



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THESE

présentée devant

l'UNIVERSITE DE METZ

pour obtenir le grade de **Docteur d'Université**

Spécialité : **Toxicologie de l'environnement**

par

Sylvie COTELLE

**Etude de la génotoxicité de matrices complexes
à l'aide de plantes supérieures**

soutenance le 22 Janvier 1999

Jury : Monsieur A. DEVAUX, HDR, chercheur INRA-ENTPE - Vaulx-en-Velin (*rapporteur*)
Monsieur J.F. FÉRARD, Professeur à l'Université de Metz (*directeur de thèse*)
Monsieur B. RÉTHER, Professeur à l'Université de Strasbourg (*rapporteur*)
Monsieur D. SAVANNE, Ingénieur ADEME - Paris
Madame P. VASSEUR, Professeur à l'Université de Metz

A mes parents, pour leur soutien sans faille, et leur confiance sans limite...

A Régis, pour son aide précieuse et généreuse...

REMERCIEMENTS

Je tiens en premier lieu à remercier Monsieur le Professeur Jean-François Férard qui m'a accordé sa confiance pendant ces quelques années et qui a su me transmettre, avec son sens du perfectionnisme, ses vastes connaissances dans le domaine de la recherche.

J'exprime mes remerciements les plus sincères à Monsieur le Professeur Benoît Rether qui m'honore de sa présence comme rapporteur de ce travail. Qu'il soit remercié pour l'intérêt qu'il porte à nos travaux et pour sa gentillesse légendaire.

J'adresse à Monsieur Alain Devaux, toute ma gratitude pour avoir accepté de faire partie de ce jury en qualité de rapporteur, et de m'avoir fait partagé sa grande expérience dans le domaine des « comètes » avec beaucoup de générosité et de passion.

Mes plus respectueux remerciements sont adressés à Madame le Professeur Paule Vasseur pour avoir accepté d'être membre de ce jury. Ses conseils et critiques me seront très précieux.

Je suis très reconnaissante envers Monsieur Denis Savanne, et l'ADEME qu'il représente, d'une part pour le soutien financier de ces études et d'autre part pour m'avoir intégrée dans un groupe de recherches. Cette expérience fut très enrichissante tant au point de vue scientifique qu'au niveau humain. Je pense tout particulièrement à Corinne, Antonio et Chrystile, etc...

Toute ma gratitude est adressée aux personnes qui m'ont accueillie dans leur laboratoire pour me transmettre leur savoir-faire avec toujours beaucoup de sympathie. J'ai une pensée très chaleureuse pour Monsieur le Professeur Te-Hsiu Ma de l'Université de l'Illinois et Peggy, mais aussi pour Monsieur Siegfried Knasmüller et ses collègues de l'Université de Vienne, Monsieur Luc Verschaeve et Gudrun du VITO, Belgique. Je garde d'excellents souvenirs des moments passés en leur compagnie. J'associe à mes remerciements Monsieur Armand Maul qui a toujours trouvé une solution à mes problèmes de statistiques.

Je souhaite enfin remercier très affectueusement toutes les personnes des Récollets qui m'ont fait vivre cette période de façon si agréable. J'ai une pensée toute particulière à l'égard d'Anne-Marie et de Claudine pour leurs qualités humaines et leurs compétences. Je remercie très amicalement Isabelle qui m'a aidée à mettre en place le test des comètes, mais aussi Jean-François Masfaraud pour ses conseils avisés, et toutes les personnes qui sont davantage des amis très fidèles que des collègues et sans qui ces années n'auraient pas eu la même saveur...

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
INTRODUCTION.....	2

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. ETAT DE L'ART DES TESTS DE (GENO)TOXICITE SUR VEGETAUX SUPERIEURS	7
I.1. TESTS DE TOXICITE.....	7
I.2. TESTS DE GENOTOXICITE.....	9
I.3. LA COTATION	9
II. LES TESTS DE GENOTOXICITE SUR VEGETAUX SUPERIEURS	12
II.1. AVANTAGES ET LIMITES	12
II.2. HISTORIQUE	14
III. LES CRITERES DE GENOTOXICITE.....	16
IV. PRESENTATION DES TESTS DE GENOTOXICITE SUR PLANTES.....	19
IV.1. <i>TRADESCANTIA</i>	19
IV.1.1. PRESENTATION GENERALE DE <i>TRADESCANTIA</i>	19
IV.1.2. CRITERES DE GENOTOXICITE DETERMINES SUR <i>TRADESCANTIA</i>	23
IV.1.3. CULTURE DES PLANTES.....	24
IV.1.4. LE TEST <i>TRADESCANTIA</i> -MUTATIONS (TRAD-SH).....	26
IV.1.4.1. Principe.....	26
IV.1.4.2. Modes d'exposition de <i>Tradescantia</i>	29
IV.1.4.3. Les substances chimiques.....	30
IV.1.4.4. Les sols contaminés.....	30
IV.1.4.5. La pollution aquatique.....	30
IV.1.4.6. La pollution atmosphérique	32
IV.1.4.7. Les radiations	33
IV.1.5. LE TEST <i>TRADESCANTIA</i> -MICRONOYAUX (TRAD-MCN)	35
IV.1.5.1. Principe.....	35
IV.1.5.2. Modes d'exposition de <i>Tradescantia</i>	36
IV.1.5.3. Les substances chimiques.....	37
IV.1.5.4. Les sols contaminés.....	39
IV.1.5.5. Les déchets	41
IV.1.5.6. La pollution aquatique.....	42
IV.1.5.7. La pollution atmosphérique	44
IV.1.5.8. Les radiations	47
IV.1.5.9. Automatisation du test <i>Tradescantia</i> -micronoyaux	48
IV.2. <i>VICIA FABA</i>	50
IV.2.1. PRESENTATION GENERALE DE <i>VICIA FABA</i>	50
IV.2.2. CRITERES DE GENOTOXICITE DETERMINES SUR <i>VICIA FABA</i>	50
IV.2.3. LE TEST <i>VICIA</i> -MICRONOYAUX (<i>VICIA</i> -MCN).....	52
IV.2.3.1. Principe.....	52
IV.2.3.2. Modes d'exposition de <i>Vicia</i>	54
IV.2.3.3. Les substances chimiques.....	54
IV.2.3.4. Les sols contaminés.....	56
IV.2.3.5. Les déchets	58
IV.2.3.6. La pollution aquatique.....	58

IV.2.3.7. Les radiations	58
IV.3. ALLIUM CEPA	60
IV.3.1. PRESENTATION GENERALE D'ALLIUM	60
IV.3.2. LES CRITERES DE GENOTOXICITE DETERMINES SUR ALLIUM CEPA.....	60
IV.3.3. LE TEST ALLIUM-MICRONOYAUX (ALLIUM-MCN).....	62
IV.3.3.1. Principe.....	62
IV.3.3.2. Modes d'exposition d'Allium	62
IV.3.3.3. Les substances chimiques.....	63
IV.3.3.4. Les sols contaminés.....	63
IV.3.3.5. Les déchets	65
IV.3.3.6. La pollution aquatique.....	65
IV.3.3.7. Les radiations	66
IV.4. LE TEST DES COMETES	67
IV.4.1. Historique	67
IV.4.2. Application du test des comètes aux plantes (Tableau XIII).....	69
V. L'HYDRAZIDE MALEIQUE	73
VI. GENERALITES SUR LE MODE D'ACTION GENOTOXIQUE DES MICROPOLLUANTS CHEZ LES VEGETAUX.....	77

MATERIEL ET METHODES

I. PRESENTATION DES MATRICES A TESTER.....	83
I.1. PROGRAMME RELATIF AUX SOLS CONTAMINES.....	83
I.2. PROGRAMME RELATIF AUX BOUES DE STATION D'EPURATION (PROGRAMME VADETOX)	85
II. DESCRIPTIF DES DIFFERENTES EXPERIENCES.....	87
II. 1 PROGRAMME RELATIF AUX SOLS CONTAMINES.....	87
II.2. PROGRAMME RELATIF AUX BOUES DE STATION D'EPURATION.....	91
III. PRESENTATION DES TESTS	92
III.1. TESTS SUR <i>TRADESCANTIA</i>	92
III.1.1. TEST DES MUTATIONS	92
III.1.1.1. Références des produits et du matériel.....	92
III.1.1.2. Culture des plantes	92
III.1.1.3. Traitement des inflorescences.....	93
III.1.1.4. Examen des étamines.....	94
III.1.1.5. Analyse statistique	94
III.1.2. TEST DES MICRONOYAUX	96
III.1.2.1. Références des produits et du matériel et préparation des solutions.....	96
III.1.2.2. Culture des plantes	96
III.1.2.3. Traitement des inflorescences.....	97
III.1.2.4. Fixation et coloration des cellules de pollen	98
III.1.2.5. Préparation de lames permanentes	99
III.1.2.6. Examen des cellules de pollen	99
III.1.2.7. Analyse statistique	100
III.2. TESTS SUR <i>VICIA FABAE</i> ET <i>ALLIUM CEPA</i>	100
III.2.1 CONSERVATION DES GRAINES ET BULBES	100
III.2.2. PREPARATION DES ORGANISMES VEGETAUX	100
III.2.3. TEST DES MICRONOYAUX	102
III.2.3.1. Références des produits et du matériel et préparation des solutions.....	102
III.2.3.2. Traitement des graines et bulbes	104
III.2.3.3. Fixation et coloration des extrémités racinaires	105
III.2.3.4. Examen des cellules des extrémités racinaires	106
III.2.3.5. Analyse statistique	106

III.2.4. TEST DES COMETES.....	108
III.2.4.1. Références des produits et du matériel et préparation des solutions.....	¹ 108
III.2.4.2. Traitement des graines et bulbes	110
III.2.4.3. Isolement des noyaux.....	110
III.2.4.4. Préparation des lames	111
III.2.4.5. Lyse.....	112
III.2.4.6. Dénaturation et électrophorèse	112
III.2.4.7. Révélation de l'ADN.....	113
III.2.4.8. Examen des lames.....	113
III.2.4.9. Analyse statistique	114
III.2.5. TESTS DE TOXICITE	114
III.2.5.1. L'élongation racinaire.....	114
III.2.5.2. L'indice mitotique.....	115
III.2.5.2. Analyse statistique	115
III.3. TEST MUTATOX.....	115
III.3.1. Principe	115
III.3.2. Méthodologie.....	115
III.3.3. Interprétation des résultats.....	116

RESULTATS ET DISCUSSION

IERE PARTIE : LES SOLS CONTAMINES.....	121
I. TESTS SUR LIXIVIATS.....	121
I.1. TESTS SUR <i>TRADESCANTIA</i>	121
I.1.1. TEST DES MUTATIONS.....	121
I.1.1.1. Allure de la courbe concentration-réponse.....	121
I.1.1.2. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols.....	123
I.1.2. TEST DES MICRONOYAUX	124
I.1.2.1. Allure de la courbe concentration-réponse.....	124
I.1.2.2. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols.....	125
I.2. TESTS SUR <i>VICIA FABA</i> ET <i>ALLIUM CEPA</i>	126
I.2.1. TEST DES MICRONOYAUX	126
I.2.1.1. Allure de la courbe concentration-réponse.....	127
I.2.1.2. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols.....	128
I.2.2. TEST DES COMETES	132
I.2.2.1. Résultats des expériences préliminaires et discussion sur le protocole du test des comètes appliqué aux plantes.....	133
I.2.2.2. Sélection des paramètres.....	138
I.2.2.3. Allure de la courbe concentration-réponse.....	140
I.2.2.4. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols.....	140
I.2.3. DETERMINATION DE L'ELONGATION (OU CROISSANCE) RACINAIRE.....	144
I.2.3.1. Allure de la courbe concentration-réponse.....	144
I.2.3.2. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols.....	145
I.2.4. DETERMINATION DE L'INDICE MITOTIQUE.....	146
I.2.4.1. Allure de la courbe concentration-réponse.....	147
I.2.4.2. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols.....	147
I.3. COMPARAISON DES DIFFERENTS CRITERES UTILISES	149
II. AUTRES MODES D'EXPOSITION DE <i>VICIA</i> ET D'<i>ALLIUM</i>	153
II.1. LE TEST DES MICRONOYAUX	154
II.2. L'ELONGATION RACINAIRE.....	158
II.3. L'INDICE MITOTIQUE.....	160

III. RECAPITULATIF DES RESULTATS.....	162
III.1. RESULTATS DES TESTS REALISES SUR LE SOL SI.....	163
III.2. RESULTATS DES TESTS REALISES SUR LE SOL SII.....	164
III.3. RESULTATS DES TESTS REALISES SUR LE SOL SIII.....	165
III.4. RESULTATS DES TESTS REALISES SUR LE SOL SIV.....	166
III.5. COMMENTAIRES GENERAUX.....	167
2^{EME} PARTIE : LES BOUES DE STATION D'EPURATION.....	168
I. LA BOUE DE STATION D'EPURATION B1.....	168
II. LA BOUE DE STATION D'EPURATION B3.....	169
III. RECAPITULATIF DES RESULTATS.....	170
3EME PARTIE : DISCUSSION GENERALE ET CONCLUSIONS.....	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	178
ANNEXES.....	200

ABREVIATIONS

2,4-D : acide 2,4-dichlorophenoxy acétique
ADEME : Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie
ADN : acide désoxyribonucléique
AFNOR : Association Française de Normalisation
ASTM : American Society for Testing and Materials
Allium-MCN : test *Allium*-micronoyaux
As₂O₃ : trioxyde d'arsenic
BET : bromure d'éthidium
Ca(NO₃)₂·4H₂O : nitrate de calcium tétrahydraté
DMSO : dimethylsulfoxyde
ER : élongation racinaire
EROD : 7-ethoxyresorufin-O-deethylase
HAP : hydrocarbure aromatique polycyclique
HCl : acide chlorhydrique
HM : hydrazide maléique : 1,2-dihydropyridazine-3,6-dion
IM : indice mitotique
KCl : chlorure de potassium
KH₂PO₄ : phosphate de potassium
KNO₃ : nitrate de potassium
LMP : low melting point
LOEC : Lowest Observed Effect Concentration
mA : milliAmpère
MCN : micronoyaux
MgSO₄·7H₂O : sulfate de magnésium heptahydraté
N : normale
Na₂EDTA : acide éthylènedinitrilotétraacétique sel disodique dihydraté
Na₂HPO₄·2 H₂O : hydrogénéphosphate de di-sodium dihydraté
NaCl : chlorure de sodium
NaOH : hydroxyde de sodium (soude)
OCDE : Organisation de Coopération et de Développement Economique
PCB : polychlorobiphényles
PBS : phosphate-buffered salt solution
SOD : superoxyde dismutase
STEP : station d'épuration
Trad-MCN : test *Tradescantia*-micronoyaux
Trad-SH : test *Tradescantia*-mutations
Tris : Tris[hydroxyméthyl]aminométhane
Triton X-100 : t-Octylphenoxy polyéthoxyéthanol
V : volt
Vicia-MCN : test *Vicia*-micronoyaux

INTRODUCTION

Les matrices complexes solides telles que les sols et les déchets (industriels ou ménagers), peuvent contenir un nombre important de micropolluants. Ceux-ci ne sont pas toujours identifiés et sont parfois en très faible concentration, d'où la difficulté de les mettre en évidence par la seule analyse chimique. Pour ces raisons, il apparaît nécessaire de développer des bioessais qui intègrent les effets de ces polluants (individuels, synergiques ou antagonistes) et leur biodisponibilité, et qui permettent ainsi une évaluation globale de l'écotoxicité des matrices polluées (Lambolez et al., 1994). De même, l'efficacité des procédés de traitement des déchets et des techniques de dépollution des sols doit être contrôlée par des tests, du fait de la formation éventuelle de molécules plus mobiles mais aussi plus toxiques.

Les bioessais couramment utilisés en écotoxicologie et normalisés au niveau international, tels que le test plante, se sont avérés efficaces pour révéler la toxicité de ces matrices. Cependant, les critères utilisés dans ces tests sont souvent des critères généraux (germination, croissance). Or, des effets génotoxiques peuvent survenir à des doses sublétales, voire même à des concentrations de micropolluants extrêmement faibles ; une étude écotoxicologique pertinente devrait par conséquent intégrer des tests de génotoxicité. En effet, les agents génotoxiques ont le pouvoir d'altérer le génome des êtres vivants. C'est pourquoi il s'est développé, depuis quelques années, une réelle prise de conscience du risque génotoxique lié au rejet dans l'environnement de substances chimiques ou à la présence de matrices complexes polluées, et de nombreux tests de génotoxicité ont vu le jour. A titre d'exemple, la formation d'adduits à l'ADN a été très étudiée dans le domaine de la toxicologie aquatique (Segner et Braunbeck, 1998), mais elle a aussi fait l'objet d'un certain nombre d'études chez les plantes exposées aux matrices solides ou gazeuses (Rether et al., 1997).

