

### I.3.1. Généralités

Certains effets toxiques peuvent être décelés et mesurés à des niveaux d'organisation très fins sur l'ADN génomique par la détection de signes génotoxiques (Figure I-2).

La génotoxicité est définie comme la capacité de certains agents chimiques, physiques ou biologiques à provoquer des dommages à l'ADN qui peuvent conduire à des mutations génétiques. Ces agents mutagènes (Dégremont et Cachot, 2009), sont de deux types :

- les génotoxiques directs, capables de modifier la structure de l'ADN (ex : cassures simple et double brin). On parle dans ce cas d'effet clastogène.

- les génotoxiques indirects qui nécessitent une activation métabolique préalable avant d'exercer leurs effets sur le matériel génétique. Lorsqu'un agent provoque des anomalies au niveau du nombre de chromosomes (aneuploïdie). Dans ce cas, on parle d'effet aneugène.

Il existe un grand nombre de dommages possibles à l'ADN (Figure I-3 ). Lorsque les substances induisent des modifications de la séquence nucléotidique ou des cassures, on parle de lésions primaires (ou structurales) comme :

- les adduits qui correspondent à la liaison entre une molécule et une base de l'ADN (Jeffrey et Williams, 2005). Ce type de lésion modifie la structure spatiale de l'ADN, perturbant ainsi sa reconnaissance par l'ADN polymérase au cours de la réplication ou de la duplication.

- les cassures (simples et doubles brins) sont des lésions correspondant à la rupture d'un ou des deux brins de la molécule d'ADN. Les cassures doubles peuvent avoir lieu à la même position ou bien à des positions très proches. Ces lésions peuvent être induites par de nombreux facteurs (espèces réactives de l'oxygène (ROS), par exemple) ou par des radiations ionisantes comme les rayons X ou gamma. Les cassures doubles brins sont considérées comme des dommages particulièrement délétères car difficilement réparables. Moins fréquemment, des pontages intra ou inter-brins apparaissent, correspondant à des liaisons covalentes anormales entre des bases de l'ADN et des cassures simples ou doubles brins (Dégremont et Cachot, 2009).

Des additions, des substitutions ou des délétions de bases peuvent avoir lieu au sein de la double hélice d'ADN avec des répercussions potentielles sur les protéines issues de l'expression des gènes concernés par ces mutations. Enfin, des lésions oxydatives du matériel génétique peuvent être générées lors de l'attaque des bases de l'ADN (généralement la guanine) par des ROS.

