. L. Olla (1983). Excision repair of ultraviolet- and chemically-induced damage in the DNA of fibroblasts derived from two closely related species of marine fishes. *Aquatic Toxicology* **4** (2): 181-188.

Reifferscheid, G. and J. Heil (1996). Validation of the SOS/umu test using test results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. *Mutation Research. Genetic Toxicology* **369** (3-4): 129-145.

Repetto, G., A. Jos, M. J. Hazen, M. L. Molero, A. del Peso, M. Salguero, P. del Castillo, M. C. Rodriguez-Vicente and M. Repetto (2001). A test battery for the ecotoxicological evaluation of pentachlorophenol. *Toxicology in Vitro*: 503-509.

Rhee, J.-S., R.-O. Kim, H.-H. Chang, J. Lee, Y.-M. Lee and J.-S. Lee (2011a). Endocrine disrupting chemicals modulate expression of O⁶-methylguanine DNA methyltransferase (O⁶-MGMT) gene in the hermaphrodite fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **153**: 141-149.

Rhee, J. S., B. M. Kim, R. O. Kim, B. S. Choi, I. Y. Choi, Y. M. Lee and J. S. Lee (2011b). Analysis of expressed sequence tags from the liver and ovary of the euryhaline hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics* **6** (3): 244-255.

Risso-de Faverey, C., A. Devaux, M. Lafaurie, J. P. Girard, B. Bailly and R. Rahmani (2001). Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species. *Aquatic Toxicology* **53** (1): 65-76.

Robbiano, L., D. Baroni, L. Novello and G. Brambilla (2006). Correlation between induction of DNA fragmentation in lung cells from rats and humans and carcinogenic activity. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **605** (1-2): 94-102.

Rocha, P. S., G. L. Luvizotto, T. Kosmehl, M. Böttcher, V. Storch, T. Braunbeck and H. Hollert (2009). Sediment genotoxicity in the Tietê River (São Paulo, Brazil): *In vitro* comet assay versus *in situ* micronucleus assay studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **72** (7): 1842-1848.

Rossner Jr, P., K. Uhlirova, O. Beskid, A. Rossnerova, V. Svecova and R. J. Sram (2011). Expression of XRCC5 in peripheral blood lymphocytes is upregulated in subjects from a heavily polluted region in the Czech Republic. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **713** (1-2): 76-82.

Roy, S. S., S. Mukherjee, S. Mukhopadhyay and S. K. Das (2004). Differential effect of cadmium on cholinephosphotransferase activity in normal and cancerous human mammary epithelial cell lines. *Molecular Cancer Therapeutics* **3** (2): 199-204.

Russo, C., L. Rocco, M. A. Morescalchi and V. Stingo (2004). Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57** (2): 168-174.

Sadikovic, B. and D. I. Rodenhiser (2006). Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* **216** (3): 458-468.

Saito, Y. and P. M. Jones (2006). Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle* **5** (19): 2220-2222.

Salnikow, K. and A. Zhitkovich (2007). Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis: Nickel, arsenic, and chromium. *Chemical Research in Toxicology* **21** (1): 28-44.

Sancar, G. B. (2000). Enzymatic photoreactivation: 50 years and counting. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **451** (1-2): 25-37.

Sanchez-Galan, S., A. R. Linde, F. Ayllon and E. Garcia-Vazquez (2001). Induction of micronuclei in eel (*Anguilla anguilla* L.) by heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **49** (2): 139-143.

Sánchez, P., M. T. Llorente and A. Castano (2000). Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish derived cells after exposure to three model genotoxic agents: mitomycin C, vincristine and benzo(a)pyrene. *Mutation Research* **465**: 113-122.

Sanchez, W., S. Aït-Aïssa, O. Palluel, J. M. Ditche and J.-M. Porcher (2007). Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* **16**: 279-287.

Sandrini, J. Z., A. Bianchini, G. S. Trindade, L. E. M. Nery and L. F. F. Marins (2009a). Reactive oxygen species generation and expression of DNA repair-related genes after copper exposure in zebrafish (*Danio rerio*) ZFL cells. *Aquatic Toxicology* **95** (4): 285-291.

Sandrini, J. Z., G. S. Trindade, L. E. M. Nery and L. F. Marins (2009b). Time-course expression of DNA repair-related genes in hepatocytes of zebrafish (*Danio rerio*) after UV-B exposure. *Photochemistry and Photobiology* **85** (1): 220-226.

Sauvaigo, S., C. Serres, N. Signorini, N. Emonet, M.-J. Richard and J. Cadet (1998). Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immunofluorescent detection of specific DNA damage. *Analytical Biochemistry* **259**: 1-7.

Schirmer, K., A. G. J. Chan, B. M. Greenberg, D. G. Dixon and N. C. Bols (1997). Methodology for demonstrating and measuring the photocytotoxicity of fluoranthene to fish cells in culture. *Toxicology in Vitro* **11** (107-119).

Schirmer, K., D. G. Dixon, B. M. Greenberg and N. C. Bols (1998). Ability of 16 priority PAHs to be directly cytotoxic to a cell line from the rainbow trout gill. *Toxicology* **127** (1-3): 129-141.

Schirmer, K., A. G. J. Chan and N. C. Bols (2000). Transitory metabolic disruption and cytotoxicity elicited by benzo-a-pyrene in two cell lines from rainbow trout liver. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **14** (5): 262-276.

Schirmer, K., D. J. Tom, N. C. Bols and J. P. Sherry (2001). Ability of fractionated petroleum refinery effluent to elicit cyto- and photocytotoxic responses and to induce 7-ethoxyresorufin-O-deethylase activity in fish cell lines. *Science of The Total Environment* **271** (1-3): 61-78.

Schirmer, K., V. R. Dayeh, S. Bopp, S. Russold and N. C. Bols (2004). Applying whole water samples to cell bioassays for detecting dioxin-like compounds at contaminated sites. *Toxicology* **205** (3): 211-221.

Schirmer, K. (2006). Proposal to improve vertebrate cell cultures to establish them as substitutes for the regulatory testing of chemicals and effluents using fish. *Toxicology* **224** (3): 163-183.

Schlenk, D. and C. D. Rice (1998). Effect of zinc and cadmium treatment on hydrogen peroxide-induced mortality and expression of glutathione and metallothionein in a teleost hepatoma cell line. *Aquatic Toxicology* **43** (2-3): 121-129.

Schmid, W. (1975). The micronucleus test. *Mutation Research*(31): 9-15.

Schneider-Stock, R., M. Diab-Assef, A. Rohrbeck, C. Foltzer-Jourdainne, C. Boltze, R. Hartig, P. Schönfeld, A. Roessner and H. Gali-Muhtasib (2005). 5-aza-cytidine is a potent inhibitor of DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT-116 colon cancer cells via gadd45- and p53-dependent mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **312** (2): 525-536.

Schnell, S., N. C. Bols, C. Barata and C. Porte (2009a). Single and combined toxicity of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) on the rainbow trout liver cell line RTL-W1. *Aquatic Toxicology* **93** (4): 244-252.