Si des altérations génétiques nonlétales dans les cellules somatiques peuvent provoquer l'apparition d'effets néfastes au niveau de l'individu, le problème de la transmission des altérations du génome aux générations suivantes rejoint la problématique de l'évolution des espèces. Selon la théorie néo-darwinienne, celle-ci est le fruit de deux mécanismes distincts mais complémentaires : mutagénèse et sélection naturelle (Taddei et al., 1997). Selon ces auteurs, l'hypothèse, dite de la

vitesse de la Reine Rouge², suppose que le taux de mutations varie en fonction de l'environnement : minimal lorsque les conditions sont favorables, il augmenterait en cas d'inadaptation à l'environnement, par exemple lors de stress exercés soit par les autres organismes de l'écosystème soit par des modifications physico-chimiques du milieu.

Dans le cadre de la problématique que l'ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Paris) nous a confiée, à savoir la caractérisation écotoxicologique de sols contaminés d'une part et d'autre part de boues de station d'épuration (STEP) dans le cadre de leur valorisation agricole, il nous a semblé judicieux et représentatif d'étudier la phytotoxicité ainsi que la génotoxicité de ces matrices sur des plantes.

L'intérêt des tests sur plantes supérieures est d'abord et avant tout de constater les effets des agents sur les plantes, afin de protéger ces populations, d'assurer la pérennité de ces organismes et l'intégrité de la biodiversité végétale et des écosystèmes. Les plantes constituent un élément essentiel des chaînes trophiques. En outre, elles représentent également un outil formidable pour une meilleure compréhension des risques environnementaux auxquels la population humaine est exposée (Ma, 1995). En effet, les plantes présentent une structure chromosomique identique à celle des mammifères.

Diverses méthodes d'essai se doivent d'être comparées sur la base d'un nombre minimal d'échantillons communs. Il est donc important de générer un certain nombre de données permettant de mieux cerner les avantages et les inconvénients des diverses méthodes testées. Dans ce cadre, nous avons étudié les effets de différentes matrices complexes (4 sols et 2 boues de STEP). Ce travail qui a été effectué dans le laboratoire d'écotoxicologie et de toxicologie de l'environnement du Professeur Jean-François Férard (équipe E.B.S.E., Université de Metz) sera divisé en plusieurs parties.

Nous présenterons l'analyse bibliographique des tests de génotoxicité sur plantes que nous avons sélectionnés dans la première partie de ce rapport. Une deuxième partie de ce rapport sera consacrée à présenter le matériel et les méthodes. Enfin, les résultats que nous avons obtenus seront présentés et discutés dans le dernier chapitre.

² En hommage au personnage de Lewis Carroll qui court sans pour autant avancer car le paysage se déplace avec elle.

Analyse bibliographique

I. Etat de l'art des tests de (géo)toxicité sur végétaux supérieurs³

Afin de savoir quels étaient les tests de phytotoxicité utilisés au niveau international, nous avons réalisé un état de l'art relatif à l'utilisation des tests de toxicité et de génotoxicité sur végétaux supérieurs en collaboration avec l'Agence de l'Eau Rhin-Meuse, représentative du Comité Inter-Agences, et le Ministère de l'Environnement et de la Faune du Québec. Ce travail avait pour but de sélectionner, sur la base de différents critères, un certain nombre de tests de génotoxicité et de toxicité à mettre en œuvre pour l'évaluation éco(géo)toxicologique des sédiments. Néanmoins, les conclusions issues de cette réflexion restent applicables à d'autres problématiques (par exemple celle des déchets ou des sols contaminés).

Dans ce but, nous avons adressé un questionnaire à 523 personnes, soit 309 laboratoires ou institutions dans 34 pays différents. Nous avons obtenu un taux de réponse de 13 %, soit 41 laboratoires.

I.1. Tests de toxicité

Les résultats obtenus au cours de cette enquête internationale montrent qu'en ce qui concerne les tests de toxicité, 42 espèces végétales sont utilisées par les laboratoires, aussi bien des gymnospermes que des angiospermes (monocotylédones et dicotylédones). Cependant, certaines espèces végétales sont plus fréquemment mentionnées dans les questionnaires que d'autres. Le tableau I décrit le pourcentage de laboratoires utilisant les espèces végétales les plus fréquemment employées et permet de constater que celles-ci sont pour la plupart recommandées par certains organismes de normalisation (O.C.D.E., 1984 ; A.S.T.M., 1994 ; I.S.O., 1994).

Le critère de toxicité le plus utilisé est le critère de biomasse puisque 76% des laboratoires l'utilisent (Tableau II). La germination et l'élongation racinaire sont un peu moins employées que la biomasse, mais autant que les activités enzymatiques qui forment un groupe très diversifié : EROD (7-éthoxyrésorufine-O-dééthylase), peroxydases, superoxyde dismutase, catalase, etc... .

³ Ce travail a fait l'objet d'une communication dans le cadre du colloque " Ecotoxicology of Air Compartment " et d'une publication dans les actes du colloque (Cotelle et al., 1995).

Espèce végétale	Nom vernaculaire	Pourcentage de laboratoires utilisant l'espèce (n = 41)	Recommandée dans les normes ou lignes directrices		
			ISO	OCDE	ASTM
<i>Lemna minor</i>	lentille d'eau	17,1			
<i>Triticum aestivum</i>	blé	14,6	x	x	x
<i>Glycine max</i>	soja	12,2			x
<i>Hordeum vulgare</i>	orge	12,2	x		
<i>Raphanus sativus</i>	radis	9,7	x	x	x
<i>Allium cepa</i>	oignon	9,7			x
<i>Lactuca sativa</i>	laitue	7,3	x	x	x
<i>Avena sativa</i>	avoine	7,3	x	x	x
<i>Zea mays</i>	maïs	7,3			x
<i>Phaseolus vulgaris</i>	haricot	7,3			x
<i>Arabidopsis thaliana</i>	arabette de Thalius	4,9			
<i>Brassica rapa</i>	navet	4,9	x	x	x

Tableau I: Pourcentage de laboratoires utilisant les espèces végétales en phytotoxicité d'après les réponses du questionnaire.

Critères de toxicité	Pourcentage de laboratoires utilisant le critère (n = 41)
Biomasse	75,6
activités enzymatiques	36,6
germination	36,6
élongation racinaire	34,1
indice mitotique	12,2
émergence	7,3
échanges gazeux	7,3
concentration de la chlorophylle a	7,3
peroxydation lipidique	4,9

Tableau II : Pourcentage de laboratoires utilisant les critères de toxicité d'après les réponses du questionnaire.

I.2. Tests de génotoxicité

Les espèces végétales utilisées dans les tests de génotoxicité sont en nombre beaucoup plus restreint, 18 seulement. Les laboratoires contactés utilisent les gymnospermes, les angiospermes dicotylédones et monocotylédones en quantités à peu près égales. Les espèces les plus souvent mentionnées dans les questionnaires sont : *Allium cepa*, *Tradescantia* et *Vicia faba* (Tableau III). Certaines espèces végétales présentent l'avantage de pouvoir être utilisées à la fois dans des tests de toxicité et dans des tests de génotoxicité : c'est le cas des trois espèces citées ci-dessus, mais aussi de *Zea mays*, *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* et *Hordeum vulgare*. Ces deux dernières plantes peuvent être employées aussi bien dans des tests sur cultures cellulaires que dans des tests sur plante entière.

En matière de génotoxicité, les plantes permettent d'évaluer de nombreux critères ; les plus souvent mentionnés sont les mutations, la formation de micronoyaux et les aberrations chromosomiques (Tableau IV).

I.3. La cotation

A partir des réponses des 41 laboratoires, nous avons réalisé une fiche signalétique par test (Annexe A1), c'est-à-dire 157 fiches dont 110 pour les tests de phytotoxicité et 47 pour les tests de phytogénotoxicité. A l'aide des informations centralisées dans cette base de données, nous avons mis au point un système de cotation de façon à attribuer une note à chaque test (Annexe A2). Le principe de cette grille de cotation repose sur l'équilibre entre quatre grandes catégories de critères : la représentativité de l'espèce, la sensibilité, la fiabilité et le coût du test qui représentent chacune 23 % de la note finale. Une cinquième catégorie de critères s'ajoute aux précédentes pour 8 % de la note finale : il s'agit des contraintes du test. Enfin, les différentes méthodes d'essai ont été classées selon leur note finale.

La cotation des méthodes d'essai permet de distinguer trois grandes catégories de tests de phytotoxicité. Les tests expérimentaux sont en majorité notés entre 50 et 55 sur 100, les tests uniformisés (ayant fait l'objet d'au moins une publication) sont pour la plupart d'entre eux notés entre 55 et 60, et les tests normalisés (pour lesquels une norme est bien définie) sont en majorité notés entre 65 et 70. Toutefois, le classement des tests de phytotoxicité normalisés apparaît assez discriminant puisque les notes s'échelonnent entre 51 et 81 / 100.

Espèce végétale	Nom vernaculaire	Pourcentage de laboratoires utilisant l'espèce (n=41)
<i>Allium cepa</i>	oignon	19,5
<i>Tradescantia sp.</i>	misère	14,6
<i>Vicia faba</i>	fève	14,6
<i>Hordeum vulgare</i>	orge	7,3
<i>Picea abies</i>	épicéa	4,9
<i>Glycine max</i>	soja	4,9
<i>Triticum aestivum</i>	blé	2,4
<i>Arabidopsis thaliana</i>	arabette de Thalius	2,4
<i>Zea mays</i>	maïs	2,4

Tableau III: Pourcentage de laboratoires utilisant les espèces végétales en phytogénotoxicité d'après les réponses du questionnaire.

Critères de génotoxicité	Pourcentage de laboratoires utilisant le critère (n = 41)
mutations somatiques	29,3
formation de micronoyaux	24,4
aberrations chromosomiques	24,4
adduits à l'ADN	12,2
échange de chromatides sœurs	12,2
mutations gamétiques	7,3
c-mitoses	4,9
aneuploïdie, polyploïdie	2,4

Tableau IVIII : Pourcentage de laboratoires utilisant les critères de génotoxicité d'après les réponses du questionnaire.

Le tableau V montre que les trois tests qui arrivent en tête sont *Hordeum vulgare* (l'orge), *Triticum aestivum* (le blé) et *Lolium perenne* (le ray-grass). En revanche, *Panicum miliaceum* (le millet) est situé en fin de classement.

Espèce végétale	Note représentativité	Note sensibilité	Note fiabilité	Note coût	Note contraintes	NOTE FINALE
orge	9	7	11	11	3	81
blé	9	5	12	9	3	75
ray-grass	10	6	10	9	3	75
.....					
millet perlé	5	6	7	7	1	51

Tableau V : Classement d'une partie des tests de phytotoxicité normalisés selon leur cote finale

Pour la phytogénotoxicité, les notes varient entre 49 et 75/100 (Tableau VI). Ce classement, qui fait apparaître en tête *Hordeum vulgare* (l'orge), comme dans le classement des tests de phytotoxicité, et *Glycine max* (le soja) peut s'expliquer en partie par le fait que ce travail était basé sur une problématique particulière, à savoir la valorisation agricole de sédiments excavés. Il a donc fallu tenir compte de l'utilisation des espèces végétales en agriculture. Suivent ensuite *Vicia faba* (la fève), *Allium cepa* (l'oignon) et *Tradescantia* (la misère, une plante herbacée). Enfin, *Nicotiana plumbaginifolia* (le tabac) est situé en fin de classement.

Espèce végétale	Note représentativité	Note sensibilité	Note fiabilité	Note coût	Note contraintes	NOTE FINALE
orge	10	10	7	8	3	75
soja	8	8	7	12	2	72
fève	7	7	7	12	2	69
oignon	8	7	9	10	1	68
misère	7	6	9	10	2	67
.....					
tabac	7	6	4	6	2	49

Tableau VI : Classement d'une partie des tests de phytogénotoxicité selon leur cote finale

Nous nous sommes alors intéressés plus spécifiquement aux tests de génotoxicité sur végétaux supérieurs dont nous allons présenter quelques généralités dans le prochain paragraphe.

II. Les tests de génotoxicité sur végétaux supérieurs

Selon de nombreux auteurs, les tests de génotoxicité sur plantes devraient davantage être intégrés dans les études écotoxicologiques en complémentarité avec d'autres tests ou en tant que première étape de la détection de la génotoxicité potentielle des substances chimiques et des matrices complexes (Grant, 1994).

II.1. Avantages et limites

Les végétaux supérieurs représentent d'excellents candidats pour évaluer la toxicité en général et en particulier la génotoxicité de substances chimiques et de matrices complexes grâce à leurs nombreux avantages en terme de :

Représentativité :

- ◆ Les réponses des végétaux aux agents mutagènes/cancérogènes sont similaires à celles des animaux (Clive et Spector, 1978), ce qui peut être expliqué en partie par la similitude de la morphologie et du fonctionnement des chromosomes entre les systèmes végétaux et animaux, tous deux eucaryotes (Sparrow et al., 1972). Cependant, il existe tout de même des différences pharmacocinétiques et biochimiques majeures entre plantes et animaux qu'il ne faut pas négliger (Grant, 1994).
- ◆ Les deux systèmes de division des cellules sont présents chez les plantes : la mitose dans les cellules somatiques (racines, étamines, etc...) et la méiose dans les cellules germinales (cellules de pollen) (Grant, 1982a).
- ◆ L'un des grands avantages des plantes, qui se rapporte plus particulièrement à *Vicia* et à *Allium*, est leur disponibilité. En effet, les graines de fève et les bulbes d'oignon sont disponibles toute l'année et dans la majeure partie des pays (Grant, 1982b).

Faisabilité :

- ◆ Les tests sur végétaux supérieurs présentent un rapport coût-efficacité très satisfaisant puisqu'il suffit d'un microscope, et éventuellement de chambres de culture pour *Tradescantia*, pour réaliser ces tests (Grant et al., 1981).
- ◆ Les études peuvent être réalisées sur des cultures cellulaires, sur des plantes entières (avec système racinaire) ou encore sur une partie seulement des plantes (Laouedj, 1994). En effet, de nombreuses parties végétales peuvent être utilisées pour examiner les effets génotoxiques : les

feuilles, les racines, les bourgeons, les fleurs, etc... (Grant, 1993).

- ◆ Un grand nombre de plantes possèdent des chromosomes de grande taille, permettant des études cytologiques facilitées (Grant, 1982a).
- ◆ Les plantes sont adaptées pour les études *in situ* (Constantin et Owens, 1982).
- ◆ Les tests de génotoxicité sur plantes ont fait l'objet de nombreuses publications, en particulier dans le cadre des effets des substances chimiques (Grant, 1994).
- ◆ Les tests ne nécessitent pour la plupart aucun éclaircissement et sont par conséquent utiles pour tester les produits photosensibles. Ils ne requièrent pas non plus de suppléments nutritifs en grande quantité, ce qui évite l'interférence de ces produits avec les micropolluants (Wang, 1991).
- ◆ Aucune préparation des matrices à tester n'est nécessaire : pas de filtration, ni d'ajustement de pH, ce qui permet de tester les effluents, les lixiviats et même les sols directement dans leur état brut sans aucune modification.

Sensibilité :

- ◆ Les plantes permettent de détecter des critères de génotoxicité nombreux et variés : mutations, cassures de chromosomes, aberrations chromosomiques, échanges de chromatides sœurs, etc... (Grant, 1994), comme l'avait d'ailleurs montré l'enquête présentée au § I.2.
- ◆ Les principaux tests de phytogénotoxicité se sont avérés très sensibles tout en ayant une brève durée d'exposition (Nilan, 1978) comparés aux autres tests sur bactéries ou animaux, et présentent peu de "faux négatifs" et de "faux positifs" (Ennever et al., 1988).
- ◆ Les tissus végétaux constituent, pour la plupart, le siège de transformations métaboliques complexes capables d'activer les promutagènes, de la même façon que chez les animaux (Plewa et Wagner, 1993).