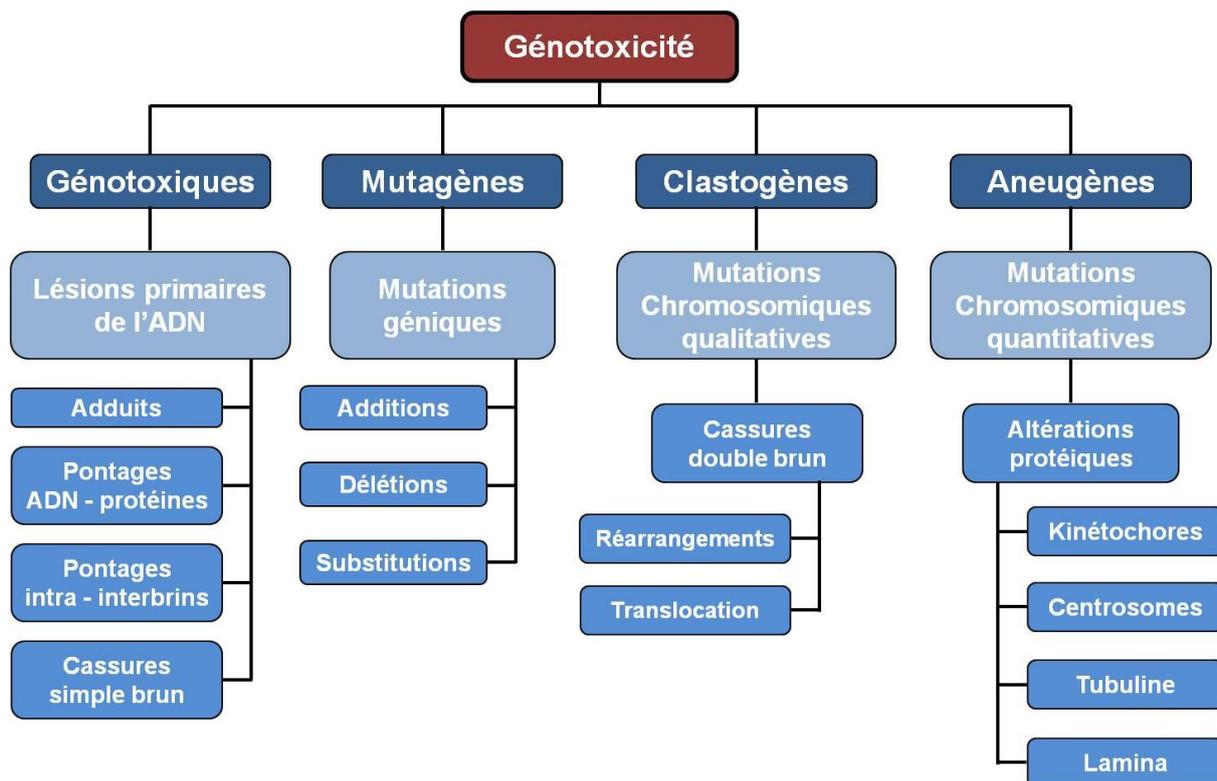


Figure I-3 : Différents types de lésions de l'ADN  
(d'après Orsière et al. 2005)

En principe, les dommages subis par l'ADN peuvent affecter tous les niveaux d'organisation biologique, et à terme avoir des répercussions sur la dynamique des populations (Vasseur et al., 2008). Cependant, les cellules possèdent plusieurs mécanismes spécifiques permettant de contrôler l'intégrité du patrimoine génétique puis le cas échéant de le réparer. Il existe deux types de systèmes de réparation : les mécanismes conservatifs d'excision re-synthèse qui garantissent une réparation fidèle, et les systèmes dits fautifs qui interviennent dans un second temps lorsque les mécanismes conservatifs sont dépassés par l'abondance des lésions de l'ADN. Ces systèmes fautifs permettent une réparation d'urgence qui autorise alors la reprise de la réplication de l'ADN mais ne garantissent pas le maintien de l'intégrité de cet ADN (Dégremon et Cachot, 2009).

### I.3.2. Méthodes d'analyse de la génotoxicité en écotoxicologie

En écotoxicologie, 2 méthodes de mesure/détection des signes de génotoxicité sont couramment utilisées, chacune d'elles présentant des avantages et des inconvénients. Les paragraphes suivants décrivent succinctement ces 2 méthodes : l'essai comète et le test des micronoyaux. Enfin, une 3<sup>ème</sup> méthode utilisée depuis une quinzaine d'années en écotoxicologie, la PCR par amorçage aléatoire ou *Random Amplified Polymorphic DNA*

(RAPD), sera présentée en précisant son intérêt potentiel pour l'étude de la génotoxicité des contaminants sur le modèle œufs/embryons d'escargot.

### **I.3.2.1. Test des comètes**

Le test des comètes ou *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE) a été mis au point en 1984 par Ostling et Johanson. Il a permis de détecter les cassures doubles brins chez des cellules isolées de mammifères. En 1988, Singh et al. ont adapté la méthode pour permettre la détection des cassures doubles et simples brins sur des lymphocytes humains. Le nom de ce test vient de la visualisation des noyaux endommagés qui prennent l'aspect de comètes classiquement observées en astronomie avec une tête et une queue (Figure I-4).

#### **- Principe de la méthode**

Le test des comètes est une technique d'électrophorèse sur microgel d'agarose. Il permet la détection spécifique de cassures simples et doubles brins ou la mise en évidence d'une fragmentation de l'ADN synonyme d'apoptose (mort cellulaire programmée). Ce test est effectué sur un même type cellulaire et requiert parfois une étape de dissociation. En écotoxicologie, il a été couramment utilisé sur de nombreux groupes d'organismes : plantes, planaires, oligochètes, mollusques gastéropodes et bivalves, crustacés, insectes, échinodermes, poissons, amphibiens et mammifères (Jha, 2008).

La méthodologie de ce test est la suivante : les cellules isolées sont emprisonnées dans un gel d'agarose puis lysées (souvent en milieu alcalin). L'ADN dénaturé est séparé par électrophorèse puis coloré au bromure d'éthidium. Les noyaux dont l'ADN a subi des cassures vont présenter une forme de comète tandis que les noyaux dont l'ADN n'est pas lésé apparaissent sous forme d'un cercle (Figure I-4). Une évaluation semi-quantitative (classement en quatre catégories) ou quantitative (évaluation du *Tail-moment*) des taux de dommages est ensuite réalisée.

L'analyse des résultats s'effectue la plupart du temps de manière quantitative à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. Généralement, les données sont exprimées en pourcentage du nombre de cellules ayant subies des dommages (ou pourcentage de comètes) dans la population cellulaire étudiée (Cotelle et Férard, 1999).