Schnell, S., A. Kawano, C. Porte, L. E. J. Lee and N. C. Bols (2009b). Effects of ibuprofen on the viability and proliferation of rainbow trout liver cell lines and potential problems and interactions in effects assessment. *Environmental Toxicology* **24** (2): 157-165.

Segner, H., A. Behrens, E. M. Joyce, K. Schirmer and N. C. Bols (2000). Transient induction of 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity by medium change in the rainbow trout liver cell line, RTL-W1. *Marine Environmental Research* **50** (1-5): 489-493.

Segner, H. (2004). Cytotoxicity assay with fish cells as an alternative to the acute lethality assay with fish. *ATLA. Alternatives to Laboratory Animals* **32**: 375-382.

Seiler, J. P. (1979). Herbicidal phenylalkylureas as possible mutagens : II. Chemical basis of mutagenic activity. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **12** (2): 183-190.

Sekar, D., M. L. Falcioni, G. Barucca and G. Falcioni (2011). DNA damage and repair following *in vitro* exposure to two different forms of titanium dioxide nanoparticles on trout erythrocyte. *Environmental Toxicology: In press*.

Sekihashi, K., A. Yamamoto, Y. Matsumura, S. Ueno, M. Watanabe-Akanuma, F. Kassie, S. Knasmüller, S. Tsuda and Y. F. Sasaki (2002). Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **517** (1-2): 53-75.

Setlow, R. B. and A. D. Woodhead (2001). Three unique experimental fish stories: *Poecilia* (the past), *Xiphophorus* (the present), and medaka (the future). *Marine Biotechnology* **3** (0): S017-S023.

Shao, J., M. L. Eckert, L. E. J. Lee and E. P. Gallagher (2008). Comparative oxygen radical formation and toxicity of BDE 47 in rainbow trout cell lines. *Marine Environmental Research* **66** (1): 7-8.

Shi, X., A. Gu, G. Ji, Y. Li, J. Di, J. Jin, F. Hu, Y. Long, Y. Xia, C. Lu, L. Song, S. Wang and X. Wang (2011). Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish. *Chemosphere* **85** (6): 1010-1016.

Shima, A., M. Kenaga, O. Nikaido, H. Takebe and N. Egami (1981). Photoreactivation of ultraviolet light-induced damage in cultured fish cells as revealed by increased colony forming ability and decreased content of pyrimidine dimers. *Photochemistry and Photobiology* **33** (3): 313-316.

Shugart, L. R. (1988). Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay. *Aquatic Toxicology* **13** (1): 43-52.

Shugart, L. R. and C. W. Theodorakis (1996). Genetic ecotoxicology: the genotypic diversity approach. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology* **113** (2): 273-276.

Shugart, L. R. (2000). DNA damage as a biomarker of exposure. *Ecotoxicology* **9**: 329-340.

Shugart, L. R., C. W. Theodorakis, A. M. Bickham and J. W. Bickham (2003). Chapter 41 - Genetic effects of contaminant exposure and potential impacts on animal populations. *Handbook of Ecotoxicology*. D. J. Hoffman: 1129-1143.

Siddiqui, A. H. and M. Ahmad (2003). The Salmonella mutagenicity of industrial, surface and ground water samples of Aligarh region of India. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **541** (1-2): 21-29.

Singh, N. P., M. T. McCoy, R. R. Tice and E. L. Schneider (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* **175** (1): 184-191.

Siu, W. H. L., C. L. H. Hung, H. L. Wong, B. J. Richardson and P. K. S. Lam (2003). Exposure and time dependent DNA strand breakage in hepatopancreas of green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to Aroclor 1254, and mixtures of B[a]P and Aroclor 1254. *Marine Pollution Bulletin* **46** (10): 1285-1293.

Siu, W. H. L., J. Cao, R. W. Jack, R. S. S. Wu, B. J. Richardson, L. Xu and P. K. S. Lam (2004). Application of the comet and micronucleus assays to the detection of B[a]P genotoxicity in haemocytes of the green-lipped mussel (*Perna viridis*). *Aquatic Toxicology* **66** (4): 381-392.

Skosareva, L. V., N. A. Lebedeva, N. I. Rechkunova, A. Kolbanovskiy, N. E. Geacintov and O. I. Lavrik (2012). Human DNA polymerase λ catalyzes lesion bypass across benzo[a]pyrene-derived DNA adduct during base excision repair. *DNA Repair* **11** (4): 367-373.

Smeets, J. M. W., A. Voormolen, D. E. Tillitt, J. M. Everaarts and W. Seinen (1999). Cytochrome P4501A induction, benzo[a]pyrene metabolism, and nucleotide adduct formation in fish hepatoma cells: Effect of preexposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18** (3): 474-480.

Smith, C. C., M. R. O'donovan and E. A. Martin (2006). hOGG1 recognize oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII. *Mutagenesis* **21** (3): 185-190.

Smith, M. E., L. L. Larcom and S. E. Freeman (1985). Serum effects on DNA repair in human cells. *Chemico-Biological Interactions* **54**: 325-335.

Smolarek, T. A., S. L. Morgan, C. G. Moynihan, H. Lee, R. G. Harvey and W. M. Baird (1987). Metabolism and DNA adduct formation of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in fish cell lines in culture. *Carcinogenesis* **8** (10): 1501-1509.

Soares, J., L. Filipe, C. Castro, M. A. Reis-Henriques, N. M. Monteiro and M. M. Santos (2012). Zebrafish (*Danio rerio*) life-cycle exposure to chronic low doses of ethinylestradiol modulates p53 gene transcription within the gonads, but not NER pathways. *Ecotoxicology* **21** (5): 1513-1522.

Sovadinová, I., L. Bláha, J. Janosek, K. Hilscherová, J. P. Giesy, P. D. Jones and I. Holoubek (2006). Cytotoxicity and aryl hydrocarbon receptor mediated activity of N-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons: Structure-activity relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**: 1291-1297.

Speit, G. and A. Hartmann (1995). The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* **10** (6): 555-560.

Speit, G., T. Witton-Davies, W. Heepchantree, K. Trenz and H. Hoffmann (2003). Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **542** (1-2): 33-42.

Speit, G., P. Schutz, I. Bonzheim, K. Trenz and H. Hoffmann (2004a). Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicology Letters* **146** (2): 151-158.

Speit, G., P. Schütz and H. Hoffmann (2004b). Enhancement of genotoxic effects in the comet assay with human blood samples by aphidicolin. *Toxicology Letters* **153** (3): 303-310.

Speit, G. and P. Schütz (2008). The effect of inhibited replication on DNA migration in the comet assay in relation to cytotoxicity and clastogenicity. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **655** (1-2): 22-27.

Šrut, M., L. Traven, A. Stambuk, S. Kralj, R. Zaja, V. Micovic and G. I. V. Klobucar (2011). Genotoxicity of marine sediments in the fish hepatoma cell line PLHC-1 as assessed by the Comet assay. *Toxicology in Vitro* **25** (1): 308-314.