Certes, les plantes présentent aussi quelques inconvénients :

- ◆ Les plantes acquises dans le commerce peuvent être traitées avec des inhibiteurs de croissance qui peuvent être des agents génotoxiques (Grant, 1982b).
- ◆ Les plantes ont un cycle de vie plus long que les bactéries, les levures et les drosophiles (Grant, 1994).
- ◆ Les effets génotoxiques des agents testés dépendent étroitement du pH, de leur solubilité et de leur capacité à franchir la paroi pecto-cellulosique des cellules végétales (Fiskesjö, 1995).

II.2. Historique

A l'origine de l'utilisation des plantes dans l'évaluation des dommages de l'ADN, celles-ci ont principalement servi à l'étude de l'impact des radiations dès les années 30. Ces études ont abouti à un symposium intitulé "Effects of ionizing radiation on plants" en 1957. Toutefois, il faudra attendre 1978 pour assister à un colloque sur les effets des produits chimiques sur les plantes, intitulé "Higher plant systems as monitors of environmental mutagens" organisé par De Serres (Research Triangle Institute, USA) et financé par l'US National Institute of Environmental Health Sciences. Notons que, parallèlement au développement des tests de génotoxicité sur plantes, c'est à ce moment que le test d'Ames fut mis au point.

En 1979-1980, le programme GENE-TOX conduit par l'U.S. Environmental Protection Agency a recensé une trentaine de bioessais utilisant des animaux, des plantes et des bactéries pour la détection de la génotoxicité. Neuf tests de génotoxicité impliquaient des plantes et se sont avérés sensibles. Les données obtenues sur divers composés chimiques avec chacun de ces tests ont été rassemblées dans une publication de Constantin et Owens (1982).

Il s'agissait de tests de cytogénicité :

- *Allium cepa*-aberrations chromosomiques (Grant, 1982)
- *Hordeum vulgare*-aberrations chromosomiques (Constantin et Nilan, 1982)
- *Tradescantia*-micronoyaux (Ma, 1982a)
- *Vicia faba*-aberrations chromosomiques (Ma, 1982b)

et de tests de mutagénicité :

- *Arabidopsis thaliana* (Rédei, 1982)
- *Glycine max* (Vig, 1982)
- *Hordeum vulgare* (Constantin et Nilan, 1982b)
- *Tradescantia* (Van't Hof et Schairer, 1982)
- *Zea mays* (Plewa, 1982)

Un congrès ("Pollen systems to detect biological activity of environmental pollutants") fut ensuite organisé par l'US National Institute of Environmental Health Sciences et l'US Environmental Protection Agency en 1981. A cette occasion, le test *Tradescantia*-micronoyaux a été présenté et décrit en détail.

Par la suite, une étude financée par l'Organisation Mondiale de la Santé et le programme pour l'environnement des Nations Unies a été mise en place à partir de 1984, intitulée " International

Program on Chemical Safety Collaborative Study on Plant Systems ”. Cette étude avait pour objet de comparer et de calibrer à l’aide de 4 produits chimiques (hydrazide maléique, azoture de sodium, méthyl-nitrosourée et azidoglycérol) plusieurs tests de génotoxicité utilisant des modèles végétaux et d’évaluer leur variabilité inter- et intra-laboratoire (Sandhu et al., 1991). Les essais choisis étaient les suivants :

- *Tradescantia*-micronoyaux (Ma et al., 1994a)
- *Tradescantia*-mutations (Ma et al., 1994b)
- *Arabidopsis*-mutations (Gichner et al., 1994)
- *Vicia*-aberrations chromosomiques (Kanaya et al., 1994)

Les résultats de ce programme (impliquant 11 laboratoires de pays différents), qui a abouti à un meeting à St-Petersbourg, Russie, en 1992 ont été publiés dans *Mutation Research* en 1994.

Enfin, un programme international sur les tests sur plantes (IPPB) a été initié en 1994, dont le principal objectif était de réunir le plus grand nombre de personnes possible travaillant sur les tests *Vicia*, *Allium* (micronoyaux et aberrations chromosomiques) et *Tradescantia* (micronoyaux et mutations). Un atelier pratique, dénommé “Hands-on Workshop on Plant Bioassays” a été organisé à Qingdao, République Populaire de Chine, en 1995. Cet atelier, auquel nous avons participé, était financé par le programme pour l’environnement des Nations Unies et a permis d’homogénéiser le protocole de chacun des tests et de valider leur applicabilité à l’étude de la génotoxicité des sols contaminés. Les résultats devraient être prochainement publiés dans *Mutation Research*.

L’enquête que nous avons réalisée en 1994/95 et l’historique de ces tests expliquent notre choix puisque nous avons sélectionné les trois espèces suivantes : *Vicia faba* (la fève), *Allium cepa* (l’oignon) et *Tradescantia* (la misère) pour évaluer leur efficacité dans la détection du potentiel génotoxique de matrices complexes. Mais avant de présenter ces trois plantes et leurs applications, il nous a semblé indispensable de consacrer un paragraphe aux principaux critères de génotoxicité que nous citerons dans cette analyse bibliographique.

III. Les critères de génotoxicité

Le premier critère de génotoxicité à avoir été analysé est la fréquence d'aberrations chromosomiques dans les années 1930. Ce critère est encore utilisé aujourd'hui mais est quelque peu délaissé au profit de la fréquence d'apparition de micronoyaux. Il existe différents types d'aberrations chromosomiques : ponts (chromosome(s) qui ne migre(nt) pas correctement lors de l'anaphase), fragments, anaphases multipolaires, c-mitose (les agents c-mitotiques ou colchicomitotiques induisent un effet similaire à celui induit par la colchicine, c'est-à-dire la non-construction du fuseau mitotique, ce qui a pour conséquence de disperser les chromosomes en c-métaphase), etc... Les aberrations chromosomiques sont comptées dans les cellules en mitose et peuvent être détectées lors des différents stades : la métaphase, l'anaphase ou la télophase.

L'utilisation du critère "micronoyaux" comme critère d'effets cytogénétiques a débuté dans les années 1940 mais a surtout été développée dans les années 1970 sur de nombreux organismes (Godet et al., 1993) : les plantes comme *Tradescantia*, *V. faba*, *A. cepa*, mais aussi *Hordeum vulgare* (Guérin, 1999), les mollusques (Mersch et Beauvais, 1997), les poissons (De Flora et al., 1993), les amphibiens (Békaert et al., 1998), les souris (dans les érythrocytes polychromatiques), l'homme (dans les lymphocytes), etc... .

Rieger et al. (1968) dans leur "Glossary of Genetics and Cytogenetics" définissent un micronoyau comme étant : "un petit noyau surnuméraire et séparé du noyau principal de la cellule, formé pendant la télophase mitotique ou méiotique et constitué de chromosomes entiers ou de fragments acentriques d'ADN résultant de modifications structurales, spontanées ou expérimentales, des chromosomes".

Les micronoyaux sont visibles dans le cytoplasme des cellules, et résultent d'une cassure chromosomique (effet de substances clastogènes ou chromatoclastiques) ou d'un dysfonctionnement du fuseau mitotique (effet de poisons fusoriaux, appelés aussi substances aneugènes ou mitoclastiques). Dans les deux cas, les fragments de chromosomes ou les chromosomes entiers ne peuvent pas migrer à l'un des pôles du fuseau lors de l'anaphase de la division et forment donc un ou plusieurs micronoyaux visibles pendant l'interphase (Figure 1). Les substances clastogènes induisent principalement des modifications intra-chromosomiques qualitatives (mutations, etc...) et les poisons fusoriaux des modifications inter-chromosomiques

quantitatives (aneuploïdie). La seule observation des micronoyaux ne permet pas de déterminer leur cause. Des techniques ont donc été mises au point, comme par exemple la “fluorescence in situ hybridization” (FISH) qui consiste à hybrider l’ADN avec des sondes fluorescentes spécifiques des centromères (Kirsch-Volders et al., 1997).

Les produits clastogènes peuvent être classés en composés :

- * radiomimétiques, indépendants de la phase S du cycle cellulaire, c’est-à-dire que le mode d’action est similaire à celui des radiations ionisantes. Quel que soit le stade du cycle cellulaire lors de l’exposition, des micronoyaux peuvent être visibles à l’interphase. C’est par exemple le cas de l’hydrazide maléique.
- * non radiomimétiques (S-dépendants) : après l’exposition, une phase S complète doit se dérouler pour que les effets soient visibles ultérieurement (e.g.: mitomycine C, méthyl méthanesulfonate) (Marzin, 1998).

Le critère “micronoyaux” présente un certain nombre d’avantages (Heddle et al., 1983) :

- ◆ Les micronoyaux sont observés dans les cellules en interphase, ce qui représente le stade du cycle cellulaire le plus long. Le nombre de cellules examinables est par conséquent plus important que pour les aberrations chromosomiques, d’où un gain de temps considérable.
- ◆ Les micronoyaux sont plus faciles à identifier que les aberrations chromosomiques.
- ◆ Le taux de micronoyaux spontanés est très faible et présente une bonne reproductibilité.
- ◆ Les micronoyaux persistent au moins pendant deux cycles cellulaires.

Cependant, contrairement aux aberrations chromosomiques, pour que les micronoyaux soient visibles dans les cellules, il faut que la division cellulaire ne soit pas altérée par le produit testé car sinon les effets cytotoxiques peuvent “masquer” les effets génotoxiques.

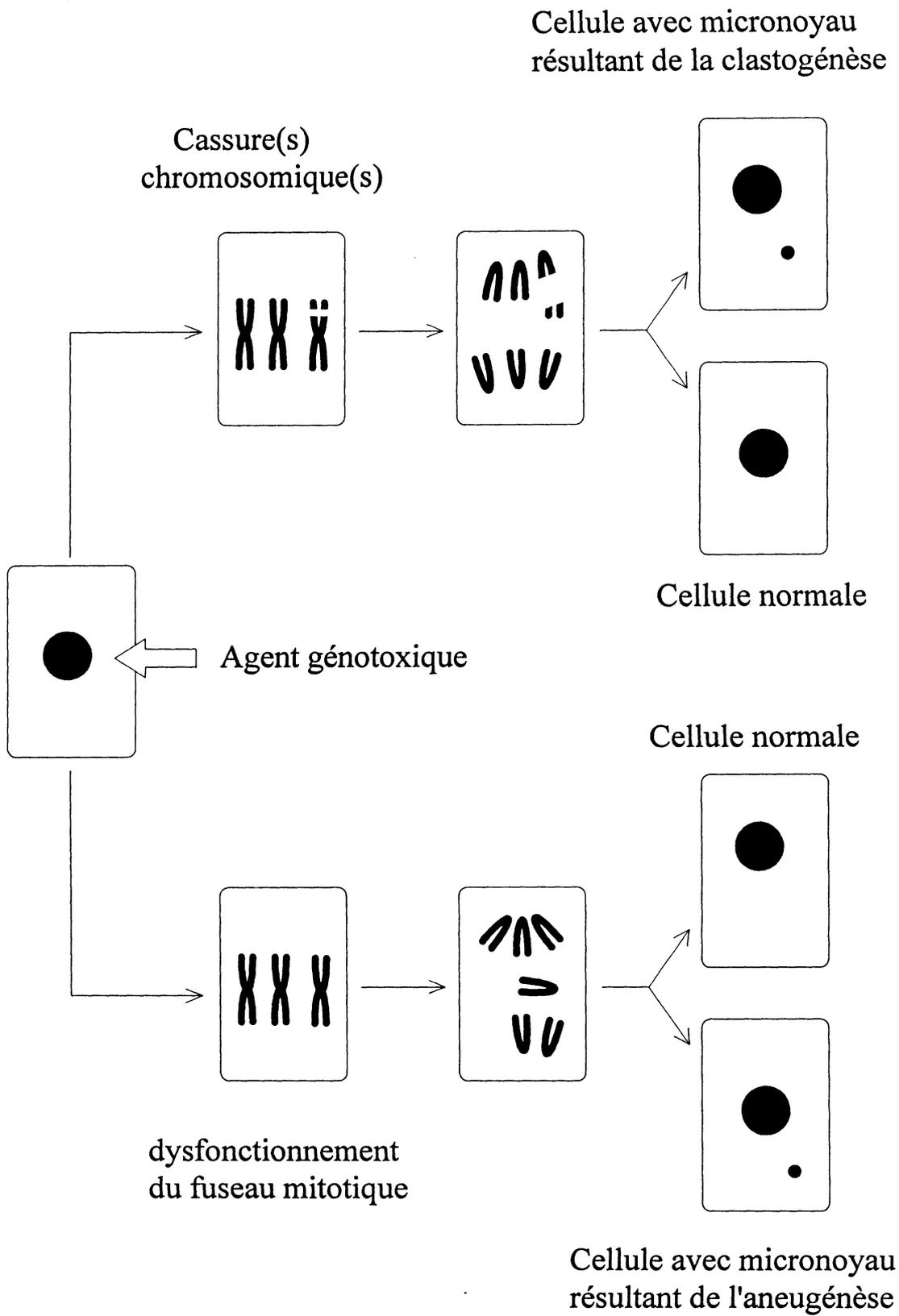


Figure 1 Schema de la formation des micronoyaux d'après Fenech (1997)

IV. Présentation des tests de génotoxicité sur plantes

Trois plantes ont été sélectionnées pour notre étude : *Tradescantia*, l'éphémère, *Vicia faba*, la fève et *Allium cepa*, l'oignon. Après exposition de ces plantes à des substances chimiques et à des matrices complexes, les parties florales de *Tradescantia* permettent d'évaluer l'apparition de dommages de l'ADN, et les racines de *Vicia faba* et d'*Allium cepa* servent d'outils biologiques pour appliquer le test des micronoyaux et le test des comètes.

Nous allons maintenant présenter les trois plantes choisies et détailler différentes applications des tests de génotoxicité correspondants. Le Tableau VII présente la classification, les caractéristiques et les critères de toxicité et de génotoxicité pouvant être déterminés sur ces trois plantes.

IV.1. *Tradescantia*

IV.1.1. Présentation générale de *Tradescantia*

Tradescantia L. fut nommé ainsi en l'honneur du jardinier royal de Charles I d'Angleterre, John Tradescant, qui l'a importée des Etats-Unis en Angleterre au XVIIème siècle. Malgré un nom vernaculaire peu élégant (misère en français, spiderwort en anglais), cette plante herbacée de la famille des commélinidées devint rapidement une plante populaire d'appartement ou de jardin (en particulier *Tradescantia fluminensis*), appréciée pour ses petites fleurs abondantes durant tout l'été. Elle est également nommée « l'éphémère » en raison de la courte durée de vie de ses fleurs : celles-ci fanent au bout d'une journée. On la retrouve aujourd'hui un peu partout dans le monde et pas seulement sur le continent américain, d'où elle est originaire.

De façon anecdotique, elle a même voyagé dans l'espace puisque dans les années 60, elle a été choisie par la NASA pour détecter les effets de l'apesanteur et des radiations cosmiques sur les chromosomes. Les naturalistes ont dénombré une soixantaine d'espèces qui donnent des fleurs blanches, violettes, roses ou bleues et des feuilles de formes différentes selon les cas.