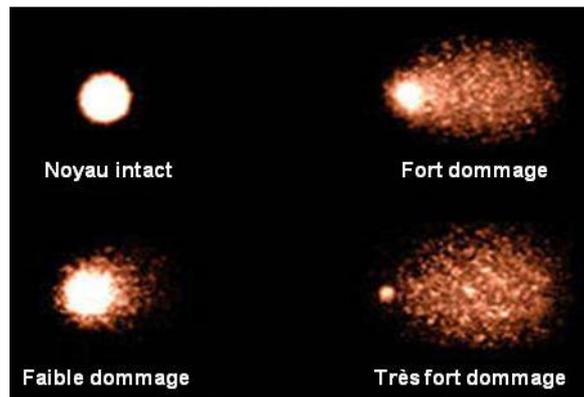


Figure I-4 : Aperçu des résultats de la migration lors d'un test comète  
(modifiée d'après <http://www.entpe.fr>)

#### - Avantages et inconvénients de la méthode

Les principaux avantages du test comète sont les suivants : il nécessite peu de matériel et il est applicable à de nombreux organismes. La méthodologie est simple, rapide et peu coûteuse. Ce test très sensible permet une détection spécifique des cassures doubles et simples brins ainsi que des sites alcali-labiles. Il est généralement utilisé sur des cellules circulantes ne nécessitant pas de dissociation préalable : érythrocytes de poissons (Galindo et al., 2010), cellules sanguines de branchies chez *D. rerio* (Rocco et al., 2010), cœlomocytes (cellules immunitaires) de vers de terre (Fourie et al., 2007), hémolymphe d'escargots terrestres (Leffa et al., 2010 ; Itziou et al., 2011a,b).

Il existe une réelle hétérogénéité dans les protocoles utilisés (temps de migration, fixation, neutralisation) qui peuvent avoir une incidence sur le résultat des tests. De même, on trouve une forte hétérogénéité dans l'expression des résultats, ce qui rend difficile les comparaisons entre les travaux publiés (Belpaeme et al., 1998 ; Schnurstein et Braunbeck, 2001). Le débit de lecture des lames est relativement faible : 600 comètes peuvent être lues individuellement par jour et 50 lames/jour de façon automatique. Cette méthode n'apporte pas d'information sur la taille des fragments d'ADN analysés (Olive et Banáth, 2006). Enfin, ce test présente deux inconvénients majeurs :

- les traitements enzymatiques ou mécaniques nécessaires à la dissociation cellulaire peuvent provoquer des dommages du matériel génétique biaisant alors les résultats du test.
- l'absence de protocole standard pour la dissociation des tissus et la lyse des cellules (Jha, 2008).

### - Application du test comète pour l'évaluation de la génotoxicité chez l'embryon

Il existe peu de travaux sur l'étude de la génotoxicité de substances chez l'embryon par SCGE. Néanmoins, certaines équipes de recherche ont publié récemment des résultats sur des cellules embryonnaires d'organismes aquatiques. Chez l'embryon d'huitre (*Crassostrea gigas*) exposé au BAP, au 17-ethinylestradiole, et à l'endosulfan (Wessel et al., 2007) et au métolachlore et à l'irgarol (pesticides), au Cd, au Cu (Mai et al., 2012) des signes de génotoxicité ont été montrés tout comme chez l'embryon de poisson (*Oryzias latipes*) exposé au Cd et au Cu (Barjhoux et al., 2012). Les larves de poisson medaka ont également été utilisées pour montrer la génotoxicité du Cd, du peroxyde d'hydrogène et du fluoranthène (Morin et al., 2011). La génotoxicité du platine a été démontrée chez des embryons de gastéropode aquatique (*Marisa cornuarietis*) par SCGE (Osterauer et al., 2011).

La méthodologie utilisée par Wessel et al. (2007) illustre bien les difficultés qui peuvent être rencontrées pour dissocier les cellules embryonnaires. La réussite de cette étape peut constituer un frein à l'utilisation du test comète sur les formes embryonnaires.

#### I.3.2.2. Test des micronoyaux

Ce test *in vitro* a été développé à partir des années 1970 sur un grand nombre d'organismes aquatiques (Godet et al., 1993). Il est basé sur la détection de micronoyaux dans le cytoplasme de cellules en division. Les micronoyaux résultent de la perte de tout ou d'une partie d'un chromosome durant la télophase formant un petit noyau supplémentaire séparé du noyau principal de la cellule. Ils peuvent provenir de la non-séparation des chromatides ou encore de cassures de chromosome (Figure I-5). Le test des micronoyaux (MN) permet de détecter les effets génotoxiques aneugènes ou clastogènes d'une substance (bio-marqueur d'effet).