Stein, J. E., W. L. Reichert and U. Varanasi (1994). Molecular epizootiology: Assessment of exposure to genotoxic compounds in teleosts. *Environmental Health Perspectives* **102** (12): 19-23.

Storer, N. Y. and L. I. Zon (2010). Zebrafish models of p53 functions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2**: a001123.

Sussman, R. (2007). DNA repair capacity of zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** (33): 13379-13383.

Sverdrup, L. E., J. Jensen, A. E. Kelley, P. H. Krogh and J. Stenersen (2002). Effects of eight polycyclic aromatic compounds on the survival and reproduction of *Enchytraeus crypticus* (Oligochaeta, Clitellata). *Environmental Toxicology and Chemistry* **21** (1): 109-114.

Szeliga, J. and A. Dipple (1998). DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. *Chemical Research in Toxicology* **11** (1): 1-11.

Szyf, M. (2007). The dynamic epigenome and its implications in toxicology. *Toxicological Sciences* **100** (1): 7-23.

Takiguchi, M., W. E. Achanzar, W. Qu, G. Li and M. P. Waalkes (2003). Effects of cadmium on DNA-(Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium-induced cellular transformation. *Experimental Cell Research* **286** (2): 355-365.

Tamai, T. K., V. Vardhanabhuti, N. S. Foulkes and D. Whitmore (2004). Early embryonic light detection improves survival. *Current Biology* **14** (3): R104-R105.

Tan, B. and P. Melius (1986). Polynuclear aromatic hydrocarbon metabolism in fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **83** (2): 217-224.

Tarantini, A., A. Maitre, E. Lefebvre, M. Marques, C. Marie, J.-L. Ravanat and T. Douki (2009). Relative contribution of DNA strand breaks and DNA adducts to the genotoxicity of benzo[a]pyrene as a pure compound and in complex mixtures. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **671** (1-2): 67-75.

Tarantini, A., A. Maître, E. Lefebvre, M. Marques, A. Rajhi and T. Douki (2011). Polycyclic aromatic hydrocarbons in binary mixtures modulate the efficiency of benzo[a]pyrene to form DNA adducts in human cells. *Toxicology* **279**: 36-44.

Tchou, J., V. Bodepudi, S. Shibutani, I. Antoshechkin, J. Miller, A. P. Grollman and F. Johnson (1994). Substrate specificity of Fpg protein. Recognition and cleavage of oxidatively damaged DNA. *Journal of Biological Chemistry* **269** (21): 15318-15324.

TGD (2003). Technical Guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) n° 1488/94 on risk assessment for existing substances and directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. European Chemical Bureau, 2nd edition, EUR20418 EN/1 **Chapter 2**.

Thami, G. P. and R. Sarkar (2002). Coal tar: past, present and future. *Clinical and Experimental Dermatology* **27** (2): 99-103.

Thibaut, R. and C. Porte (2008). Effects of fibrates, anti-inflammatory drugs and antidepressants in the fish hepatoma cell line PLHC-1: Cytotoxicity and interactions with cytochrome P450 1A. *Toxicology in Vitro* **22** (5): 1128-1135.

Thibaut, R., S. Schnell and C. Porte (2009). Assessment of metabolic capabilities of PLHC-1 and RTL-W1 fish liver cell lines. *Cell Biology and Toxicology* **25** (6): 611-622.

Thier, R., D. Bonacker, T. Stoiber, K. J. Böhm, M. Wang, E. Unger, H. M. Bolt and G. Degen (2003). Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. *Toxicology Letters* **140-141**: 75-81.

Thornalley, P. J. and M. Vasák (1985). Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* **827** (1): 36-44.

Tiano, L., D. Fedeli, M. Moretti and G. Falcioni (2001). DNA damage induced by organotins on trout-nucleated erythrocytes. *Applied Organometallic Chemistry* **15** (7): 575-580.

Tice, R. R., E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyanae, E. S. Rojas, J.-C. Ryu and Y. F. Sasaki (2000). Single cell gel/Comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **35**: 206-221.

Tixier, C., M. Sancelme, F. Bonnemoy, A. Cueur and H. Veschambre (2001). Degradation products of a phenylurea herbicide, diuron: Synthesis, ecotoxicity, and biotransformation. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20** (7): 1381-1389.

TOXNET, H. S. D. B. (2003). 3,4-DCA - Environmental water concentrations. from <http://toxnet.nlm.nih.gov/>.

TOXNET, H. S. D. B. (2010). BaP.

Toyooka, T. and Y. Ibuki (2007). DNA damage induced by coexposure to PAHs and light. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **23** (2): 256-263.

Traven, L., R. Zaja, J. Loncar, T. Smital and V. Micovic (2008). CYP1A induction potential and the concentration of priority pollutants in marine sediment samples - *In vitro* evaluation using the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Toxicology in Vitro* **22** (6): 1648-1656.

Troxel, C. M., A. P. Reddy, P. E. O'Neal, J. D. Hendricks and G. S. Bailey (1997). *In vivo* aflatoxin B1 metabolism and hepatic DNA adduction in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicology and Applied Pharmacology* **143** (1): 213-220.

Tudek, B., A. A. VanZeeland, J. T. Kusmierk and J. Laval (1998). Activity of *Escherichia coli* DNA-glycosylases on DNA damaged by methylating and ethylating agents and influence of 3-substituted adenine derivatives. *Mutation Research. DNA Repair* **407** (2): 169-176.

Tuvikene, A., S. Huuskonen, K. Koponene, O. Ritola, U. Maurer and P. Lindström-Seppä (1999). Oil shale processing as a source of aquatic pollution: Monitoring of the biologic effects in caged and feral freshwater fish. *Environmental Health Perspectives* **107**: 745-52.

Uchida, N., H. Mitani and A. Shima (1995). Multiple effects of fluorescent light on repair of ultraviolet-induced DNA lesions in cultured goldfish cells. *Photochemistry and Photobiology* **61** (1): 79-83.

Van Metre, P. C., B. J. Mahler and J. T. Wilson (2009). PAHs underfoot: Contaminated dust from coal-tar sealcoat pavements is widespread in the United States. *Environmental Science and Technology* **43** (1): 20-25.

Van Metre, P. C. and B. J. Mahler (2010). Contribution of PAHs from coal-tar pavement sealcoat and other sources to 40 U.S. lakes. *Science of The Total Environment* **409**: 334-344.

Van Metre, P. C., M. S. Majewski, B. J. Mahler, W. T. Foreman, C. L. Braun, J. T. Wilson and T. L. Burbank (2012a). PAH volatilization following application of coal-tar-based pavement sealant. *Atmospheric Environment* **51**: 108-115.

Van Metre, P. C., M. S. Majewski, B. J. Mahler, W. T. Foreman, L. B. Braun, J. T. Wilson and T. L. Burbank (2012b). Volatilization of polycyclic aromatic hydrocarbons from coal-tar-sealed pavement *Chemosphere* **88** (1): 1-7.