	<i>Tradescantia</i>	<i>Vicia faba</i>	<i>Allium cepa</i>
classification	classe des monocotylédones ordre des liliiflores famille des commélinacées (ou commélinidées)	classe des dicotylédones ordre des fabales famille des légumineuses (ou papilionacées)	classe des monocotylédones ordre des liliiflores famille des alliacées (ou liliacées)
nombre de chromosomes	2n = 12	2n = 12	2n = 16
critères de toxicité	<ul style="list-style-type: none"> - nombre de bourgeons par inflorescence (Green <u>et al.</u>, 1996) - émission de fluorescence des feuilles (Lower <u>et al.</u>, 1985) - activité photosynthétique (Schaeffer <u>et al.</u>, 1987) - concentration de la chlorophylle dans les feuilles (Green <u>et al.</u>, 1996) - germination du pollen, élongation du tube pollinique (He <u>et al.</u>, 1995) - production de fleurs et fertilité du pollen (Schaeffer <u>et al.</u>, 1987) 	<ul style="list-style-type: none"> - croissance de la racine primaire (De Marco <u>et al.</u>, 1990) et des racines secondaires (Cotelle <u>et al.</u>, 1996) - indice mitotique (Scott, 1968) - biomasse (Malallah <u>et al.</u>, 1996) - germination, hauteur de la plante, surface foliaire, nombre de ramifications (Singh <u>et al.</u>, 1996) - taux de chlorophylle et de protéines dans les feuilles (Singh <u>et al.</u>, 1992) - mesure de la fluorescence de la chlorophylle (Vidal <u>et al.</u>, 1995) - taux de pigments, d'acides aminés, de sucres et d'acides gras (Malallah <u>et al.</u>, 1996) - activités des enzymes du stress oxydant dans les feuilles et les racines (Radetski, 1996) 	<ul style="list-style-type: none"> - élongation racinaire (Fiskesjö, 1993a) - indice mitotique (Fiskesjö, 1985) - germination (Meier <u>et al.</u>, 1997)
critères de génotoxicité	<ul style="list-style-type: none"> - micronoyaux dans les cellules mères de pollen (Ma <u>et al.</u>, 1978) - mutations dans les étamines (Underbrink <u>et al.</u>, 1973) - aberrations chromosomiques dans les cellules des extrémités racinaires (Ahmed et Grant, 1972a), des tubes polliniques (Smith et Lofty, 1954) et des microspores (Ma et Wolff, 1965) - échanges de chromatides sœurs dans les extrémités racinaires (Grant et Goldstein, 1983) 	<ul style="list-style-type: none"> - micronoyaux dans les extrémités racinaires (Arora <u>et al.</u>, 1969) et dans les feuilles (Guangrong <u>et al.</u>, 1990) - aberrations chromosomiques dans les extrémités racinaires (Kanaya <u>et al.</u>, 1994) et dans les cellules de pollen (Amer et Ali, 1974) - polyploïdie dans les racines (De Kergommeaux <u>et al.</u>, 1983) - échanges de chromatides sœurs dans les racines (Kihlman et Sturelid, 1978) - volume nucléaire, longueur des chromosomes, largeur des chromatides, volume chromosomique (Singh <u>et al.</u>, 1996) - test des comètes (Koppen et Verschaeve, 1996) 	<ul style="list-style-type: none"> - micronoyaux dans les extrémités racinaires (De Marco <u>et al.</u>, 1986) - aberrations chromosomiques dans les extrémités racinaires (Grant, 1982a) - échanges de chromatides sœurs dans les racines (Cortes <u>et al.</u>, 1985) - test des comètes (Navarrete <u>et al.</u>, 1997)

Tableau VII: Classification, caractéristiques et critères pouvant être déterminés sur *Tradescantia*, *Vicia faba* et *Allium cepa*.

Différentes espèces (telles que *T. paludosa*, *T. reflexa*, etc...) et de nombreux clones peuvent être utilisés dans les tests de génotoxicité et portent le nom de leur "lieu de naissance" : BNL pour Brookhaven National Laboratory, USA (ex. BNL 02), et KU pour Kyoto University, Japon (ex. KU 9 et KU 27) mais c'est le clone BNL 4430 (ou simplement 4430) qui est le plus couramment utilisé dans le monde car l'un des plus sensibles, surtout vis-à-vis des agents chimiques.

Le clone 4430 de *Tradescantia* ($2n = 12$) a été conçu par hybridation entre *Tradescantia hirsutiflora* Bush et *Tradescantia subcaulis* Bush, ce qui lui confère l'avantage d'être génétiquement stable, mais présente l'inconvénient de ne pouvoir se reproduire. Ce clone a la particularité d'être hétérozygote pour le gène codant les pigments des fleurs (pétales et poils staminaux). Les allèles bleu (dominant) et rose (récessif) sont hérités du croisement entre une espèce à fleurs bleues et une espèce à fleurs roses et l'hybride ainsi obtenu porte évidemment des fleurs bleues (Figure 2 et 3). Les inflorescences comportent une vingtaine de bourgeons à différents stades de développement et donnent naissance à une ou deux fleurs par jour.



Figure 2 : Inflorescence de *Tradescantia*



Figure 3 : Fleur de *Tradescantia*

Ces fleurs éphémères, comme le nom de cette plante l'indique, portent 6 étamines (Figure 4), chacune étant composée d'une anthère renfermant les grains de pollen et d'un filament portant en moyenne 53 poils staminaux. Chaque poil staminal est une chaîne d'environ 24 cellules résultant de divisions successives des cellules terminales. Les cellules subterminales se divisent aussi mais seulement au début de la formation des poils staminaux (Mericle et Hazard, 1980).



Figure 4 : étamine de *Tradescantia*

Tradescantia apparaît comme étant une plante très polyvalente car de nombreux critères de génotoxicité, mais aussi de toxicité classique, peuvent être déterminés sur ses organes floraux, ses feuilles et ses racines (Tableau VII). En outre, la bibliographie que nous allons présenter montre que cette plante peut être utilisée *in situ* ou au laboratoire pour mettre en évidence les effets génotoxiques de divers types de radiations, mais aussi des polluants présents dans tous les milieux : sol, eau et air (Rodrigues et al., 1997).

IV.1.2. Critères de génotoxicité déterminés sur *Tradescantia*

Le matériel génétique de *Tradescantia* a fait l'objet de nombreuses études, et ce, depuis très longtemps. En effet, Sax a étudié les effets des rayons X sur les microspores de pollen de *Tradescantia reflexa* dès 1938 et en particulier la formation d'aberrations chromosomiques. Il notait déjà à cette époque que les cellules en division méiotique étaient plus sensibles que celles en division mitotique. D'autres expérimentations ont ensuite été publiées sur l'induction d'aberrations chromosomiques dans les microspores de *Tradescantia paludosa* exposé aux rayons X (Ma et Wolff, 1965) et dans les tubes polliniques de cette même espèce après traitement aux rayons X (Ma, 1967) et aux rayons UV (Ma et al., 1971).

La première observation de micronoyaux chez *Tradescantia paludosa* est mentionnée dans un article de Steinitz de 1944, mais il faudra attendre plus de 30 ans pour que Ma, de l'Université de Macomb, Illinois, aille en visite au Laboratoire National de Brookhaven, New-York. A ce moment même, Sparrow (qui avait entrepris d'importantes études sur l'impact des radiations sur les plantes depuis les années 50, et en particulier sur *Tradescantia*) décéda. Le Professeur Te-Hsiu Ma reprit donc les travaux de ce dernier et abandonna ses propres projets relatifs au test sur les tubes polliniques pour se consacrer au test *Tradescantia*-micronoyaux (baptisé Trad-MCN) qui fit l'objet d'une première publication deux ans plus tard (Ma et al., 1978).

Les aberrations chromosomiques ont, par la suite, été étudiées dans les tubes polliniques de *Tradescantia paludosa* après exposition de cette plante à des agents chimiques tels que l'oxyde d'éthylène (Smith et Lofty, 1954) ou le dioxyde de soufre (Ma et al., 1973 ; Ma et Khan, 1976). Ce critère a également été évalué dans les racines de *Tradescantia* (Ahmed et Grant, 1972a ; Ahmed et Grant, 1972b ; Ma et Grant, 1982 ; Xiao et Ichikawa, 1997).

D'autre part, un autre critère de génotoxicité a fait l'objet de publications, il s'agit des échanges de chromatides sœurs dans les racines de *Tradescantia* (Grant et Goldstein, 1983 ; Peng et Ma, 1990).

Ces critères ont été plus ou moins abandonnés avec le temps au profit d'autres critères plus adaptés à l'étude des effets génotoxiques de substances chimiques. En effet, deux autres critères de génotoxicité, à savoir l'apparition de mutations et la formation de micronoyaux, se sont avérés être plus pertinents de par leur plus grande rapidité et leur abondante utilisation à travers le monde.

La première observation de micronoyaux dans les cellules de pollen de *Tradescantia paludosa* est mentionnée dans un article de Steinitz de 1944, mais il faudra attendre plus de 30 ans pour que le test *Tradescantia*-micronoyaux (baptisé Trad-MCN) fasse l'objet d'une première publication par l'équipe du Laboratoire National de Brookhaven, New-York (Ma et al., 1978).

Le même laboratoire a également vu naître le test *Tradescantia*-mutations (Trad-SH). En effet, les clones 02 et 4430 de *Tradescantia* ont été conçus au début des années 60 par le Dr. A.H. Sparrow et al. afin d'étudier les effets des radiations, en particulier les rayons X, sur les cellules végétales (Sparrow et al., 1972). L'hybride 02 a par la suite été accidentellement exposé à des vapeurs de produits chimiques et s'est avéré aussi sensible aux agents chimiques qu'aux radiations. En effet, un certain nombre de produits chimiques ont été utilisés sous des hottes par des biochimistes dans un laboratoire voisin et ont été soupçonnés d'avoir contaminé les serres de culture (Sparrow et Schairer, 1971). Cette "malheureuse" expérience a attiré l'attention du groupe de recherches sur la capacité de *Tradescantia* à détecter les effets mutagènes de substances chimiques . Le protocole du test a par la suite été défini par cette équipe (Underbrink et al., 1973).

IV.1.3. Culture des plantes

Il est important d'entretenir la culture de *Tradescantia* dans des conditions saines car cette plante est extrêmement sensible à de nombreux agents physiques ou chimiques, et la fréquence de mutations ou de micronoyaux spontanés doit être la plus faible possible.

Les plantes doivent être repotées très souvent de façon à obtenir des organismes végétaux jeunes, et ce, par bouturage ou par division du système racinaire puisqu'il s'agit d'un hybride. Ichikawa et al. (1996a) ont démontré avec le clone BNL 02 que, lorsque les plantes devenaient

âgées, le nombre de cellules par poil staminal et surtout le nombre de poils staminaux par étamine diminuaient. Cependant, l'âge des inflorescences n'influe pas sur la fréquence des mutations spontanées dans cette étude, contrairement à la température des chambres de culture : celle-ci doit de préférence être élevée (23°C en moyenne) et la différence de température entre le jour et la nuit doit être relativement faible pour réduire la fréquence des mutations spontanées. Ceci a été confirmé dans une étude réalisée dans le même laboratoire (Ichikawa et al., 1996b).

D'autre part, des plants de *Tradescantia* portant des racines ont été placés dans une solution nutritive (solution Hyponex) et comparés avec d'autres plants maintenus dans de la terre. Tous les critères se sont révélés similaires dans les deux cas : production et taille des fleurs, croissance des poils staminaux et nombre de mutations induites par les rayons X ou par le méthyl méthanesulfonate. Cette méthode de culture s'avère intéressante dans la mesure où elle apporte un gain de place. Par ailleurs, les risques de contamination de la terre par des produits ou par des insectes sont éliminés en choisissant la solution nutritive (Ichikawa et al., 1995). Ceci a été confirmé avec le clone 4430 dans une étude pour laquelle les auteurs ont comparé les deux méthodes de culture pendant quatre ans : les plantes avec racines étaient cultivées soit en pot dans de la terre, soit dans des récipients contenant la solution Hyponex. La production de fleurs était comparable dans les deux cas, la fréquence de mutations spontanées et la croissance des poils staminaux étaient plus satisfaisantes et présentaient de moindres variations dans le cas de la culture hydroponique. Cette alternative paraît aux auteurs plus efficace et moins coûteuse que la culture en terre (Shima et al., 1997).

Enfin, la qualité des cultures de *Tradescantia* est étroitement liée à celle des sols utilisés, de l'eau d'arrosage, des produits phytosanitaires employés et de l'environnement atmosphérique qui ne doivent pas induire d'effets génotoxiques. L'apport d'oligo-éléments est également important pour obtenir des cultures saines avec des taux de micronoyaux spontanés les plus faibles possible. En effet, Steffensen (1955) a montré que dans des conditions de culture déficientes en calcium, qui se lie aux nucléoprotéines et assure ainsi la stabilité du génome, un nombre important de micronoyaux apparaissait dans les anthères de *Tradescantia*, clone 5.

Nous allons maintenant détailler le principe et l'application des tests *Tradescantia*-mutations et micronoyaux aux substances chimiques et aux matrices contaminées (sol, eau, air).

IV.1.4. Le test *Tradescantia*-mutations (Trad-SH)

IV.1.4.1. Principe

Le principe de ce test est d'exposer un hybride hétérozygote à des agents mutagènes, et d'observer une modification induite par la mutation qui révèle alors le phénotype récessif. Les mutations sont observées dans les étamines, et plus particulièrement au niveau des poils staminaux.

De nombreux clones ont été utilisés pour ce test, mais c'est le clone BNL 4430 qui est le plus couramment sélectionné pour les études de mutagenèse de par notamment sa sensibilité. En effet, ce dernier présente une sensibilité au méthyl méthanesulfonate qui est 14 fois plus forte que celle du clone BNL 02 (Ichikawa, 1992), et 2 fois plus grande que celle du clone KU 27 (Ichikawa et al., 1993). Par rapport au clone BNL 02, il s'avère 7 fois plus sensible à l'éthyl méthanesulfonate (Nauman et Grant, 1982) et 6 fois plus sensible au 1,2-dibromoéthane (Sparrow et al., 1974). Cependant, vis-à-vis des radiations ionisantes, les clones 4430 et 02 présentent la même sensibilité (Nauman et Grant, 1982).

Tradescantia clone 4430 est un hybride interspécifique qui est hétérozygote pour les allèles bleu/rose dans tous les organes floraux, y compris les poils staminaux (stamen hair en anglais, d'où l'abréviation Trad-SH) que nous observons plus particulièrement dans ce test. Cet hybride, généralement utilisé, résulte du croisement de *Tradescantia hirsutiflora* (parties florales bleues) et *Tradescantia subcaulis* (parties florales roses) avec un phénotype dominant bleu. Après exposition des inflorescences de cette plante à une substance mutagène ou à des radiations, une (ou plusieurs) mutation(s) somatique(s) peut(vent) se produire et avoir pour conséquence un changement de couleur des cellules staminales qui deviennent alors roses (Figure 5).

Après le traitement des bourgeons, qui peut durer de quelques heures à quelques jours, les inflorescences sont transférées dans une solution nutritive (telle que le milieu de Hoagland, Hoagland et Arnon, 1950) pendant une période de 7 à 20 jours nécessaire à l'éclosion des fleurs. Il s'agit ensuite de compter le nombre de mutations roses dans les poils staminaux. Notons qu'il peut se produire des mutations qui aboutissent à des cellules sans couleur dans les poils staminaux (Sparrow et al., 1974 ; Schairer, 1979). Les mutations peuvent aussi être observées sur les pétales sous forme de spots roses dans certains clones (Tomkins et Grant, 1972 ; Sanda-Kamigawara et al., 1995).

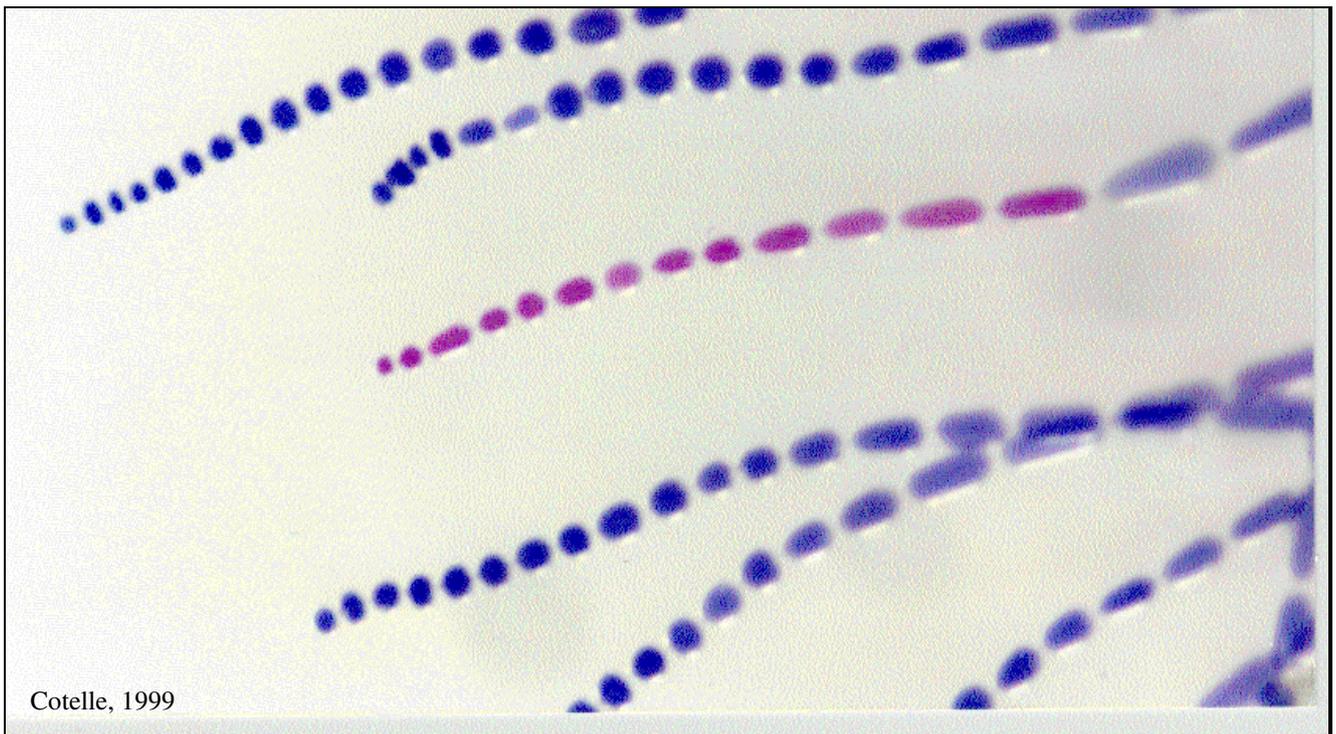


Figure 5 : cellules normales (de couleur bleue) et cellules mutées (de couleur rose)
des poils staminaux de *Tradescantia*

Le(s) gène(s) codant les pigments impliqués dans ce test ne sont pas encore identifiés à notre connaissance. Par contre, les pigments impliqués dans les changements de couleur des cellules staminales de quatre clones différents (BNL 02, KU 9, KU 20 et KU 27) ont été étudiés par spectrophotométrie : les courbes d'absorption de la lumière étaient pratiquement identiques pour les quatre clones. Pour les cellules bleues normales, les pics d'absorption sont situés à 544, 574 (pic maximal) et 618 nm. Pour les cellules roses mutées, un premier pic a été trouvé à 512 nm, et deux pics plus importants à 546 et 586 nm (Sanda-Kamigawara et Ichikawa, 1993).