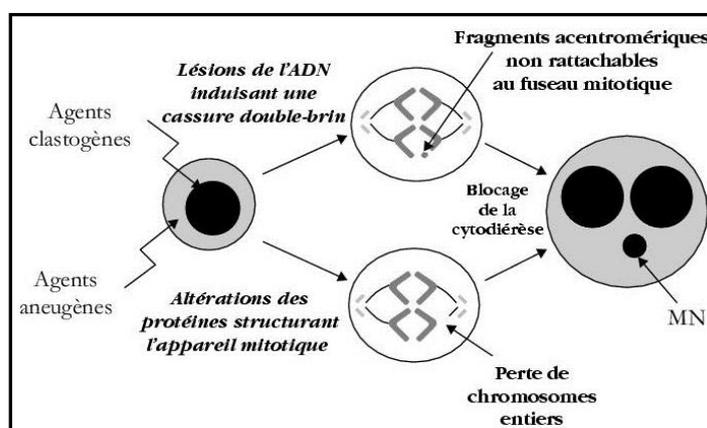


Figure I-5 : Formation d'un micronoyau (d'après Iarmarcovai et al. 2007)

### - Principe de la méthode

La méthode repose sur la coloration cellulaire. Les colorations (orcéine généralement) sont observées sous microscope et un dénombrement des micronoyaux est effectué. Ce test est largement utilisé en écotoxicologie. De nombreux protocoles sont disponibles notamment sur des érythrocytes de mammifères (OECD, 1997, 2010) ou d'amphibiens (Rocha, 2011).

### - Avantages et inconvénients

Cette méthode présente un coût modéré, elle est rapide et l'interprétation des résultats est simple (comptage de 1000 cellules). Ce test peut être effectué sur des cellules *in vitro* et *in vivo* chez de nombreux organismes. Tout comme le test comète, il est généralement mis en oeuvre sur des cellules circulantes ce qui permet de s'affranchir de l'étape délicate de dissociation. Il a été utilisé sur des érythrocytes chez le poisson *Prochilodus lineatus* (Galindo et al., 2010) et chez des cellules de branchies de moule *Mytilus edulis* (Izquierdo et al., 2003). Le MN a été utilisé avec succès sur des cellules d'hémolymphe et de branchies de la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*) pour déterminer la génotoxicité du Cd, du BAP (Vincent-Hubert et al., 2011). L'application du MN sur des contaminants émergents (nanoparticules) a également révélé l'intérêt de cette méthode pour étudier la génotoxicité potentielle d'une large gamme de substances (Kirsch-Volders et al., 2011).

Un des inconvénients de cette méthode est que les micronoyaux ne peuvent être observés qu'après une mitose. Cela nécessite de connaître la durée d'un cycle pour la population cellulaire étudiée. De plus, certains tissus possédant un taux de division faible peuvent être inadaptés au MN. Tout comme le test comète, le MN requiert l'obtention de cellules dissociées avec, en plus, des cytoplasmes intacts. Selon Sánchez-Argüello et al. (2012), les protocoles de dissociation cellulaires sur embryons varient d'un organisme à un autre et les traitements sont parfois très compliqués à mettre en oeuvre (dissection, dissociation mécanique puis chimique...).

### - Application du test des micronoyaux pour l'évaluation de la génotoxicité chez l'embryon

Peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'utilisation de cette méthode chez l'embryon. Un protocole pour l'utilisation du MN a été développé par Saotome et al. (1999) chez des embryons d'oursin (*Hemicentrotus pulcherrimus* et *Clypeaster japonicus*). Récemment, Sánchez-Argüello et al. (2012) ont utilisé le MN avec succès sur des cellules d'embryons dissociées de gastéropodes aquatiques (*Physa acuta*) exposés à divers contaminants : BAP, fluoxétine, vinclozoline.

En résumé

Un faible nombre d'études utilisent ces 2 méthodes pour caractériser la génotoxicité sur des modèles embryonnaires. Cela est probablement dû à la complexité de l'étape de dissociation cellulaire (cf méthodologie de Sanchez-Argüello et al. (2012)) pour le test comète et à la nécessité d'obtenir des cellules en division pour le test des micronoyaux. De plus, ces deux méthodes sont spécifiques de certains dommages à l'ADN et ne sont applicables que sur un seul type de cellule. Afin de limiter les inconvénients des 2 méthodes décrites ci-dessus et puisqu'aucune donnée n'est actuellement disponible sur le potentiel génotoxique de substances chimiques chez l'embryon d'escargot, nos recherches se sont donc focalisés sur une autre méthode qui permet la détection d'un large éventail de mutation dans l'ensemble du génome de l'organisme étudié : la PCR par amorçage aléatoire ou *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD).