Vande Loock, K., I. Decordier, R. Ciardelli, D. Haumont and M. Kirsch-Volders (2010). An aphidicolin-block nucleotide excision repair assay measuring DNA incision and repair capacity. *Mutagenesis* **25** (1): 25-32.

Vandegheuchte, M. B., T. Kyndt, B. Vanholme, A. Haegeman, G. Gheysen and C. R. Janssen (2009a). Occurrence of DNA methylation in *Daphnia magna* and influence of multigeneration Cd exposure. *Environment International* **35**: 700-706.

Vandegheuchte, M. B., F. Lemièrre and C. R. Janssen (2009b). Quantitative DNA-methylation in *Daphnia magna* and effects of multigeneration Zn exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **150**: 343-348.

Vandegheuchte, M. B. and C. R. Janssen (2011). Epigenetics and its implications for ecotoxicology. *Ecotoxicology* **20** (3): 607-624.

Varriale, A. and G. Bernardi (2006). DNA methylation and body temperature in fishes. *Gene* **385** (0): 111-121.

Vetter, R. D., A. Kurtzman and T. Mori (1999). Diel cycles of DNA damage and repair in eggs and larvae of northern anchovy, *Engraulis mordax*, exposed to solar ultraviolet radiation. *Photochemistry and Photobiology* **69** (1): 27-33.

Vicquelin, L., J. Leray-Forget, L. Peluhet, K. LeMenach, B. Deflandre, P. Anschutz, H. Etcheber, B. Morin, H. Budzinski and J. Cachot (2011). A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology* **105** (3-4): 235-245.

Volz, D. C., S. E. Belanger, M. Embry, S. Padilla, H. Sanderson, K. Schirmer, S. Scholz and D. Villeneuve (2011). Adverse outcome pathways during early fish development: A conceptual framework for identification of chemical screening and prioritization strategies. *Toxicological Sciences* **123** (2): 349-358.

Walter, R. B., H.-M. Sung, G. W. Intano and C. A. Walter (2001a). Characterization of O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (O⁶-MGMT) activity in *Xiphophorus* fishes. *Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **493** (1-2): 11-22.

Walter, R. B., H.-M. Sung, R. D. Obermoeller, D. L. Mitchell, G. W. Intano and C. A. Walter (2001b). Relative base excision repair in *Xiphophorus* fish tissue extracts. *Marine Biotechnology* **3**: 50-60.

Walton, D. G., A. B. Acton and H. F. Stich (1983). DNA repair synthesis in cultured mammalian and fish cells following exposure to chemical mutagens. *Mutation Research. Genetic Toxicology* **124** (2): 153-161.

Walton, D. G., A. B. Acton and H. F. Stich (1984). Comparison of DNA-repair synthesis, chromosome aberrations and induction of micronuclei in cultured human fibroblast, Chinese hamster ovary and central mudminnow (*Umbra limi*) cells exposed to chemical mutagens. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **129** (1): 129-136.

Walton, D. G., A. B. Acton and H. F. Stich (1987). DNA repair synthesis in cultured fish and human cells exposed to fish S9-activated aromatic hydrocarbons. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **86** (2): 399-404.

Wang, P., A. B. Guliaev and B. Hang (2006). Metal inhibition of human N-methylpurine-DNA glycosylase activity in base excision repair. *Toxicology Letters* **166** (3): 237-247.

Wang, Y., C. Wang, J. Zhang, Y. Chen and Z. Zuo (2009). DNA hypomethylation induced by tributyltin, triphenyltin, and a mixture of these in *Sebastes marmoratus* liver. *Aquatic Toxicology* **95** (2): 93-98.

Wasson, G. R., A. P. McGlynn, H. McNulty, S. L. O'Reilly, V. J. McKelvey-Martin, G. McKerr, J. J. Strain, J. Scott and C. S. Downes (2006). Global DNA and p53 region-specific hypomethylation in human colonic cells is induced by folate depletion and reversed by folate supplementation. *The Journal of Nutrition* **136** (11): 2748-2753.

Weber, S. (2005). Light-driven enzymatic catalysis of DNA repair: a review of recent biophysical studies on photolyase. *Biochimica and Biophysica Acta - Bioenergetics* **1707** (1): 1-23.

Weimer, T. L., A. P. Reddy, U. Harttig, D. Alexander, S. C. Stamm, M. R. Miller, W. Baird, J. Hendricks and G. Bailey (2000). Influence of β -naphthoflavone on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene metabolism, DNA adduction, and tumorigenicity in rainbow trout. *Toxicological Sciences* **57**: 217-228.

Wentzel, J. F., Gouws, C., Huysamen, C., van Dyk, E., Koekemoer, G., Pretorius, P.J. (2010). Assessing the DNA methylation status of single cells with the comet assay. *Analytical Biochemistry* **400**: 190-194.

Więsierska-Gądek, J., N. Zulehner, F. Ferk, A. Składanowski, O. Komina and M. Maurer (2012). PARP inhibition potentiates the cytotoxic activity of C-1305, a selective inhibitor of topoisomerase II, in human BRCA1-positive breast cancer cells. *Biochemical Pharmacology* **84** (10): 1318-1331.

White, P. A. and J. B. Rasmussen (1998). The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. *Mutation Research* **410** (3): 223-236.

Will, O., E. Gocke, I. Eckert, I. Schulz, M. Pflaum, H.-C. Mahler and B. Epe (1999). Oxidative DNA damage and mutations induced by a polar photosensitizer, Ro19-8022. *Mutation Research. DNA Repair* **435** (1): 89-101.

Willett, K. L., L. A. Lienesch and R. T. Di Giulio (2001). No detectable DNA excision repair in UV-exposed hepatocytes from two catfish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* **128** (3): 349-358.

Windhofer, F., S. Krause, C. Hader, W. A. Schulz and A. R. Florl (2008). Distinctive differences in DNA double-strand break repair between normal urothelial and urothelial carcinoma cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **638** (1-2): 56-65.

Winston, G. W. (1991). Oxidants and antioxidants in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology* **100** (1-2): 173-176.

Wolfe, A. R., T. J. Smith and T. Meehan (2004). Benzo[a]pyrene Diol Epoxide forms covalent adducts with deoxycytidylic acid by alkylation at both exocyclic amino N4 and ring imino N-3 positions. *Chemical Research in Toxicology* **17** (4): 476-491.

Wölz, J., D. Borck, G. Witt and H. Hollert (2009). Ecotoxicological characterization of sediment cores from the western Baltic Sea (Mecklenburg Bight) using GC-MS and *in vitro* biotests. *Journal of Soils and Sediments* **9** (5): 400-410.

Woodhead, A. D. and P. M. Achey (1979). Photoreactivating enzyme in the blind cave fish, *Anoptichthys jordani*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **63** (1): 73-76.

Woodhead, A. D., R. B. Setlow and E. Grist (1980). DNA repair and longevity in three species of cold-blooded vertebrates. *Experimental Gerontology* **15** (4): 301-304.