Lors de la mesure de la fréquence de mutations, il s'agit de compter le nombre de poils staminaux observés et le nombre de mutations trouvées afin d'exprimer les résultats en nombre de mutations pour 1000 poils staminaux. Or, Ichikawa et Ishii (1991a) ont montré qu'il n'était pas nécessaire de compter les poils staminaux sur chacune des 6 étamines, mais uniquement les poils

staminaux de deux étamines diamétralement opposées, ce qui apporte un gain de temps considérable.

La fréquence de mutations spontanées est généralement comprise entre 0,5 et 6 mutations roses / 1000 poils staminaux selon les pays. Après exposition des inflorescences à des substances chimiques, par exemple l'hydrazide maléique, ce taux peut atteindre 40 mutations / 1000 poils staminaux (Xiao et Ichikawa, 1995).

Notons que dans certaines publications, les résultats sont exprimés en nombre de mutations roses pour 10^5 divisions cellulaires. Ce mode d'expression a été utilisé par Sparrow dans les années 70, mais n'est plus utilisé maintenant que par de rares équipes, dont notamment celle d'Ichikawa (Université de Kyoto, Japon). Le nombre de divisions cellulaires est obtenu par l'équation suivante :
$$\text{Nb div. cell.} = (\text{Nb poils staminaux observés}) \times (\text{Nb moyen cellules par poil staminal} - 1)$$

Le nombre moyen de cellules par poil staminal étant évalué en comptant le nombre de cellules sur 20 poils staminaux choisis sur 2 étamines diamétralement opposées sur chaque fleur.

Selon Ichikawa et Takahashi (1978), ce mode d'expression permet de pouvoir comparer les résultats avec d'autres plantes que *Tradescantia* et permet une estimation plus précise car les traitements par des agents chimiques peuvent parfois modifier le nombre de cellules dans les poils staminaux.

Par ailleurs, les mutations peuvent se produire à n'importe quel endroit des poils staminaux, mais Ichikawa (1994) a constaté que les mutations étaient plus nombreuses (en moyenne 1,8 fois plus) au niveau subterminal qu'au niveau terminal des poils staminaux après traitement des inflorescences de *Tradescantia* clone KU 20 aux rayons gamma générés par du ^{60}Co (Figure 6). Le nombre de mutations au niveau subterminal des poils staminaux a également été trouvé supérieur à celui des mutations au niveau terminal (jusqu'à trois fois plus) dans d'autres clones tels que BNL 02, KU 20 et KU 27. Des poils staminaux entièrement roses peuvent également être observés, mais plutôt à la fin de la période de floraison (Sanda-Kamigawara et al., 1995).

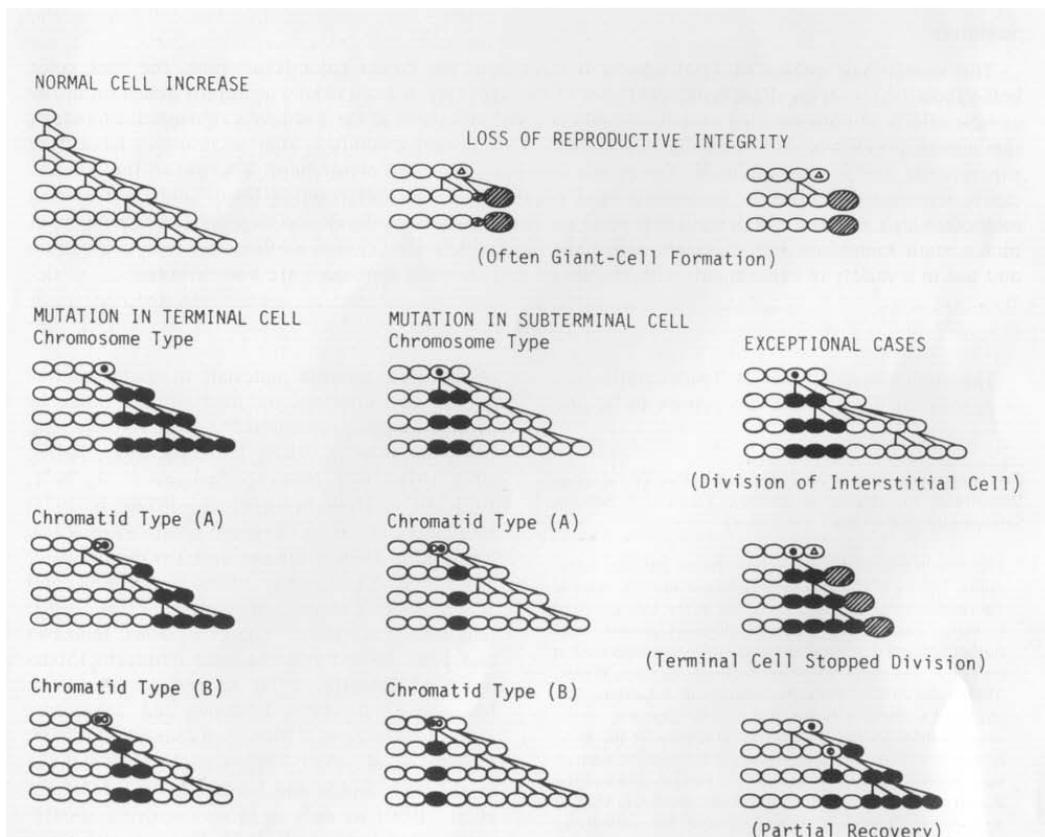


Figure 6 : Formation de cellules roses dans les poils staminaux de *Tradescantia* (Ichikawa, 1992)

IV.1.4.2. Modes d'exposition de *Tradescantia*

L'exposition de *Tradescantia* aux toxiques peut se faire de différentes façons : soit les plantes avec leur système racinaire sont plantées dans des sols à tester, soit ce sont les inflorescences ("cuttings") qui sont traitées. Dans ce dernier cas, des inflorescences portant de jeunes bourgeons ("buds") sont coupées et placées dans les solutions à tester de façon à ce que seules les tiges soient immergées. Le traitement se fait par absorption hydroponique des produits à travers le système vasculaire de la tige. Les agents atteignent les cellules mères de pollen dans le cas du test des micronoyaux et les poils staminaux dans le cas du test des mutations par un mouvement ascendant via le pédoncule, le pédicelle et le filament des étamines.

Ce protocole, défini par Ma et al. (1978), est couramment utilisé mais il existe d'autres modes d'exposition rencontrés dans la littérature qui consistent à immerger complètement les bourgeons, et non les tiges, dans la solution (Gichner et al., 1982). Une variante consiste à appliquer la solution de produit à tester directement sur les bourgeons à l'aide d'un coton ou d'une pipette (Ichikawa et Takahashi, 1978 ; Helma et al., 1995) ou bien encore en pulvérisant le produit sur les inflorescences (Ma et al., 1983). Enfin, ces dernières peuvent aussi être traitées par des produits chimiques à l'état de vapeur ou de gaz dans une enceinte à pression contrôlée (Sparrow et al., 1974).

Le test Trad-SH s'applique donc aussi bien aux substances chimiques qu'aux matrices contaminées : sol, eau et air. Nous allons maintenant développer chacun de ces points en détaillant un certain nombre d'études qui illustrent bien le caractère polyvalent de ce test.

Les travaux présentés ci-dessous concernent principalement le clone 4430 (auquel cas, celui-ci ne sera pas spécifié).

IV.1.4.3. Les substances chimiques

Le test Trad-SH a été expérimenté avec de nombreux composés (Tableau VIII), mais il a particulièrement fait ses preuves avec une certaine classe de substances chimiques : les agents alkylants tels que l'éthyl méthanesulfonate ou le méthyl méthanesulfonate. Par contre, il s'est avéré inefficace dans le cas des métaux. Les courbes dose-effet sur un graphe log-log sont en général tout à fait linéaires avec de forts coefficients de corrélation (Ichikawa et Takahashi, 1978).

IV.1.4.4. Les sols contaminés

A notre connaissance, très peu d'études ont été réalisées avec le test Trad-SH dans la problématique des sols contaminés. Citons cependant l'étude de Cabrera et al. (1997a) : au Mexique, dans la ville de Queretaro, des eaux résiduaires d'origine industrielle et domestique servent à irriguer les champs sans aucun traitement de dépollution. Les extraits aqueux de ces sols contaminés ont été testés à l'aide du test Trad-SH et se sont révélés mutagènes.

IV.1.4.5. La pollution aquatique

Les expérimentations menées à l'aide du test Trad-SH dans le domaine aquatique sont assez rares. Il s'est révélé néanmoins efficace, que ce soit au laboratoire ou *in situ*.

Citons par exemple la publication de Lower et al. (1985), dans laquelle sont présentés des résultats de mutagénicité de sédiments prélevés au fond d'un bassin d'eau dans le Missouri, servant de réserve d'eau potable. *Tradescantia* a été planté dans les échantillons de sédiment pendant 5 mois et présentait des taux de mutation supérieurs à ceux du témoin durant toute cette période. Ceci montre que les substances chimiques présentes dans les sédiments sont rémanentes et ont des effets à long terme. Par ailleurs, d'autres auteurs avaient démontré la mutagénicité de l'eau prélevée dans ce même bassin à l'aide du test d'Ames.

<i>Substance chimique</i>	<i>Durée d'exposition</i>	<i>LOEC</i>	<i>Référence bibliographique</i>
1,2-dibromoéthane (gaz)	6 h	0,14 ppm	Schairer, 1979
	6 h	20 ppm	Nauman et Grant, 1982
2-bromoéthanol (gaz)	6 h	24 ppm	Schairer, 1979
azidoglycérol	24 h	50 mg/l	Ma <u>et al.</u> , 1994b
azoture de sodium	3 h	0,1 mM	Schairer, 1979
	24 h	46 µM	Ma <u>et al.</u> , 1994b
benzène (gaz)	6 h	4000 ppm	Schairer, 1979
benzidine	24 h	0,5 µM	Schairer, 1979
benzo(a)pyrène	24 h	40 µM	Schairer, 1979
caféine	chronique	1 mM	Schairer, 1979
chlorure de vinyle (gaz)	6 h	75 ppm	Schairer, 1979
diméthyl sulfate	4 h	1,3 mM	Shima et Ichikawa, 1995
dioxyde d'azote (gaz)	6 h	50 ppm	Schairer, 1979
dioxyde de soufre (gaz)	6 h	40 ppm	Schairer, 1979
éthyl méthanesulfonate (gaz)	6 h	5 ppm	Sparrow <u>et al.</u> , 1974
	6 h	5 ppm	Schairer, 1979
hydrazide maléique	24 h	5 mM	Gichner <u>et al.</u> , 1982
	4 h	1 mM	Xiao et Ichikawa, 1995
	24 h	89 µM	Ma <u>et al.</u> , 1994b
méthyl méthanesulfonate	4 h	454 µM	Ichikawa <u>et al.</u> , 1995
N-éthyl-N-nitrosourée	4 h	0,5 mM	Shima et Ichikawa, 1997
N-méthyl-N-nitrosourée	4 h	1 mM	Shima et Ichikawa, 1995
	24 h	97 µM	Ma <u>et al.</u> , 1994b
ozone (gaz)	6 h	5 ppm	Schairer, 1979
pyrène	24 h	5 µM	Schairer, 1979
trichloroéthylène (gaz)	6 h	0,5 ppm	Schairer, 1979

Tableau VIII: Exemples de résultats positifs du test *Tradescantia*-mutations appliqué à des substances chimiques (clone 4430).

LOEC = Concentration la plus faible pour laquelle un effet est observé

Quant aux études *in situ*, le système “Aquatoon” permettant de maintenir les inflorescences verticales, de façon à ce que les tiges soient immergées dans l’eau, a été testé lors d’une étude *in situ* sur la rive canadienne du Lac Supérieur (Grant et al., 1992). Les auteurs ont sélectionné différents sites au niveau de l’embouchure d’un ruisseau contaminé notamment par des effluents de papeterie. Les inflorescences étaient placées pendant 24 heures dans l’Aquatoon et présentaient une fréquence de mutations relativement importante, qui diminuait cependant avec l’éloignement de l’embouchure du ruisseau. Les mêmes observations ont été faites en réalisant les tests au laboratoire avec des échantillons d’eau.

IV.1.4.6. La pollution atmosphérique

Contrairement aux domaines terrestre et aquatique, de nombreuses expérimentations *in situ* ont été menées sur la pollution de l’air avec le test *Tradescantia-mutations*.

L’avantage de *Tradescantia* est que ses inflorescences peuvent être transportées sur des sites potentiellement contaminés, comme c’était le cas lors de l’étude de Schairer (1979). Un laboratoire a été installé dans un camion : le “Mobile Monitoring Vehicle” afin de cultiver les plantes dans des conditions satisfaisantes avec un flux constant d’air ambiant. 14 sites différents avaient été choisis à travers les Etats-Unis, la période d’exposition était de 10 jours. La plupart des sites ont provoqué des fréquences de mutation très supérieures au contrôle localisé dans le Grand Canyon, Arizona, mais les réponses les plus spectaculaires ont été obtenues sur les sites de transformation du pétrole et dans une moindre mesure près d’industries chimiques et de fonderies.

Le test Trad-SH a été réalisé à plusieurs reprises sur différents sites d’une décharge municipale et près d’un incinérateur de déchets aux Etats-Unis afin d’évaluer *in situ* la génotoxicité des émissions gazeuses. La durée d’exposition était dans les deux cas de 5 à 7 heures. Le test des mutations a révélé 12 réponses positives sur 20 près de la décharge et 2 réponses positives sur 4 près de l’incinérateur. Ces réponses étaient clairement associées aux conditions atmosphériques (vent, température, humidité) et à la distance entre les plantes et la décharge ou la cheminée de l’incinérateur (Ma et al., 1996).

Deux sites ont été choisis pour l’évaluation de l’impact des industries du pétrole sur *Tradescantia* et *Zea mays* (le maïs) : une raffinerie dans l’Illinois et un complexe pétrochimique au

Texas. Les deux espèces végétales sélectionnées étaient plantées près des sites dans du sol artificiel dans l'Illinois et dans le Texas. Que ce soit à proximité de la raffinerie ou du complexe pétrochimique, la fréquence de mutations de *Tradescantia*, mais surtout celle de *Zea mays* (maïs) étaient significativement augmentées lors des diverses expériences (Lower et al., 1983).

Citons enfin une étude concernant des polluants atmosphériques peu communs : il s'agit des gaz fumigènes utilisés pour réduire la visibilité des hommes qu'emploie l'armée américaine. La fumée était générée notamment par combustion de gas-oil et a été testée sur le terrain à différentes distances des inflorescences de *Tradescantia* : la fréquence de mutations était significativement augmentée jusqu'à 50 mètres (Schaeffer et al., 1987).