### **I.3.2.3. La méthode RAPD**

#### **- Place dans la littérature scientifique**

Initialement, cette méthode était utilisée lors d'études de taxonomie et de phylogénie basées sur la détection du polymorphisme entre espèces (Atienzar et Jha, 2006). Depuis une quinzaine d'années, elle est souvent utilisée en écotoxicologie comme en témoigne le grand nombre de travaux publiés (59) depuis 2000 (Figure I-6). L'utilisation du mot clé "RAPD" pour une recherche bibliographique permet de dénombrer 667 articles pour l'année 2013 dont 15 traitent de génotoxicité (environ 2%) en écotoxicologie (articles d'études *in vitro* sur modèles humain, rat/souris exclus), le reste concernant principalement des études de taxonomie/phylogénie.

Parmi les 59 articles recensés avec les mots clés « RAPD » et « Génotoxicité », environ 40% concernent des modèles d'études animaux et 60% des modèles végétaux avec une parité entre les organismes aquatiques et terrestres (Figure I-6). Cette méthode est utilisée chez de nombreux organismes : plantes cultivées (Liu et al., 2009 ; Ahmad et al., 2012 ; Erturk et al., 2013), algues (Atienzar et al., 2000 ; Tuney et al., 2007), protozoaires ciliés (Zhou et al., 2011), poissons (Cambier et al., 2010 ; Rocco et al., 2010 ; Nan et al., 2013), mollusques aquatiques (Hagger et al., 2005 ; Barky et al., 2012), pour tester la génotoxicité de contaminants variés. 42% des articles s'intéressent aux métaux (Enan, 2006 ; Liu et al., 2009 ; Aydin et al., 2013), 30% à des polluants organiques (Atienzar et al., 2002a ; Atienzar et Jha, 2004 ; Mohanty et al., 2009 ; Barky et al., 2012), 10% à des contaminants biologiques comme

des mycotoxines (Becerril et al., 1999 ; Mahrous et al., 2006), des moisissures (El-Maarouf-Bouteau et al., 2011) ou encore des microalgues toxiques (Mat et al., 2013). Les autres contaminants étudiés sont pour l'essentiel des radionucléides (Theodorakis et al., 2001 ; Hagger et al., 2005 ; Ozakca et Silah, 2013), des nanoparticules (Geffroy et al., 2012 ; Lee et al., 2013) ou encore des contaminants physiques type rayons gamma (Dhakshanamoorthy et al., 2011) ou UV A et B (Atienzar et al., 2000). Le Tableau I-2 résume les différents travaux de génotoxicité via RAPD disponibles dans la littérature.

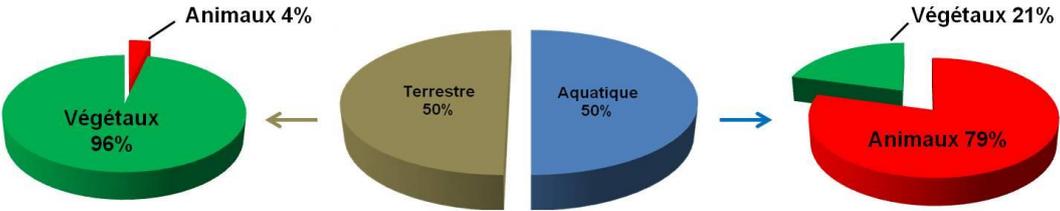


Figure I-6 : Répartition des publications sur RAPD et génotoxicité depuis 2000.

Tableau I-2 : Articles scientifiques traitant de la RAPD en écotoxicologie présentés par ordre alphabétique des auteurs