Woodhead, A. D., E. Grist, C. Carlson, T. E. White, E. Waldstein and E.-H. Cao (1986). Presence of O⁶-methylguanine acceptor protein in tissues of different classes of vertebrates and invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **85** (1): 125-130.

Wortelboer, H. M., C. A. de Kruif, A. A. J. van Iersel, H. E. Falke, J. Noordhoek and B. J. Blaauboer (1991). Comparison of cytochrome P450 isoenzyme profiles in rat liver and hepatocyte cultures: The effects of model inducers on apoproteins and biotransformation activities. *Biochemical Pharmacology* **42** (2): 381-390.

Würgler, F. E. and P. G. N. Kramers (1992). Environmental effects of genotoxins (ecogenotoxicology). *Mutagenesis* **7** (5): 321-327.

Wyatt, M. D. and D. L. Pittman (2006). Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks. *Chemical Research in Toxicology* **19** (12): 1580-1594.

Xue, W. and D. Warshawsky (2005). Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* **206** (1): 73-93.

Yasuhira, S., H. Mitani and A. Shima (1991). Enhancement of photorepair of ultraviolet-damage by preillumination with fluorescent light in cultured fish cells. *Photochemistry and Photobiology* **53** (2): 211-215.

Yasuhira, S., H. Mitani and A. Shima (1992). Enhancement of photorepair of ultraviolet-induced pyrimidine dimers by preillumination with fluorescent light in the goldfish cell line. The relationship between survival and yield of pyrimidine dimers. *Photochemistry and Photobiology* **55** (1): 97-101.

Yeldandi, A. V., M. S. Rao and J. K. Reddy (2000). Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutation Research. Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **448** (2): 159-177.

Yu, H., H. Zhao, L.-E. Wang, Z. Liu, D. Li and Q. Wei (2012). Correlation between base-excision repair gene polymorphisms and levels of *in-vitro* BPDE-induced DNA adducts in cultured peripheral blood lymphocytes. *PLoS ONE*(7): 7.

Zaja, R., R. S. Klobucar and T. Smital (2007). Detection and functional characterization of Pgp1 (ABCB1) and MRP3 (ABCC3) efflux transporters in the PLHC-1 fish hepatoma cell line. *Aquatic Toxicology* **81** (4): 365-376.

Zaja, R., D. Caminada, J. Loncar, K. Fent and T. Smital (2008). Development and characterization of P-glycoprotein 1 (Pgp1, ABCB1)-mediated doxorubicin-resistant PLHC-1 hepatoma fish cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* **227** (2): 207-218.

Zhang, J., Y. Fu, J. Li, J. Wang, B. He and S. Xu (2009). Effects of subchronic cadmium poisoning on DNA methylation in hens. *Environmental Toxicology and Pharmacology* **27** (3): 345-349.

Zhou, B.-B. S. and S. J. Elledge (2000). The DNA damage response: Putting checkpoints in perspective. *Nature* **408** (6811): 433-439.

Zuo, K., C. Wang, M. Wu, Y. Wang and Y. Chen (2012). Exposure to tributyltin and triphenyltin induces DNA damage and alters nucleotide excision repair gene transcription in *Sebasticus marmoratus* liver. *Aquatic Toxicology* **122-123**: 106-112.

Zurita, J. L., Á. Jos, A. d. Peso, M. Salguero, M. López-Artíguez and G. Repetto (2007). Ecotoxicological assessment of bromobenzene using a test battery with five model systems. *Food and Chemical Toxicology* **45** (4): 575-584.

ANNEXES

ANNEXE I

31415 – Milieu de Leibovitz's L-15

Composant	Poids moléculaire Concentration (mg/L) mM		
Acides Aminées			
Glycine	75	200	2.67
L-Alanine	89	225	2.53
L-Arginine	174	500	2.87
L-Asparagine	132	250	1.89
L-Cystéine	121	120	0.992
L-Glutamine	146	300	2.05
L-Histidine	155	250	1.61
L-Isoleucine	131	250	1.91
L-Leucine	131	125	0.954
L-Lysine	146	75	0.514
L-Méthionine	149	75	0.503
L-Phénylalanine	165	125	0.758
L-Sérine	105	200	1.9
L-Thréonine	119	300	2.52
L-Tryptophan	204	20	0.098
L-Tyrosine	181	300	1.66
L-Valine	117	100	0.855
Vitamines			
Chlorure de choline	140	1	0.00714
D-Calcium pantothénate	477	1	0.0021
Acide folique	441	1	0.00227
Niacinamide	122	1	0.0082
Chlorhydrate de Pyridoxine	206	1	0.00485
Riboflavine 5'-phosphate Na	478	0.1	0.000209
Monophosphate de Thiamine	442	1	0.00226
i-Inositol	180	2	0.0111
Sels Inorganiques			
Chlorure de Calcium (CaCl ₂) (anhyd.)	111	140	1.26
Chlorure de Magnésium (anhydre)	95	93.7	0.986
Sulfate de Magnésium (MgSO ₄) (anhyd.)	120	97.67	0.814
Chlorure de Potassium (KCl)	75	400	5.33
Phosphate de Potassium monobasique (KH ₂ PO ₄)	136	60	0.441
Chlorure de Sodium (NaCl)	58	8000	137.93
Phosphate de Sodium dibasique (Na ₂ HPO ₄) anhydre	142	190	1.34
Autres composants			
D+ Galactose	180	900	5
Rouge phénol	376.4	10	0.0266
Pyruvate de sodium	110	550	5

ANNEXE II

TRYPsinATION DES CELLULES

(à réaliser avant confluence totale des cellules, à 75-80% de confluence)

Avant manipulation :

- Allumer les UV 15 min dans la hotte
- Lever la vitre et attendre 15 min
- Désinfection des mains et des gants à usage unique (savon et isopropanol)
- Désinfecter le matériel à l'isopropanol avant de le rentrer dans la hotte à flux laminaire
- Désinfection à l'isopropanol et organisation de son poste de travail

TRYPsinATION EN FLACON DE CULTURE CELLULAIRE DE 25 (P25) OU 75 CM² (P75)

Matériels :

2 pipettes stériles de 5 mL et 1 pipette de 25 mL à usage unique

Milieu L-15 complet (conservé à 4°C)

Solution de trypsine-EDTA (conservé à -80°) aliquoté par 1 mL à diluer au 1/10^{ème} avec du D-PBS stérile (sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺) ;

Solution de D-PBS (sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺) stérile (Sigma réf D 8537) supplémenté d'EDTA à 0.03% (conservé à 4°)

2 ou 3 flacons de culture cellulaire stériles vides

1 flacon de 25 cm² ou 75 cm² dont la confluence est à 75-80%

Système d'aspiration du milieu (pipette pasteur reliée à la pompe à vide)

Microscope à contraste inversé

Protocole :

- Décongeler et mettre à température ambiante (20°C) la solution de trypsine, la solution de D-PBS avec EDTA et le milieu L-15 complet.
- Aspirer le milieu en prenant soin de ne pas abîmer le tapis cellulaire
- Ajoutez 5 mL de D-PBS EDTA dans une P75 (ou 2 mL dans un P25) pour laver le tapis cellulaire et réaspirer (lavage du SVF et des cations bivalents du tapis cellulaire qui inhibent la trypsine)
- Ajoutez 2 mL de trypsine EDTA (P75 ; ou 0.7 mL pour une P25)
- Laissez agir en remuant délicatement, vérifier le détachement des cellules au microscope
- Ajoutez 28 mL (P75, ou 9.3 mL pour une P25) de milieu L-15 complet sur le tapis cellulaire
- Homogénéisez gentiment par aspiration-refoulement
- Répartir la solution dans 2 flacons de culture stériles (15 mL par P75, 5 mL par P25)

- Incubez les flacons à l'étuve à 18-20°C.