IV.1.4.7. Les radiations

Concernant l'utilisation du test *Tradescantia*-mutations dans l'évaluation du risque génotoxique des radiations, citons l'étude de Cebulska-Wasilewska (1992) en Pologne, qui déterminait régulièrement le taux de mutations spontanées dans ses plantes. Lors de l'accident survenu dans la centrale nucléaire de Tchernobyl le 25 Avril 1986, le taux moyen de mutations spontanées chez *Tradescantia* est passé de 0,9 à 4,3 pour 1000 poils staminaux. Au printemps 1987, ce taux était diminué de moitié. Cet exemple illustre bien le rôle d'alarme que peut jouer ce test, plus utile selon les auteurs que les informations données par les gouvernements. Il met aussi l'accent sur sa sensibilité aux radiations car il faut noter que le laboratoire dans lequel s'est faite cette étude se situe à Cracovie, à 700 km à l'ouest de Tchernobyl. Le même type d'observation a été fait par Ichikawa et al. (1996b) au Japon avec *Tradescantia* clone KU9. La fréquence de mutations spontanées a été déterminée au mois de mai pendant 3 semaines de chaque année de 1982 à 1992 dans les serres de culture des plantes. Seul le taux de mutations spontanées observé en 1986, année de l'accident, s'est avéré significativement supérieur à celui des autres années.

Des plants de *Tradescantia* (clone BNL 02) ont été placés pendant 76 jours dans des sols prélevés à la surface et à 10-20 cm de profondeur sur l'atoll de Bikini, Iles Marshall, USA, où des essais avec des bombes H avaient été conduits en 1954. Le sol de l'Université de Saitama, Japon, était pris en tant que référence. Les taux de mutation et de radioactivité sont apparus tous deux significativement supérieurs au témoin (Ichikawa et Ishii, 1991b).

D'autre part, une étude de l'impact mutagène des radiations chez *Tradescantia* a été réalisée avec des rayons X d'intensité comprise entre 0,5 et 1 Gray (Gy). Tous les essais ont mis en évidence une très forte augmentation de la fréquence de mutations dans les cellules staminales (Ichikawa et al., 1993). Les courbes dose-effet obtenues lorsque le test Trad-SH est appliqué à des radiations (rayons X ou gamma) sont toujours très linéaires avec des coefficients de corrélation élevés, et ce, quel que soit le clone étudié (Sparrow et al., 1972 ; Schairer, 1979 ; Sanda-Kamigawara et al., 1991).

D'autres auteurs ont montré l'existence d'une synergie entre les radiations (rayons X entre 0,5 et 1 Gy) et le méthyl méthanesulfonate (0,005%) car la fréquence de mutations apparaissait très supérieure à l'addition des valeurs obtenues avec chacune des deux expériences. Les auteurs suggèrent que les cassures simple brin induites par les radiations ionisantes et celles provoquées par les agents alkylants interagissent entre elles, ce qui aurait pour effet d'induire des cassures double brin à l'origine des mutations (Ichikawa et al., 1993). Le même type d'observation a été fait avec les rayons X (de 0,3 à 1 Gy) et le diméthylsulfate pour des concentrations comprises entre 1,3 et 2,6 mM (Shima et Ichikawa, 1995). Notons encore un effet synergique entre les rayons X et le N-éthyl-N-nitrosourée (de 0,5 à 2 mM). Cette interaction était surtout mise en évidence avec de fortes doses de rayons X, de l'ordre de 0,9 Gy (Shima et Ichikawa, 1997). Par contre, aucune synergie n'a pu être observée entre les rayons X et le N-méthyl-N-nitrosourée pour des concentrations comprises entre 1 et 2 mM, ce qui suggère que les effets synergiques dépendent du mode d'action des agents alkylants étudiés (Shima et Ichikawa, 1995).

Le test *Tradescantia*-mutations s'est avéré particulièrement utile pour détecter le potentiel génotoxique des sols et des eaux, mais c'est surtout dans l'étude de la pollution atmosphérique que ce test est efficace et particulièrement dans les *expérimentations in situ*. D'autre part, il est beaucoup plus sensible aux substances organiques qu'aux métaux. Enfin, il peut être efficacement utilisé dans l'étude des radiations.

IV.1.5. Le test *Tradescantia*-micronoyaux (Trad-MCN)

IV.1.5.1. Principe

Ce test présente un certain nombre d'avantages : il s'effectue sur les cellules de pollen. Or, ces cellules germinales peuvent transmettre des altérations du génome aux générations suivantes dans le cas où les systèmes de réparation de l'ADN seraient inefficaces. Par ailleurs, les cellules germinales se divisent par méiose, et il est reconnu depuis longtemps que les chromosomes méiotiques sont 10 fois plus sensibles aux agents chimiques ou physiques que les chromosomes mitotiques (Sax, 1938). Cette grande sensibilité des cellules méiotiques peut être attribuée aux possibilités de crossing-over pendant les stades pachytène/diplotène de la prophase I de la méiose, ce qui facilite les cassures de chromosome (Ma, 1990a). Enfin, le stade de division de ces cellules est bien synchronisé dans chaque bourgeon (Ma, 1979a).

Le principe est donc de traiter les inflorescences au début de la prophase I (pachytène et diplotène) de la méiose et de compter les micronoyaux au stade tétrade des cellules de pollen dans les bourgeons (Figure 7). Le stade tétrade est relativement long, toutefois le comptage des micronoyaux doit se faire au tout début du stade lorsqu'une membrane entoure les quatre cellules et que l'ADN est bien condensé. Ainsi, les micronoyaux sont bien visibles dans le cytoplasme des cellules (Ma, 1979a).

La durée nécessaire au déroulement du cycle méiotique, et particulièrement la période entre le traitement des bourgeons au début de la prophase et le comptage des micronoyaux dans les cellules au stade tétrade est de 24 à 30 heures (Ma et al., 1994a). Cependant, certains auteurs ont démontré qu'il était préférable d'attendre 79 heures plutôt que 24 heures, dans le cas de l'exposition de *Tradescantia* à l'azoture de sodium (Falistocco et al., 1997).

Les micronoyaux sont dénombrés, ainsi que les tétrades observées. Les résultats sont ensuite exprimés en nombre de micronoyaux pour 100 tétrades. Le taux de micronoyaux spontanés dans les cellules racinaires est habituellement de 0 à 7 micronoyaux (MCN) pour 100 tétrades. Un certain nombre de composés chimiques tels que le dibromoéthane peut induire par exemple jusqu'à 64 MCN / 100 tétrades (Ma et al., 1978).

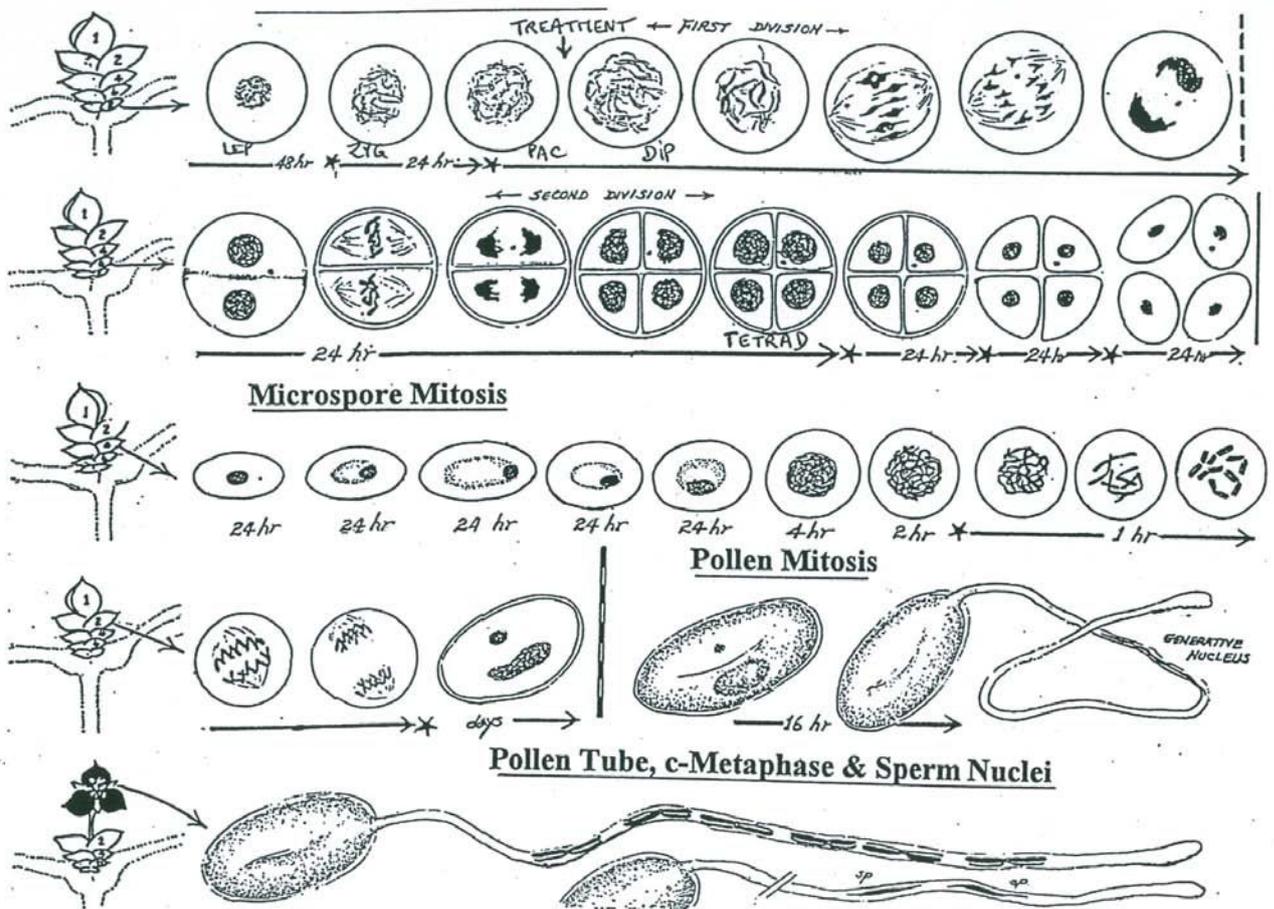


Figure 7 : Etapes de la division des cellules de pollen de *Tradescantia* (Ma, 1979a)

Avant de nous intéresser aux applications du test Trad-MCN, il convient d'envisager les modes d'exposition de la plante aux toxiques.

IV.1.5.2. Modes d'exposition de *Tradescantia*

Pour ce qui est des modes d'exposition de *Tradescantia* dans ce test, il s'agit exactement des mêmes que pour le test des micronoyaux (cf. § IV.1.4.2).

Les travaux présentés ci-dessous concernent principalement le clone 4430, qui est le clone le plus fréquemment utilisé, comme pour le test *Tradescantia*-mutations. Dans ce cas, le clone ne sera pas spécifié.

IV.1.5.3. Les substances chimiques

Intéressons nous tout d'abord à la réponse du test des micronoyaux lorsque *Tradescantia* est exposé à des substances chimiques.

Depuis la publication du protocole (Ma et al., 1978), encore considérée comme référence aujourd'hui, le test *Tradescantia*-micronoyaux a été utilisé pour étudier les effets génotoxiques des produits chimiques dans de nombreuses expérimentations (Tableau IX). Il convient de citer particulièrement une étude portant sur 140 agents différents, aussi bien à l'état liquide qu'à l'état gazeux, testés à l'aide de *Tradescantia* (clones 4430 et 03). Les auteurs ont testé des produits aussi divers que des boissons, des médicaments ou des produits à usage domestique et ont notamment trouvé des réponses positives pour deux marques différentes de boisson au cola (à des concentrations de 50 et 100%), pour du café décaféiné (25%), pour la saccharine (5 μ M), pour un désodorisant (0,3 ml), pour le shampooing Head & Shoulders (800 ppm), etc... Ces auteurs ont également comparé les résultats de 41 des 140 agents étudiés avec ceux du test d'Ames dans la littérature. Ils ont trouvé 67% de similitude entre les résultats du test Trad-MCN et ceux du test d'Ames (Ma et al., 1984).

Certaines substances chimiques ont suscité une attention particulière : citons par exemple les HFCs (hydroxyfuranones chlorés), formés après traitement au chlore des eaux potables ou des effluents industriels. Toutefois, ces produits n'ont induit des micronoyaux chez *Tradescantia* que pour des concentrations très supérieures à celles trouvées dans les eaux potables (Helma et al., 1995).

Dans les matrices complexes, certains produits chimiques présentent parfois des interactions entre eux. C'est ainsi qu'un antagonisme a été mis en évidence entre le trioxyde d'arsenic et le tétraacétate de plomb, et une synergie entre le tétrachloroéthylène et la dieldrine en phase liquide (Ma et al., 1992).

Enfin, une dernière étude est relative à différents modes d'exposition de l'insecticide malathion : celui-ci a été pulvérisé sur les inflorescences, ou bien absorbé à travers les tiges en immergeant celles-ci dans la solution, ou encore administré à l'état gazeux dans une enceinte. Seule cette dernière méthode a efficacement induit de nombreux micronoyaux dans les cellules de *Tradescantia* pour des concentrations aussi faibles que 0,15-0,25 %. Ces résultats laissent à penser

<i>Substance chimique</i>	<i>Durée d'exposition</i>	<i>LOEC</i>	<i>Référence bibliographique</i>
1,2-benz[a,h]anthracène	30 h	55 µM	Sandhu <i>et al.</i> , 1989
1,2-dibromoéthane (gaz)	6 h (+ 24 h)	5 ppm	Ma <i>et al.</i> , 1978
acide tannique	12 h (+ 12 h)	0,75 mM	Knasmüller <i>et al.</i> , 1992
azidoglycérol	30 h	50 mg/l	Ma <i>et al.</i> , 1994a
azoture de sodium (gaz)	6 h (+ 24 h)	136 ppm	Ma, 1990a
azoture de sodium (liquide)		0,2 mM	Green <i>et al.</i> , 1996
		20 mM	Helma <i>et al.</i> , 1995
	30 h	46 µM	Ma <i>et al.</i> , 1994a
	6 h (+ 24 h)	0,2 mM	Ma, 1990a
benzo(a)pyrène	6 h (+ 24 h)	50 µM	Ma, 1981
chlorpyrifos (insecticide)	30 h	28 µM	Rodrigues <i>et al.</i> , 1998
chlorure de cadmium	6 h (+ 24 h)	11 mM	Steinkellner <i>et al.</i> , 1998
chlorure de chrome	6 h (+ 24 h)	5 mM	Knasmüller <i>et al.</i> , 1998
chlorure de nickel	6 h (+ 24 h)	5 mM	Knasmüller <i>et al.</i> , 1998
chlorure de zinc	6 h (+ 24 h)	11 mM	Steinkellner <i>et al.</i> , 1998
cyanazine (herbicide)	30 h	4 µM	Rodrigues <i>et al.</i> , 1998
dichromate de potassium	6 h (+ 24 h)	3,4 mM	Villalobos-Pietrini <i>et al.</i> , 1986
dieldrine (insecticide)	30 h	10 µM	Gill & Sandhu, 1992
	30 h	10 µM	Sandhu <i>et al.</i> , 1989
éthyl méthanesulfonate (gaz)	6 h (+ 24 h)	1000 ppm	Ma, 1990a
éthyl méthanesulfonate (liquide)	6 h (+ 24 h)	50 mM	Ma, 1990a
éthylbenzène (gaz)	6 h (+ 24 h)	172 ppm/min	Ma <i>et al.</i> , 1996
heptachlore (insecticide)	30 h	5 µM	Sandhu <i>et al.</i> , 1989
hydrazide maléique	30 h	44 µM	Ma <i>et al.</i> , 1992
	24 h	50 mM	Hopke <i>et al.</i> , 1982
	30 h	134 µM	Ma <i>et al.</i> , 1994a
	6 h (+ 24 h)	2 mM	Knasmüller <i>et al.</i> , 1998
malathion (gaz)	6 h (+ 24 h)	0,15 %	Ma <i>et al.</i> , 1983
méthyl nitrosourée	30 h	48 µM	Ma <i>et al.</i> , 1994a
metolachlor (herbicide)	30 h	35 µM	Rodrigues <i>et al.</i> , 1998
nitrate de plomb	6 h (+ 24 h)	6 mM	Steinkellner <i>et al.</i> , 1998
ozone (gaz)	6 h (+ 24 h)	50 ppb	Rodrigues <i>et al.</i> , 1996
tétraacétate de plomb	30 h	1 µM	Sandhu <i>et al.</i> , 1989
tétrachloroéthylène (gaz)	2 h (+ 24 h)	30 ppm/min	Sandhu <i>et al.</i> , 1989
toluène (gaz)	6 h (+ 24 h)	50 ppm/min	Ma <i>et al.</i> , 1996
trioxyde d'arsenic	30 h	20 µM	Gill et Sandhu, 1992
	6 h (+ 24 h)	2,5 mM	Steinkellner <i>et al.</i> , 1998
trioxyde de chrome	6 h (+ 24 h)	1,25 mM	Knasmüller <i>et al.</i> , 1998

Tableau IX: Exemples de résultats positifs du test *Tradescantia*-micronoyaux appliqué à des substances chimiques (clone 4430). La durée inscrite entre parenthèses est la durée de récupération.

que la forme gazeuse du malathion est la plus dangereuse, ce qui est en accord avec les cas d'intoxication mortelle répertoriés dans de nombreux pays comme le Pakistan chez des personnes qui pulvérisaient le malathion dans les champs (Ma et al., 1983).