Auteur	Année	Animaux Végétaux	Aquatique Terrestre	Modèle d'étude	Types de contaminants	Substance(s)
Ahmad et al.	2012	végétaux	T terrestre	Riz ( <i>Oryza sativa</i> )	métaux	Ar
Aksakal	2013	végétaux	T terrestre	Orge ( <i>Hordeum vulgare</i> )	organique	Paraquat
Aksakal et al.	2013	végétaux	T terrestre	Maïs ( <i>Zea mays L. cv. TC-513</i> )	organique	2,4-dichlorophenoxyacetic acid
Al-Quraïny et al.	2010	végétaux	T terrestre	Salade Roquette ( <i>Eruca sativa</i> )	métaux	Zn, Pb et Cd
Aras et al.	2011	végétaux	T terrestre	Lichens ( <i>Pseudevernia furfuracea L.</i> )	mixte	Polluants atmosphériques
Atienzar et al.	2000	végétaux	Aquatique	Algue rouge ( <i>Palmaria palmata</i> )	physique	UV-A et B
Atienzar et al.	2001	animaux	Aquatique	Daphnies ( <i>Daphnia magna</i> )	métaux	Cu
Atienzar et al.	2002			<i>E. coli</i> , <i>thymus de veau</i> , algue rouge ( <i>Palmaria palmata</i> )	physique et organique	B[a]P, sonification et BPDE
Atienzar et al.	2002	animaux	Aquatique	Balanes ( <i>Elminius modestus</i> )	organique	4-n-Nonylphenol et 17-β estradiol
Atienzar et Jha	2004	animaux	Aquatique	Daphnies ( <i>Daphnia magna</i> )	organique	B(a)P
Aydin et al.	2012	végétaux	T terrestre	Concombre ( <i>Cucumis sativus L.</i> )	métaux	Cu et Zn
Aydin et al.	2013	végétaux	T terrestre	Plante okra ( <i>Abelmoschus esculentus L.</i> )	métaux	Cd
Barky et al.	2012	animaux	Aquatique	Escargots aquatiques ( <i>Biomphalaria alexandrina</i> )	organique	Atrazine and Roundup
Becerril et al.	1999	animaux	Aquatique	Cellules gonades truites ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	biologique	Micotoxine et mitomycine C
Ben Salem et al.	2014	animaux	Aquatique	Gardons ( <i>Rutilus rutilus</i> )	métaux	AS, Cd, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn
Bozari & Aksakal	2013	végétaux	T terrestre	Maïs ( <i>Zea mays L.</i> )	organique	Trifluraline (herbicide)
Cambier et al.	2010	animaux	Aquatique	Zebra fish ( <i>Danio rerio</i> )	métaux	Cd
Cansaran-Duman et al.	2011	végétaux	Aquatique	Lichen ( <i>Evernia prunastri</i> )	métaux	Cr, PB, Mn, Zn
Castano et Becerril	2004	animaux	Aquatique	Cellules gonades truites ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	organique	B(a)P
Cenkci et al.	2009	végétaux	T terrestre	Haricot ( <i>Phaseolus vulgaris L.</i> )	métaux	Hg, B, Cr et Zn
Cenkci et al.	2010	végétaux	T terrestre	Plante brassicaceae ( <i>Brassica rapa</i> )	métaux	Pb
Cesniene et al.	2010	végétaux	T terrestre	Plante ( <i>Tradescantia</i> )	polycontaminés	Sols terrain militaire : ammoniacque, acide nitrique
Dhakhnamoorthy et al.	2011	végétaux	T terrestre	Arbuste ( <i>Jatropha curcas L.</i> )	physique	Rayon gamma
Doganlar	2012	végétaux	Aquatique	Plantes aquatiques ( <i>Lemna minor &amp; Lemna gibba</i> )	organique	Quizalofop- <i>p</i> -ethyl (herbicide)
El-Maarouf-Bouteau et	2011	végétaux	T terrestre	Graines de tournesol ( <i>Helianthus annuus L.</i> )	biologique	Moississures
Enan	2006	végétaux	T terrestre	Haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	métaux	Pb, Cu, Mn et Cd
Erturk et al.	2013	végétaux	T terrestre	Maïs ( <i>Zea mays L.</i> )	métaux	Co et Ni
Galindo et al.	2010	animaux	Aquatique	Poisson ( <i>Prochilodus lineatus</i> )	métaux	Al

Tableau I-2 : Articles scientifiques traitant de la RAPD en écotoxicologie présentés par ordre alphabétique des auteurs (suite)