Changez le milieu après 24h (pour enlever la trypsine) par du milieu L-15 complet.

TRYPsinATION ET ENSEMENCEMENT EN PLAQUE 6, 12, OU 24 PUIITS POUR EXPOSITION A DES GENOTOXIQUES

Matériels :

2 pipettes stériles de 5 mL et 1 pipette de 25 mL à usage unique

Milieu L-15 complet (conservé à 4°C)

Solution de trypsine-EDTA (conservé à -80°), aliquoté par 1 mL à diluer au 1/10^{ème} avec du D-PBS stérile (sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺) ;

Solution de D-PBS (sans Ca²⁺ et sans Mg²⁺) stérile (Sigma réf D 8537) supplémenté d'EDTA à 0.03% (conservé à 4°)

Plaques de 6 ou 12 puits

1 flacon de 75 cm² dont la confluence est à 75-80%

Système d'aspiration du milieu (pipette pasteur reliée à la pompe à vide)

Microscope à contraste inversé

Protocole :

Dans le flacon de culture et sous hotte à flux laminaire :

- Aspirez le milieu du côté opposé des cellules adhérees
- Ajoutez 5 mL de d-PBS +EDTA 0.03% pour laver le tapis cellulaire, réaspirez
- Ajoutez 2 mL de trypsine EDTA, laissez agir en remuant délicatement, vérifier le détachement des cellules au microscope
- Ajoutez 8 mL de milieu L-15 complet sur le tapis cellulaire, homogénéisez gentiment par aspiration-refoulement pour déstructurer les amas de cellules.
- Réalisez un comptage de la suspension cellulaire au bleu Trypan en cellules de Malassez (20µL de bleu Trypan + 20µL de suspension cellulaire)
- Effectuez une dilution avec le milieu L-15 complet pour avoir une concentration cellulaire de 200 000 cellules/mL et un volume total de 20 mL par plaque 6 puits et de 15 mL par plaques 12 puits. Homogénéisez la suspension.
- Ensemencez la plaque 6 puits avec 3 mL par puits et la plaque 12 puits avec 1 mL par puits
- Incuber à 18-20°C pendant 24h.
- Changez le milieu après 24h pour exposez aux gammes de génotoxiques voulu.

ANNEXE III

BERc : CONSERVATION DE L'ADN SUBSTRAT ET DE L'EXTRAIT CELLULAIRE DANS LE TEMPS

➤ Conservation de l'ADN substrat dans le temps :

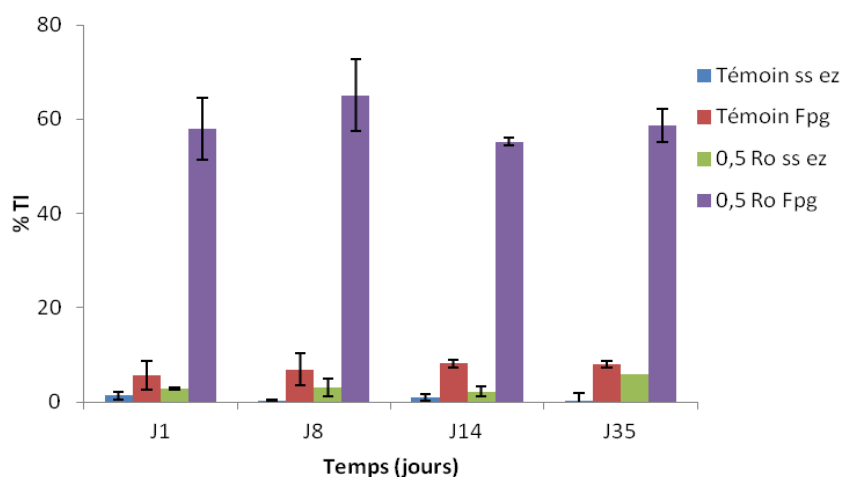
Méthode

Un lot de cellules RTL-W1 (24h post-ensemencement) exposées 5 minutes à 0.5 μM de Ro 19-8022 et à la lumière (2 KJ/m^2) en flacon de culture de 75cm^2 , a été réalisé à J0 selon le protocole suivant : immédiatement après exposition, les cellules traitées de 3 flacons de culture issus du même passage sont trypsinées, reprises dans du milieu L-15 complet et poolées. La suspension cellulaire est centrifugée (400g, 6 min, 4°C) et le culot de cellules est resuspendu dans un milieu de cryoconservation (milieu L-15 complet + 10% de DMSO) à une densité cellulaire de 1.10^6 cellules/mL, et aliquotée par 0.5 mL dans des tubes de cryoconservation. Ces aliquots sont congelés lentement (-1°C/minute) jusqu'à -80°C. Un lot de cellules issue du même passage mais non traitées au photosensibilisant a été préparé et congelé de la même manière.

Après décongélation, un essai comète modifié avec et sans Fpg a été réalisé à J+1, J+7, J+14 et J+35 sur les deux types de cellules (traitées au Ro 19-8022 et témoins).

Résultats

Les résultats présentés dans la figure ci-dessous montrent d'une part que le protocole de congélation appliqué n'endommage pas l'ADN (niveau de dommage de base satisfaisant à J1 chez les cellules témoins non exposées au R0 19-8022, avec ou sans incubation enzymatique). D'autre part, le niveau de dommage ne semble pas montrer de variation significative dans le temps (pas d'effet temps significatif pour aucun des traitements, ANOVA), bien que l'on ne s'affranchisse pas d'une certaine variabilité (maximum ± 7.66 % de dommage à J8 sur le substrat exposé au Ro 19-8022 et avec incubation enzymatique).



Conservation de l'ADN substrat congelé dans le temps avec ou sans exposition à 0.5 μM de Ro 19-8022.

Moyenne \pm ET de deux réplicats. Pas d'effet temps significatif pour aucun des traitements (ANOVA)

➤ Conservation des extraits dans le temps :

Méthode

Afin de vérifier la conservation dans le temps des extraits, la capacité d'incision d'extraits provenant d'un même lot préparés à J0, ont été testés à J7, J14 et J35 sur un même lot de substrat.