IV.1.5.4. Les sols contaminés

Le test *Tradescantia*-micronoyaux paraît être un test intéressant pour détecter la génotoxicité des sols contaminés, mais aussi pour contrôler l'efficacité des procédés de décontamination de ces sols. Les échantillons de sols, artificiellement ou réellement contaminés, sont en général testés au laboratoire, soit en y plaçant directement les plantes, soit en préparant des extraits aqueux ou organiques qui sont ensuite mis en contact avec les tiges des inflorescences. D'autre part, bien que les études *in situ* soient peu nombreuses, il est tout de même possible d'en réaliser dans la mesure où les conditions atmosphériques le permettent.

Pour ce qui est des sols contaminés, certains auteurs ont prouvé l'intérêt d'évaluer la génotoxicité de mélanges de produits chimiques dans les sols tels qu'ils existent sur les sites contaminés au lieu de les tester individuellement, du fait de leur interaction éventuelle.

En effet, du trioxyde d'arsenic et du tétraacétate de plomb ont été ajoutés à un sol non pollué, soit séparément, soit mélangés à une concentration de 4 mg/kg dans tous les cas (Gill et Sandhu, 1992). Les plants de *Tradescantia* ont ensuite été mis en contact avec ces sols artificiellement contaminés et leurs bourgeons observés pour le comptage des micronoyaux. Il est apparu que, pour une même concentration, le mélange des deux produits a induit 17,8 MCN /100 tétrades alors que chacun séparément produisait 10,1 et 11,2 MCN /100 tétrades pour le trioxyde d'arsenic et pour le tétraacétate de plomb respectivement.

Une approche intégrée impliquant le test d'Ames, des tests de génotoxicité sur plantes et des analyses chimiques a été appliquée à des échantillons de sol prélevés en Lombardie, région fortement industrialisée de l'Italie (Monarca et al., 1997a). Ce sol, prélevé trois fois à 20 cm de profondeur, était principalement contaminé par des métaux lourds (Zn, Pb, Cu, etc...). Les extraits au cyclohexane ne présentaient aucune mutagénicité avec le test d'Ames et les extraits à l'acétone n'induisaient une mutagénicité que dans un cas sur trois. Par contre, dans deux prélèvements sur trois, le taux de micronoyaux chez *Tradescantia* était significativement augmenté.

Au Mexique, dans la ville de Queretaro, des eaux résiduares d'origine industrielle et domestique servent à irriguer les champs sans aucun traitement de dépollution. Les extraits aqueux de ces sols contaminés ont été testés à l'aide du test Trad-MCN et se sont avérés génotoxiques (Cabrera et al., 1997a).

Une étude intéressante a permis de comparer deux approches pour tester en laboratoire un sol prélevé près d'une fonderie, contaminé par des métaux lourds (As, Pb, Cd, etc...). D'une part, les plantes avec leur système racinaire étaient plantées dans le sol pendant 72 heures, et d'autre part, les tiges d'autres inflorescences étaient plongées dans l'extrait aqueux de ce sol pendant 30 heures. La fréquence de micronoyaux de *Tradescantia* était supérieure à celle du témoin dans les deux cas d'exposition (Steinkellner et al., 1998). La même expérience a été conduite avec un sol prélevé près d'une mine en Slovaquie, un sol contaminé par de l'arsenic et deux sols échantillonnés près d'une fonderie en Autriche. Lorsque *Tradescantia* était planté dans ces quatre sols principalement contaminés par des métaux, les cellules de pollen présentaient un taux de micronoyaux significativement supérieur au témoin. En revanche, aucun effet génotoxique n'a été observé quand les inflorescences étaient exposées aux lixiviats de ces quatre sols (Knasmüller et al., 1998).

Le test *Tradescantia*-micronoyaux s'avère également efficace pour l'évaluation des risques liés à la décontamination des sites pollués.

En effet, l'extrait aqueux d'un sol échantillonné sur un site pollué principalement par des HAPs (phenanthrène, fluoranthène, etc...) a induit une augmentation significative des micronoyaux chez *Tradescantia* à partir d'une concentration de 1%. Après chauffage de ce sol, une concentration de 0,5% seulement d'extrait aqueux suffisait à induire le même résultat, ce qui laisse à penser que certains HAPs ont été transformés par les micro-organismes du sol (activés par le chauffage du sol) en métabolites plus génotoxiques que les molécules mères. Par contre, l'inoculation de ce même sol avec le champignon *Phanerochaete chrysosporium* a permis de diminuer efficacement la concentration des agents génotoxiques (les molécules mères mais aussi les métabolites secondaires). Ceci a été mis en évidence par l'analyse chimique mais surtout de façon très évidente par le test Trad-MCN (Baud-Grasset et al., 1993).

Une autre expérimentation a été réalisée pour contrôler l'efficacité des procédés de rémediation effectués sur un terrain où des analyses chimiques avaient mis en évidence la présence de chrome, de cuivre et d'arsenic après des traitements réguliers de conservation du bois entre 1963

et 1985. Quatre sites ont été choisis sur ce terrain : deux à l'endroit même où était entreposé le bois pour le séchage, et deux autres situés à 60 et 115 mètres du lieu de stockage. En outre, deux modes de traitement de *Tradescantia* ont été comparés :

- des plantes avec leurs racines étaient tout d'abord directement placées sur les différents sites. Les cellules de pollen ne présentaient un taux élevé de micronoyaux que pour les sites localisés à l'endroit du stockage du bois.
- des lixiviats de sols étaient ensuite échantillonnés sur les quatre sites et mis en contact au laboratoire avec les inflorescences par l'intermédiaire de leur tige ; la fréquence de micronoyaux était augmentée sur les mêmes sites que lors de l'étude *in situ*.

Après rémédiation du terrain, les analyses chimiques ont mis en évidence une très forte diminution de la concentration en chrome, cuivre et arsenic, ce qui était confirmé par le test *Tradescantia* : tous les taux de micronoyaux étaient similaires à ceux du témoin, que ce soit pour l'étude *in situ* ou au laboratoire (Sandhu et al., 1991).

Enfin, un site en Caroline du Nord (sélectionné par l'US E.P.A.) a été dépollué à la suite de contaminations par des pesticides (DDT, toxaphène, etc...). *Tradescantia* a été planté à cinq endroits différents : deux sur le site pollué et trois à 9, 45 et 137 mètres de distance. Les résultats ont montré que seul le site le plus éloigné n'induisait pas de micronoyaux en nombre significativement supérieur à celui du témoin. Par contre, après rémédiation du sol, les auteurs n'ont plus observé d'augmentation de micronoyaux dans aucun des cinq sites (Gill et al., 1991).

IV.1.5.5. Les déchets

Il est important de vérifier l'activité génotoxique des déchets avant de prendre les décisions nécessaires pour le stockage, le recyclage ou la valorisation agricole, ceci peut notamment être réalisé très efficacement à l'aide du test *Tradescantia*-micronoyaux. Les expérimentations peuvent être réalisées soit directement avec les matrices, soit avec les lixiviats.

Cabrera et al. (1997b) ont par exemple testé au laboratoire des extraits de composts préparés à partir de déchets organiques ou de déchets ménagers. Le compost organique a montré une plus faible génotoxicité pour les cellules de pollen que le compost de déchets ménagers qui contient une variété de produits à fort potentiel génotoxique.

Les déchets posent un autre problème : lors de leur stockage dans les décharges, il se forme des lixiviats qui sont chargés en micropolluants et qui peuvent contaminer les nappes phréatiques. Une étude a mis en évidence la génotoxicité de lixiviats prélevés près de décharges avec le test Trad-MCN, qui était toutefois fortement diminuée après des périodes de précipitations intenses (Cabrera et al., 1997c).

Les boues de station d'épuration (STEP) peuvent également être contrôlées à l'aide de tests de génotoxicité sur plantes.

A titre d'exemple, des échantillons de boues de station d'épuration de la ville de Chicago ont été dilués dans du milieu de Hoagland et testés directement avec différents tests de génotoxicité. A partir d'une dilution au 1/4, la boue induisait des micronoyaux chez *Tradescantia*. Cette même boue produisait aussi des effets mutagènes chez *Zea mays* (maïs) pour une dilution au 1/12 et n'induisait une réponse positive du test d'Ames qu'après ajout de S9, ce qui indiquait que la boue contenait des mutagènes indirects. Bien que ces agents puissent agir directement chez *Tradescantia* et *Zea mays* (maïs), ceci laisse à penser que les plantes ont également la capacité d'activer des promutagènes (Hopke et al., 1982). Des boues d'autres stations d'épuration ont aussi révélé un caractère génotoxique à l'aide du test Trad-MCN (Plewa, 1984).

IV.1.5.6. La pollution aquatique

Dans le domaine aquatique, les études *in situ* sont assez rares. Nous allons montrer dans ce paragraphe que le test Trad-MCN est applicable à tous les types d'eau (eaux de mer, de rivière, effluents, etc...). Ce test est également en mesure de contrôler l'efficacité des procédés de décontamination des eaux potables. Dans la plupart des cas que nous allons présenter, des échantillons d'eau ont été prélevés et testés en laboratoire.

Concernant la contamination des eaux, des études ont mis en évidence la génotoxicité de prélèvements d'eau suivants (Ma, 1990a) :

- eaux de mer contaminées par du pétrole ou par des rejets industriels
- effluents d'usines de traitement du cuir ou de papier
- effluents d'imprimeries, d'industries chimiques ou métallurgiques

Par ailleurs, des échantillons d'eau prélevés périodiquement dans un réservoir d'eau potable (Spring Lake, Macomb, USA) en 1980 et 1981 ont été testés à l'aide du clone 03 de *Tradescantia*. La fréquence de micronoyaux a présenté un pic à la mi-juillet pour chacune des deux années, à la suite de périodes de précipitations intenses. L'eau potable du robinet a été testée en parallèle et sa génotoxicité tendait à fluctuer avec les saisons de la même manière que celle de l'eau du réservoir (Ma et al., 1985).

L'eau de la rivière qui traverse Queretaro (Mexique) sert à irriguer les champs et est occasionnellement utilisée comme eau de boisson. L'un des problèmes majeurs est lié à des effluents industriels qui sont régulièrement déversés dans cette rivière. Au total, quinze échantillons d'eau de rivière ont tous induit un nombre très élevé de micronoyaux dans les cellules de pollen de *Tradescantia* avec cependant des fluctuations saisonnières liées à l'intensité des précipitations, à la nature et à la quantité des effluents industriels déversés (Ruiz et al., 1992).

Une étude originale de Monarca et al. (1997b) a porté sur des eaux minérales, après conservation prolongée dans des bouteilles en PET (polyéthylène terephthalate). Afin de vérifier s'il y avait une migration de substances génotoxiques des bouteilles aux boissons, les auteurs ont utilisé des tests sur plantes. Deux "pools" d'eau minérale composés de plusieurs marques différentes ont d'abord été testés de la façon suivante : l'eau minérale était lyophilisée (aussi surprenant que cela puisse paraître...) et le résidu dissous dans de l'eau distillée de façon à être concentré 100 et 250 fois. Une réponse positive du test Trad-MCN a été obtenue dans les deux cas. Puis deux eaux minérales de deux marques différentes ont été gardées à 40°C pendant 10 jours et testées directement : la fréquence de micronoyaux chez *Tradescantia* était de 8 et 11 fois supérieure à celle du contrôle. Par contre, les tests *Allium*-micronoyaux et aberrations chromosomiques ainsi que le test de Kado n'ont montré aucun effet génotoxique. Dans tous les cas, les eaux conservées dans des bouteilles en verre ont donné des résultats négatifs.

Des études *in situ* sont également réalisables, à l'aide notamment du système Aquatoon que nous avons déjà cité pour le test *Tradescantia*-mutations (cf. § IV.1.4.5). Ce dispositif expérimental a été testé lors d'une étude *in situ* sur la rive canadienne du Lac Supérieur (Grant et al., 1992). Les auteurs se sont d'abord intéressés à un ruisseau qui se jette dans ce lac et qui est contaminé notamment par des effluents de papeterie. Les inflorescences étaient placées pendant 24 heures dans l'Aquatoon à une dizaine de kilomètres de la papeterie : elles présentaient un taux de micronoyaux

supérieur au contrôle (également *in situ*) dans deux sites testés. D'autres sites avaient été choisis à l'endroit où le ruisseau se jette dans le Lac Supérieur : la fréquence de micronoyaux était relativement importante, mais diminuait avec l'éloignement de l'embouchure du ruisseau. Les mêmes observations ont été faites en réalisant les tests au laboratoire avec des échantillons d'eau.

L'inconvénient majeur des études *in situ* réside dans l'influence des conditions climatiques sur la fréquence de micronoyaux : des températures très faibles ou à l'inverse très élevées peuvent induire un nombre important de micronoyaux dans les cellules de pollen (Ma, 1990a). D'autre part, des éléments (boue, micro-organismes, etc...) peuvent s'accumuler sur les tiges de *Tradescantia* et empêcher ainsi l'absorption des constituants de l'eau. Par ailleurs, les inflorescences sont également sensibles aux polluants atmosphériques et intègrent par conséquent les effets des deux milieux : les micropolluants atmosphériques peuvent interférer avec ceux de l'eau à tester et biaiser ainsi les résultats (Grant et al., 1992).

Enfin, l'efficacité des procédés de décontamination d'eaux potables a été vérifiée grâce au test Trad-MCN. Des inflorescences étaient exposées à des échantillons d'eaux prélevées en Autriche avant et après différents traitements : filtration sur charbon actif, irradiation aux UV. Cinq séries d'expériences ont été conduites pendant 4 mois. Les valeurs de micronoyaux obtenues avant et après la filtration sur charbon actif étaient pratiquement similaires. Par contre, l'irradiation aux UV a doublé l'activité clastogène de l'eau dans les cinq expériences, qui cependant diminuait de moitié au bout d'une journée (Helma et al., 1994).

IV.1.5.7. La pollution atmosphérique

Rares sont les tests biologiques capables de détecter la pollution atmosphérique. Les travaux que nous allons présenter dans ce paragraphe vont clairement démontrer que le test *Tradescantia*-micronoyaux permet de déceler les agents génotoxiques présents dans l'air.

Il existe diverses façons d'étudier l'impact de la pollution de l'air sur les plantes : soit en les exposant à des polluants atmosphériques au laboratoire dans des enceintes et en conditions contrôlées, soit en transférant *in situ* les plantes entières, ou seulement les inflorescences dont les tiges sont immergées dans un milieu nutritif.

Nous allons tout d'abord porter notre attention sur les études en laboratoire : Rodrigues et al. (1996) ont exposé des inflorescences de *Tradescantia* à de l'ozone pendant 6 heures dans une enceinte. Les auteurs ont ensuite déterminé la fréquence de micronoyaux et celle de mutations mais seul le nombre de micronoyaux a fortement augmenté pour les deux concentrations testées, à savoir 50 et 100 ppb qui sont des concentrations d'ozone relevées dans certaines régions des Etats-Unis. D'autre part, le nombre de micronoyaux augmentait avec la durée d'exposition, ce qui suggère aux auteurs que les dommages à l'ADN surviennent lorsque les systèmes de réparation sont dépassés. L'ozone et surtout les espèces radicalaires formées, altèrent en premier lieu les membranes cellulaires puis les macromolécules que sont les protéines et bien sûr les acides nucléiques.

Par ailleurs, des inflorescences de *Tradescantia paludosa* (clone 03), placées dans une enceinte, ont été exposées pendant quelques minutes à des gaz d'échappement générés par une voiture diesel. Trois groupes correspondant à trois concentrations différentes de gaz ont été ainsi constitués. Le taux de micronoyaux a augmenté de façon significative pour les concentrations les plus fortes en gaz d'échappement (Ma et al., 1982a).