Auteur	Année	Milieu		Modèle d'étude	Types de contaminants	Substance(s)
		Animaux Végétaux	Aquatique Terrestre			
Geoffroy et al.	2012	animaux	Aquatique	Zebra fish ( <i>Danio rerio</i> )	nanoparticule	Nanoparticule dor (AuNPs)
Gjorgjeva et al.	2013	végétaux	T terrestre	Grande ortie ( <i>Urtica dioica</i> )	métaux	Cd Cu Mg Mn Na Ni Pb et Zn
Guida et al.	2010	végétaux	Aquatique	Embryon d'oursin ( <i>Paracentrotus lividus</i> )	biologique	Liquide Amniotique humain
Gupta et al.	2009	végétaux	Aquatique	Plantes ( <i>Hydrilla verticillata</i> , <i>Ceratophyllum demersum</i> )	métaux	Cd, Hg et Cu
Hagger et al.	2005	animaux	Aquatique	Embryon et larve de moule ( <i>Mytilus Edulis</i> )	radioactivité	Tritium
Kekec	2010	végétaux	T terrestre	Blé ( <i>Triticum aestivum</i> ), Haricot ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	métaux	B
Kekec et al.	2009	végétaux	T terrestre	Mais ( <i>Zea mays L.</i> )	métaux	B
Korpe et Aras	2011	végétaux	T terrestre	Graines d'Aubergine ( <i>Solanum melongena L.</i> )	métaux	Cu
Lee et al.	2013	végétaux	T terrestre	Sarasin ( <i>Fagopyrum Esculentum</i> )	nanoparticule	Nanoparticules de ZnO et CuO
Lerebours et al.	2013	animaux	Aquatique	Zebra fish ( <i>Danio rerio</i> )	divers	Hg, Uranium, hyperoxie
Lin et al.	2007	végétaux	T terrestre	Riz ( <i>Oryza sativa</i> )	métaux	Cd
Lin et al.	2009	végétaux	T terrestre	Orge ( <i>Hordeum vulgare</i> )	métaux	Cd
Lui et al.	2012	végétaux	T terrestre	Plantules <i>Arabidopsis</i>	métaux	Cd
Mahrous et al.	2006	animaux	Aquatique	Poisson Tilapia du Nil	biologique	Mycotoxine stérigmatocystine
Mat et al.	2013	animaux	Aquatique	Huitre ( <i>Crassostrea gigas</i> )	biologique	Microalgue toxique ( <i>Alexandrium minimum</i> )
Mohanly et al.	2009	animaux	Aquatique	Poisson rohu ( <i>Labeo rohita</i> )	organique	Carbofuran
Nan et al.	2013	animaux	Aquatique	Loche ( <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> )	organique	8-hydroxy lquinoline (8-HOQ)
Ortoux et al.	2011	animaux	Aquatique	Zebra fish ( <i>Danio rerio</i> )	métaux	Cd et Zn
Ozakca & Sliab	2013	végétaux	T terrestre	Oignons ( <i>Allium cepa</i> )	organique	Fusillazole
Plaire et al.	2013	animaux	Aquatique	Daphnies ( <i>Daphnia magna</i> )	radioactivité	Uranium
Rocco et al.	2010	animaux	Aquatique	Zebra fish ( <i>Danio rerio</i> )	organique	Produits pharmaceutiques :
Rocco et al.	2011	animaux	Aquatique	Zebra fish ( <i>Danio rerio</i> )	organique	Diclofenac, Carbamazépine
Rocco et al.	2012	animaux	Aquatique	Zebra fish ( <i>Danio rerio</i> )	organique	Gemfibrozile, atorvastatine, sildenafil, citrate
Sakar et al.	2011	végétaux	T terrestre	Arbuste ( <i>Jatropha curcas L.</i> )	métaux	Ni
Sunar et al.	2013	végétaux	T terrestre	Mais ( <i>Zea mays L.</i> )	biologique	Extraits méthanoliques de Liseron des champs
Swalleh et al.	2008	végétaux	T terrestre	Avoine ( <i>Avena sativa</i> )	mixte	Effluents d'eaux usées
Taspinar et al.	2009	végétaux	T terrestre	Fève ( <i>Vicia Faba</i> )	métaux	Se 4+ et Cd 2+
Theodorakis et al.	2001	animaux	T terrestre	Rat-kangourou ( <i>Dipodomys merriami</i> )	radioactivité	Radionucléides
Tuney et al.	2007	végétaux	Aquatique	Algue verte ( <i>Ulva lactuca</i> )	métaux	Cu
Zhiyi and Haowen	2004	animaux	Aquatique	Zebra fish ( <i>Danio rerio</i> )	organique	Phosphamide et diomethoate
Zhou et al.	2011	animaux	Aquatique	Cilié marin ( <i>Euploides vannus</i> )	organique	Nitrofurazone



La mise au point de la RAPD peut être laborieuse car la réaction d'amplification est très sensible aux quantités de réactifs (dNTPs, Mg<sup>2+</sup>, enzyme) et à la qualité de l'extrait d'ADN à amplifier. Du fait de sa sensibilité et surtout de la faible température d'hybridation utilisée, des amplifications parasites peuvent survenir au cours de la réaction (De Wolf et al., 2004 ; Atienzar et Jha, 2006). Cependant, une fois mise au point sur le modèle d'intérêt, cette technique permet l'analyse d'un grand nombre d'échantillons.