La préparation des extraits est la suivante :

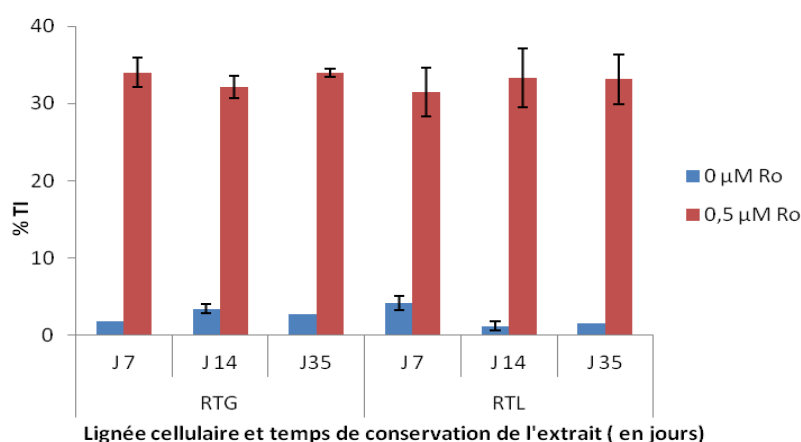
Les cellules ensemencées à 200 000 cellules/mL en P75 sont trypsinées 24h après ensemencement, selon le protocole de trypsination classique, puis reprises dans 8 mL de milieu L-15 complet. Elles sont centrifugées ($800g$, 10 min à 4°C), et le culot est resuspendu dans du PBS de façon à obtenir une concentration de 1.10^6 cell/mL. Cette suspension cellulaire est aliquoté par 1 mL, centrifugée ($14\ 000g$, 6 min, 4°C), et le culot à sec est congelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C jusqu'au jour de l'essai (J7, J14 et J35).

Lors de l'essai, l'aliquot est décongelé par ajout 65 μL de tampon A (45mM HEPES, 0.4 M KCl, 1mM EDTA, 0.1 mM dithiothréitol, 10% glycérol, ajusté à pH 7.8 avec KOH) contenant 1% de triton X100, le lysat est centrifugé ($14000g$, 5min, 4°C) et 55 μL du surnageant obtenue qui constitue l'extrait cellulaire brut sont mélangés à 245 μL de tampon F (tampon d'activité des enzyme de réparation, identique à celui de l'enzyme Fpg) puis conservés dans la glace jusqu'à utilisation. Les 10 μL d'extrait brut restant sont utilisé pour un dosage de protéines totales. 30 μL d'extrait sont ajoutés à chaque gel et incubés 45 min dans

une étuve à 20°C. Le reste de l'essai se déroule comme un essai comète classique. Des lames témoin négatif (avec tampon uniquement) et témoin positif (avec enzyme Fpg) sont également réalisées.

Résultats

Aucun effet temps significatif n'a été décelé, ce qui confirme que les extraits peuvent être conservés une période de 35 jours au congélateur à -80°C. Cependant, cette expérimentation étant assez lourde, elle n'a été faite qu'une fois ; étant donné l'absence d'effet, il n'a pas été jugé nécessaire de la répéter.



Effet de la conservation à -80°C de l'extrait sur son activité d'incision

0 μM Ro : lames témoins (substrat non exposé); 0.5 μM Ro : substrat exposé. Moyennes ±ET de 2 gels d'un réplikat

ANNEXE IV

RESULTATS DES ANALYSES CHIMIQUES DES EAUX DE RUISSELLEMENT « CTB » ET « ASB »

Données USGS – Communication personnelle

concentrations en µg/L – E : valeur estimée

HAPs

Echantillon	2 cycles			3 cycles		
	Naphthalene	Acenaph- thylene	Acenaph- thene	Fluorene	Phenan- threne	Anthracene
CTB 4h	12,68	<3	16,06	25,68	130,8	E35,18
CTB 24h	14,67	<4	20,29	28,13	136,7	E33,47
CTB 48h	6,06	<5	7,11	10,25	64,53	E18,72
CTB 72h	4,32	<6	5,62	8,61	61,12	E12,47
CTB 7j	1,87	<7	2,84	5,08	72,2	E16,02
CTB 36j	E0,539	<8	E0,747	E1,89	47,77	E4,55
ASB 4h	4,31	1,7	2,56	4,63	12,95	E4,18
ASB 24h	4,92	1,85	1,73	2,49	12,91	E2,85
ASB 48h	5,66	2,19	1,8	3,87	17,45	E3,5
ASB 72h	4,45	1,23	1,05	2,76	12,07	E2,34
ASB 7j	4,52	0,982	0,365	0,762	8,24	E2,23
ASB 36j	0,878	0,361	E0,15	0,506	9,44	1,25
Eau	0,22	0,3	0,28	E0,012	E0,013	E0,014

Echantillon	4 cycles			
	Fluoranthene	Pyrene	Benz(a)- anthracene	Chrysene
CTB 4h	47,31	33,1	11,57	11,75
CTB 24h	43,92	29,59	7,65	8,53
CTB 48h	32,26	20,9	5,83	8,16
CTB 72h	36,9	24,01	8,79	12,77
CTB 7j	92,78	64,06	34,83	48,85
CTB 36j	81,72	55,38	21,74	54,96
ASB 4h	3,22	2,1	0,417	0,845
ASB 24h	2,8	1,46	E0.419	E1.47
ASB 48h	3,52	1,53	0,41	1,21
ASB 72h	2,83	1,4	0,466	1,92
ASB 7j	2,1	1,22	E0.700	2,38
ASB 36j	14,21	8,1	2,56	7,29
Eau	E0,137	E0,0794	<0,26	E0,0238

Echantillon	5 cycles				6 cycles	
	Benzo(b)-fluoranthene	Benzo(k)-fluoranthene	Benzo(a)-pyrene	Dibenzo(a,h)-anthracene	Indenol(1,2,3-c,d)pyrene	Benzo(g,h,i)-perylene
CTB 4h	E10,63	E4,48	7,9	<4,2	E4,48	5,01
CTB 24h	E6,56	E2,73	4,92	<4,3	E2,74	3,08
CTB 48h	5,89	E2,96	3,39	<4,4	E2,03	2,21
CTB 72h	E9,43	E3,86	5,95	<4,5	E3,71	4,05
CTB 7j	E43,93	E23,04	29,86	<5,9	E19,06	21,53
CTB 36j	E51,1	E20,11	26,71	<5,57	E19,92	21,89
ASB 4h	E0,623	E0,236	0,353	<4,2	E0,145	E0,124
ASB 24h	E0,779	E0,277	0,408	<4,3	E0,232	E0,237
ASB 48h	E0,94	E0,372	0,426	<4,4	E0,18	E0,158
ASB 72h	E1,13	E0,592	0,561	<4,5	E0,226	E0,198
ASB 7j	E1,51	E0,609	0,608	<4,6	E0,401	E0,405
ASB 36j	E5,94	E0,296	3,52	<0,75	E2,66	3,1
Eau	E0,0082	E0,0043	E0,0065	0,42	<0,38	<0,38