La méthode RAPD est surtout qualitative et au mieux semi-quantitative : elle ne permet pas de quantifier réellement le nombre de mutations engendrées par une exposition à un contaminant. Elle permet par contre un large balayage du génome afin de détecter des effets potentiels des substances testées. Plusieurs types de mutations ou dommages à l'ADN peuvent donner les mêmes modifications sur un profil, ce qui rend difficile l'interprétation des changements détectés (Figure I-8).

Direct effect of DNA damage and mutation on RAPD profiles			
DNA alterations	Consequences	Effects on RAPD profiles	Probability to detect the lesion by RAPD
	→By pass → processivity affected	→Decrease in band intensity/band loss	Medium
	→By pass → processivity not affected	→No effect	
	→Block → dissociation enzyme adduct	→Band loss	
	→Block → dissociation → more free Taq	→Increase in band intensity	
	→Block → no dissociation	→Band loss	
	→No primer/DNA association (adduct within the priming site)	→Band loss	
	→Block → dissociation enzyme DNA	→Band loss	Low
	→No primer/DNA association	→Band loss	Low
	→Creation of a new annealing site	→Appearance of band	Low
	→Loss of pre-existing annealing site	→Band loss	Low
	→New priming site	→Appearance of band	High

For more details please refer to the text. ●: DNA adduct; □ □: DNA breakage; ●: Taq DNA polymerase; - - - ►: DNA synthesis; ×: point mutation; ||||||: 10-mer primer.

Figure I-8 : Relation entre altérations de l'ADN et effet sur les profils RAPD

(Atienzar et Jha, 2006)

L'analyse des profils est réalisée le plus souvent de façon visuelle, la méthode est donc très subjective et l'interprétation observateur-dépendante, même si certains auteurs utilisent des logiciels de traitement d'image. Globalement, la qualité de la migration (non linéaire ; Liu et al., 2009), la mauvaise séparation des amplicons (Swaileh et al., 2007) et les photographies issues des électrophorèses de mauvaise qualité (Gupta et Sarin, 2009 ; Ben Salah-Abbès et al., 2009) compliquent l'analyse des profils. Cambier et al. (2010) ont développé une méthode d'analyse des profils de la PCR quantitative (qPCR) en utilisant les courbes de fusion des produits RAPD au lieu de l'approche post-électrophorèse. En effet, avec l'approche classique,

il est difficile d'interpréter les faibles différences entre profils témoins et contaminés lors d'expositions à de faibles doses de substances chimiques. Malgré cela, Cambier et al. (2010) ont indiqué que la résolution des amplicons après séparation sur gel d'agarose reste plus élevée que celle obtenue avec les courbes de fusion.

#### - Utilisation de la RAPD sur modèle terrestre

Suite à la recherche bibliographique sur l'utilisation de la méthode RAPD en écotoxicologie, il s'avère que la moitié des études concerne des organismes terrestres et l'autre des organismes aquatiques (Figure I-6). Chez ces derniers, la majorité des études RAPD sont réalisées sur des modèles animaux (80%) alors que pour les organismes terrestres cette méthode est quasi-exclusivement utilisée sur des modèles végétaux. A l'heure actuelle, la seule publication disponible chez un organisme animal terrestre concerne un rongeur du désert, le rat-kangourou *Dipodomys merriami* (Theodorakis et al., 2001). La méthode RAPD a été utilisée sur de l'ADN extrait de la rate d'individus vivants dans des zones contaminées ou non par des éléments radioactifs. Cependant aucun effet génotoxique n'a pu être mis en évidence.

Peu d'études RAPD ont été réalisées chez des stades embryonnaires. Seulement 2 publications sont disponibles chez des organismes invertébrés aquatiques. Hagger et al. (2005) ont démontré un effet génotoxique du tritium (HTO) dès 0,37 kBq/mL sur les embryons de moule *M. edulis*. Guida et al. (2010) ont utilisé la RAPD pour mettre en évidence des effets génotoxiques chez des embryons d'oursin (*Paracentrotus lividus*) après exposition à des liquides amniotiques provenant de femmes enceintes vivants dans des zones de décharges.

#### En résumé

L'étude de la génotoxicité des contaminants métalliques et organiques utilisés au cours de cette thèse a été réalisée par la méthode RAPD. Elle semble particulièrement adaptée au modèle embryonnaire car elle ne nécessite pas d'étape de dissociation cellulaire délicate comme lors des tests MN ou comète. De part la large gamme de dommage à l'ADN qu'elle est susceptible de détecter, cette approche peut être intéressante dans le cadre d'une première étude du potentiel génotoxique de substances chimiques chez les stades embryonnaires de l'escargot terrestre *Helix aspersa*.