Composés hétérocycliques azotés

Echantillon	Nitrobenzene	Quinoline	Isoquinoline	Acridine	Phenanthridine	Carbazole	Benzo(c)-cinnoline	2,2-Biquinoline
CTB 4h	<2.6	10,78	8,12	107	28,52	750	<2	<2
CTB 24h	<2.6	8,12	4,96	64,34	22,04	650	<2	<2
CTB 48h	<2.6	7,03	3,98	53,59	18,58	230	<2	<2
CTB 72h	<2.6	3,71	2,46	38,5	14,95	204	<2	<2
CTB 7j	<2.6	5,3	2,95	48,16	29,14	116	<2	<2
CTB 36j	<2.6	E0,881	0,368	25,38	16,61	58,4	<2	<2
ASB 4h	<0.26	7,24	1,41	1,2	2,95	17,21	<0.2	<0.2
ASB 24h	<0.26	5,84	0,912	1,05	3,38	12,5	<0.2	<0.2
ASB 48h	<0.26	5,76	0,889	0,974	3,98	10,38	<0.2	<0.2
ASB 72h	<0.26	3,5	0,477	0,675	2,99	5,99	<0.2	<0.2
ASB 7j	<0.26	3,86	2,05	0,639	2,59	3,46	<0.2	<0.2
ASB 36j	<0.26	0,343	3,33	0,75	1,33	4,15	<0.763	<0.213
Eau	0,26	0,2	0,2	0,0103	0,0103	0,0628	<0.2	<0.2

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE LYON

NOM : KIENZLER

DATE de SOUTENANCE : 15/03/2013

Prénoms : AUDE

TITRE : Intérêt des lignées cellulaires de poisson en écotoxicologie pour l'étude de nouveaux biomarqueurs de génotoxicité

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : 2013ISAL0016

Ecole doctorale : Chimie de Lyon

Spécialité : Environnement

RESUME : Un contexte réglementaire de plus en plus strict dans le domaine de l'évaluation du risque écotoxicologique des milieux aquatiques exige de renforcer les outils d'évaluation. A ce titre, l'étude des biomarqueurs de génotoxicité doit être privilégiée, compte tenu du rôle central de l'ADN dans le fonctionnement du vivant et dans la transmission d'effets trans-générationnels susceptibles d'affecter les populations sur le long terme. L'exposition à des agents génotoxiques peut générer des dommages par interaction directe avec la molécule d'ADN, mais aussi indirectement, en modulant l'efficacité des mécanismes de réparation de l'ADN, ou la régulation épigénétique de l'expression des gènes en agissant par exemple sur le niveau de méthylation de l'ADN. Aujourd'hui, la plupart des biomarqueurs de génotoxicité visent les dommages primaires à l'ADN ou la mutagénicité mais les effets indirects des contaminants sur l'ADN et sa fonctionnalité sont encore peu étudiés, en partie par manque de développement méthodologique de biomarqueurs correspondants à ces types d'effets génotoxiques. Dans ce contexte, à l'issue d'une analyse bibliographique comprenant entre autres la rédaction d'une revue sur les mécanismes de réparation des dommages à l'ADN chez le poisson, ce travail visait au développement méthodologique de plusieurs biomarqueurs de génotoxicité à l'aide de trois lignées cellulaires pisciaires (RTL-W1, RTGill-W1 et PLHC-1). Pour ce faire, l'essai des comètes en conditions alcalines a été décliné sous plusieurs versions dans l'objectif d'utiliser une technique de base unique permettant la mesure complémentaire de plusieurs biomarqueurs de génotoxicité : les dommages primaires à l'ADN, les activités de réparation et le niveau de méthylation des cytosines du génome.

Les résultats soulignent l'intérêt des trois lignées cellulaires de poisson en évaluation de la génotoxicité¹) pour détecter *in vitro* de manière sensible des atteintes primaires à l'ADN de natures variées à de faibles concentrations grâce à un essai des comètes modifié par une étape de digestion enzymatique avec une glycosylase (Fpg), 2) pour évaluer l'influence des contaminants sur l'activité de réparation par excision de bases (BER) *via* la mesure de la capacité d'incision d'un ADN substrat porteur de lésions de type 8-oxoGua par des extraits cellulaires (essai BERc). Le niveau de méthylation des cytosines (5-meCyt) des lignées RTgill-W1 et RTL-W1 a été mesuré par HPLC-MS-MS, leur valeur élevée (1,5 à 2,5% des cytosines totales) permet d'envisager le paramètre méthylation comme biomarqueur potentiel. Ce volet nécessitera cependant des étapes de validations ultérieures car il n'a pas été techniquement possible de mettre au point un essai des comètes modifié pour la mesure du niveau de méthylation de l'ADN.

Plusieurs activités de réparation des lignées RTgill-W1 et RTL-W1 ont été caractérisées et révèlent de bonnes aptitudes de réparation de type « Base Excision Repair » (BER) et « Photo Enzymatic Repair » (PER) et une plus faible capacité au « Nucleotide Excision Repair » (NER), soit un profil proche de celui décrit *in vivo* et sans différence marquée entre les deux lignées.

Les biomarqueurs développés sur les lignées cellulaires de poisson au cours de ce travail ont été appliqués à la mesure des effets génotoxiques d'effluents issus du lessivage de revêtements routiers à base de goudrons de houille dans le cadre d'un scénario d'évaluation du risque écotoxicologique.

MOTS-CLES : génotoxicité, biomarqueurs, lignées cellulaires, poisson, réparation de l'ADN, épigénétique

Laboratoire (s) de recherche : USC INRA IGH, UMR 5023 LEHNA, ENTPE, rue Maurice audin, 69518 Vaulx en Velin

Directeur de thèse: **Monsieur Devaux Alain**, Ingénieur de recherches INRA, HDR (directeur de thèse), USC INRA IGH, UMR 5023 LEHNA, ENTPE, rue Maurice audin, 69518 Vaulx en Velin, Cedex ; **Madame Sylvie Bony**, Chargé de recherches INRA,(co-directeur de thèse), USC INRA IGH, UMR 5023 LEHNA, ENTPE, rue Maurice Audin, 69518 Vaulx en Velin, Cedex ;

Composition du jury : **Monsieur Jérôme Cachot**, Professeur Université Bordeaux 1 (rapporteur)

Madame Valérie Fessard, Directrice de recherche, ANSES (rapporteur)

Monsieur Philippe Lejeune, Professeur INSA de Lyon, (examinateur)

Monsieur Sébastien Lemièrre, Maître de conférences, Université Lille Nord de France (examinateur)

Monsieur Selim Aït-Aïssa, Ingénieur de recherche INERIS (membre invité)

Monsieur Alain Devaux, Ingénieur de recherche INRA, (directeur de thèse),

Madame Sylvie Bony, Chargé de recherche INRA,(co-directeur de thèse).