Concernant les études *in situ*, à l'inverse des domaines terrestre et aquatique, il est évidemment plus facile d'emmener des plantes sur le terrain que de prélever des échantillons de l'air que l'on veut tester.

Sur 30 expérimentations réalisées sur des sites soupçonnés d'être contaminés par des polluants atmosphériques, Ma (1990b) a relevé 15 réponses positives de ce test. Les inflorescences peuvent également être laissées dans une pièce fréquentée par plusieurs fumeurs durant une journée normale de travail. C'est ce qui a été réalisé par Sadowska et al (1994) qui ont trouvé un nombre de micronoyaux 10 fois supérieur à celui du témoin. Le test des micronoyaux a également donné des résultats positifs dans des bureaux nouvellement peints, mais aussi dans des fermes, en raison de produits phytosanitaires répandus dans les champs d'alentour (Ma, 1990a).

Les inflorescences de *Tradescantia* (clone 03) peuvent aussi être placées dans une caisse grillagée sur le toit d'une voiture, comme c'était le cas dans l'expérimentation de Ma et al. (1982b). Un certain nombre de sites ont été choisis dans l'état de l'Illinois, USA, pour être testés et les résultats de 5 sites sur 13 se sont révélés positifs. Ces sites étaient, pour la plupart, des sites

industriels (e.g. raffineries de pétrole) ou des endroits pollués par des gaz d'échappement de véhicules diesel (bus, camions, etc...).

Le test Trad-MCN *in situ* a également été effectué dans trois endroits différents de Queretaro, Mexique : un quartier résidentiel, un autre fortement industrialisé et un troisième regroupant industries et habitations. Quatorze tests ont été réalisés sur une période de deux ans afin de caractériser la clastogénicité des polluants de l'air (Ruiz et al., 1992). Les inflorescences placées dans le quartier fortement industrialisé présentaient un fort taux de micronoyaux dans chacun des tests. Par contre, les taux de micronoyaux trouvés dans les quartiers résidentiels n'étaient significativement supérieurs au témoin que pour quelques tests seulement.

De la même façon, différents sites soupçonnés d'être contaminés au niveau atmosphérique ont été testés *in situ* (Sadowska et al., 1994). Il s'agissait tout d'abord d'une centrale thermique en Pologne, près de laquelle les inflorescences étaient disposées. La fréquence de micronoyaux diminuait avec l'éloignement de la centrale, mais elle était encore significativement supérieure à celle du témoin à une distance de 1 km. Deux autres sites ont été choisis en Belgique, tous deux étaient des décharges municipales. L'une d'elles présentant des taux de micropolluants (benzène, benzo(a)pyrène, métaux lourds, etc...) qui dépassaient les normes a été recouverte de terre et de bâches en plastique. Malgré cela, le test Trad-MCN a répondu positivement jusqu'à des distances de 500 mètres de la décharge. L'autre décharge municipale choisie avait été fermée 3 ans plus tôt et recouverte d'une couche de terre. Des inflorescences placées à 80 et 1500 mètres de la décharge dans la direction des vents dominants présentaient un fort taux de micronoyaux. Tous ces tests ont été réalisés en conditions atmosphériques sèches et en conditions humides : les taux de micronoyaux étaient plus importants en conditions humides que lors d'un temps sec, et ce dans tous les cas.

Une autre source de contamination atmosphérique est liée au stockage et au traitement des déchets ménagers, et en particulier à leur incinération. Les émissions de composés à fort potentiel toxique qui en résultent constituent un problème majeur.

Des inflorescences de *Tradescantia* ont été transportées vingt fois pendant deux ans sur différents sites d'une décharge municipale et huit fois près d'un incinérateur de déchets aux Etats-Unis afin d'évaluer *in situ* la fréquence de micronoyaux. Après une durée d'exposition aux émissions gazeuses de 5 à 7 heures, les résultats du test des micronoyaux étaient positifs dans 6 cas

sur 20 pour la décharge et 5 cas sur 8 pour l'incinérateur. Ces réponses étaient clairement associées aux conditions atmosphériques (vent, température, humidité) et à la distance entre les plantes et la décharge ou la cheminée de l'incinérateur. Les auteurs ont dosé dans les émissions gazeuses de la décharge des composés organiques volatiles soupçonnés d'être à l'origine de la (géo)toxicité (toluène, éthylbenzène, trichloroéthylène et éthyltoluène) et les ont testés au laboratoire : tous les quatre ont induit un taux de micronoyaux significativement plus élevé (Ma et al., 1996).

Citons enfin une étude concernant des polluants atmosphériques peu communs : il s'agit des gaz fumigènes qu'emploie régulièrement l'armée américaine. Les auteurs souhaitaient contrôler l'impact de telles pratiques sur la flore des terrains d'entraînement. La fumée, utilisée pour réduire la visibilité des hommes, est générée notamment par du gas-oil et de l'hexachloroéthane. Ces deux composés ont été testés séparément sur le terrain à différentes distances des inflorescences de *Tradescantia* pendant 30 min : la fréquence de micronoyaux était significativement augmentée jusqu'à 50 mètres dans les deux cas. Les auteurs ont également déterminé un critère de toxicité classique : l'activité photosynthétique des feuilles de *Tradescantia* qui était altérée dans tous les cas testés (Schaeffer et al., 1987).

L'inconvénient majeur des études *in situ* réside dans l'influence des conditions climatiques sur la formation de micronoyaux : des températures très faibles ou à l'inverse très élevées peuvent induire un nombre important de micronoyaux dans les cellules de pollen (Ma, 1990a).

IV.1.5.8. Les radiations

La grande sensibilité du test *Tradescantia*-micronoyaux aux rayons X a été démontrée à l'aide du clone 03 : à titre d'exemple, des radiations de 20 rads ont induit 23 micronoyaux pour 100 tétrades chez *Tradescantia*, alors que 50 rads en induisaient 1,8 pour 100 cellules dans le cas des lymphocytes humains et que 35 rads provoquaient un taux de micronoyaux de 2,5 pour 100 érythroblastes de moelle osseuse de souris en culture (Ma, 1979b).

Par ailleurs, des effets synergiques ont été observés entre les rayons X et certains produits chimiques. L'acide tannique, mélange complexe de composés polyphénoliques, rencontré dans certaines boissons (telles que la bière, le thé ou le café) et dans l'industrie textile, s'est avéré génotoxique dans le test *Tradescantia*-micronoyaux. En effet, alors que le taux de micronoyaux du témoin était de 4,6/100 tétrades, 1 mM d'acide tannique suffisait à induire 8,9 MCN/100 tétrades.

La même étude a montré un effet synergique de l'acide tannique et des rayons X puisque ces derniers, testés seuls, ont induit 47,5 MCN/100 tétrades alors que l'exposition simultanée de l'acide tannique et des rayons X a provoqué la formation de 126,9 MCN/100 tétrades. Cette synergie, observée dans le cas où l'exposition des inflorescences à l'acide tannique est réalisée juste après leur traitement aux rayons X, est attribué par les auteurs à l'action inhibitrice de l'acide tannique sur les procédés de réparation de l'ADN (Knasmüller et al., 1992).

Enfin, des inflorescences de *Tradescantia* ont été exposées *in situ* à des radiations électromagnétiques provenant d'antennes de télévision dans un village d'Autriche. La fréquence de micronoyaux déterminée dans les bourgeons de *Tradescantia* était significativement supérieure à celle du témoin lorsque les inflorescences étaient maintenues à 15 et 30 m de l'antenne (Haider et al., 1994).

IV.1.5.9. Automatisation du test *Tradescantia*-micronoyaux

Malgré tous ses avantages, le test Trad-MCN présente cependant l'inconvénient de nécessiter un temps d'observation des cellules de pollen qui est relativement long, c'est pourquoi certains auteurs se sont intéressés à une éventuelle automatisation du test.

L'un des inconvénients du test *Tradescantia*-micronoyaux est le temps nécessaire à l'observation des cellules et au comptage des micronoyaux. Dans le but d'éliminer cette limite et de faciliter la standardisation de ce test, certains auteurs ont essayé de mettre au point un système d'analyse d'images (Xu et al., 1990). Une comparaison de la fréquence de micronoyaux a été réalisée entre le système d'analyse d'images et l'observation visuelle (Ma et al., 1992). Ceci a abouti à 90% de similitude entre les deux méthodes, avec un gain de temps intéressant ; le système d'analyse d'images s'est avéré 3,5 fois plus rapide que l'observation visuelle.

En définitive, le test *Tradescantia*-micronoyaux apparaît très polyvalent. En effet, ce test s'applique à l'étude des radiations, des produits chimiques (et aussi bien les substances organiques que les métaux) et des matrices contaminées : le potentiel génotoxique des sols, des déchets, des boues de STEP, des eaux, des effluents et de l'air est efficacement détecté. Les procédés de décontamination des sols et des eaux et les méthodes de stockage, de recyclage ou de valorisation agricole des déchets peuvent aussi être contrôlés par cette méthode. Il est même possible de réaliser ce test *in situ* dans le cadre de la pollution des sols et des eaux, mais

il faut noter qu'il est bien mieux adapté à des études *in situ* dans le cas de la pollution atmosphérique.

Nous retiendrons que *Tradescantia* constitue un matériel de choix en écogénotoxicologie. En effet, cette plante est capable de révéler le potentiel génotoxique des produits chimiques, aussi bien avec le test des micronoyaux qui est particulièrement sensible aux métaux qu'avec le test des mutations plus adapté à l'étude des effets de certaines substances organiques comme les agents alkylants. Concernant les sols, les déchets et les eaux, le test des micronoyaux s'est avéré plus efficace. Par contre, le test des mutations est davantage utilisé pour étudier les effets des radiations. Enfin, pour ce qui est de la problématique de l'air, les deux tests ont fait leur preuve, notamment pour les études *in situ*.

IV.2. *Vicia faba*

IV.2.1. Présentation générale de *Vicia faba*

Vicia faba, de la famille des papilionacées, est couramment nommée fève (broad bean, field bean ou encore horse bean en anglais). Elle est cultivée partout dans le monde, en particulier pour l'alimentation humaine dans les pays en voie de développement (Asie, Afrique) mais aussi dans les pays méditerranéens et le sud de la France. L'utilisation des fèves dans l'alimentation des chevaux a fortement diminué durant le 20^{ème} siècle en Europe, mais est toujours fréquente pour les porcs et la volaille. L'origine de *Vicia faba* L. n'est pas encore connue avec certitude, mais il semble qu'elle provienne du Proche-Orient et qu'elle ait déjà été cultivée au début du Néolithique (5000 av.J.C.).

Les différents types rencontrés sont *Vicia faba* major avec de grosses graines, *Vicia faba equina* dont les graines sont de taille moyenne et *Vicia faba* minor avec de petites graines. Le type d'espèce le plus fréquemment utilisé pour les tests de génotoxicité est *Vicia faba* major qui est cultivé en République Populaire de Chine, dans les pays méditerranéens et en Amérique du Sud. Ce cultivar présente un système racinaire composé d'une racine primaire et de nombreuses racines secondaires. Quant à la structure de son génome ($2n = 12$), cette plante possède des chromosomes de grande taille, qui peuvent donc se prêter à diverses analyses cytologiques dans l'étude des altérations du génome. Le caryotype de *Vicia faba* présente une paire de chromosomes métacentriques et cinq paires de chromosomes acrocentriques (Duc, 1997).

Différents critères de toxicité et de génotoxicité peuvent être déterminés à l'aide de cette plante. Seuls quelques auteurs ont mesuré l'élongation de la racine primaire en parallèle avec l'évaluation des critères de génotoxicité (De Marco et al., 1990 ; Misra et al., 1994). Le Tableau VII présente les différents critères de toxicité qui peuvent être utilisés en écotoxicologie avec *Vicia* ainsi que les critères de génotoxicité que nous allons présenter maintenant.

IV.2.2. Critères de génotoxicité déterminés sur *Vicia faba*

Les prémices de l'utilisation de *Vicia faba* dans l'étude des altérations du génome sont datés, selon Read (1959), de 1913 dans des expérimentations sur les effets de la radioactivité sur les chromosomes.

Dès les années 1960, *Vicia faba* a été sélectionnée pour étudier les effets des produits chimiques sur l'ADN. Les racines de *Vicia* ont surtout été utilisées pour l'évaluation des aberrations chromosomiques. Le test *Vicia*-aberrations chromosomiques a d'ailleurs été choisi dans une étude de comparaison inter-laboratoire ("International Programme on Chemical Safety"), dans laquelle ce test s'est avéré efficace pour détecter le potentiel génotoxique de diverses substances de référence (Kanaya et al., 1994). Par ailleurs, ce test est apparu assez sensible pour tester des substances chimiques aussi diverses que des herbicides (Jha et al., 1996), des agents alkylants tels que l'éthyl méthanesulfonate (Ahmed et Grant, 1972a), le méthyl méthanesulfonate (Kihlman et Sturelid, 1978) et le N-méthyl N-nitrosourée (Baranczewski et al., 1997), des composés benzéniques (Amer et Ali, 1974), etc... De nombreuses autres études sont résumées dans la revue de Ma (1982).

Il faut noter que les aberrations chromosomiques peuvent aussi être détectées dans les cellules de pollen, mais c'est néanmoins très rare (Amer et Ali, 1974).

D'autres critères peuvent aussi être évalués dans les racines de *Vicia faba* : la polyploïdie (De Kergommeaux et al., 1983), les échanges de chromatides sœurs (Kihlman et Sturelid, 1978 ; Tempelaar et al., 1982 ; Cortes et Andersson, 1987 ; Gerster et Grant, 1989 ; Schubert et Heindorff, 1989 ; Chroust et al., 1997 ; Gomez-Arroyo et al., 1997) et récemment le test des comètes (Koppen et Verschaeve, 1996).

Le critère "aberrations chromosomiques" est depuis une dizaine d'années un peu moins utilisé au profit d'un autre critère plus facile et plus rapide à déterminer : il s'agit de la fréquence de micronoyaux (test *Vicia*-MCN). Ce critère a été utilisé, dès 1969, par Arora et al. pour détecter le potentiel clastogène de substances chimiques, en l'occurrence la mitomycine C, dans les racines de *Vicia*. Le protocole a récemment été redéfini par Ma et al. (1995). La sensibilité du test des micronoyaux a été démontrée égale ou supérieure à celle du test des aberrations chromosomiques chez *Vicia faba* (Degrassi et Rizzoni, 1982 ; De Marco et al., 1988 ; De Marco et al., 1990 ; Grant et al., 1992).

Notons que la formation de micronoyaux peut être évaluée dans les feuilles (Guangrong, 1990) mais dans les applications de ce test que nous présenterons ci-dessous, ce sont les cellules racinaires qui sont utilisées.

IV.2.3. Le test *Vicia-micronoyaux* (*Vicia-MCN*)

IV.2.3.1. Principe

Les tests se font principalement sur *Vicia faba* major et dans une moindre mesure sur *Vicia faba* minor. Il existe aussi d'autres variétés qui peuvent être employées dans ce test, chaque laboratoire utilisant celle qui est disponible dans son pays (Ma et al., 1995).

Le comptage des micronoyaux se fait en général dans les racines secondaires mais certaines études peuvent être réalisées avec les racines primaires (De Marco et al., 1990 ; De Simone et al., 1992 ; De Marco et De Simone, 1994 ; De Simone et al., 1995). Il s'agit donc d'exposer les racines à une solution de produits chimiques à tester ou à des matrices complexes en phase liquide ou solide (eaux, effluents, sédiments, sols, etc...) et d'examiner les cellules des extrémités racinaires après une période minimale de 30 heures. Cette période de 30 heures correspond à la durée moyenne entre le traitement des cellules méristématiques qui doit se faire durant la division cellulaire et le comptage des micronoyaux dans les cellules en interphase (ou début de prophase) lorsque le cycle mitotique est terminé. Dans le cas où le traitement est inférieur à 30 heures, il s'agit alors de transférer les graines germées dans un milieu nutritif pour que les cellules terminent leur division, cette période est appelée période de récupération (Ma et al., 1995). Cependant, cette période peut être plus longue dans le cas où un délai mitotique est provoqué par les produits testés, c'est-à-dire lorsque ces produits retardent la division cellulaire. Dans ce cas, 30 heures ne sont pas suffisantes pour rendre les micronoyaux visibles. Certains auteurs choisissent des durées supérieures : 62 heures pour l'exposition de *V. faba* à la mitomycine C ou au méthyl méthanesulfonate (Degrassi et Rizzoni, 1982), 84 heures dans le cas des lanthanides (Jha et Singh, 1994).

Une très petite quantité de cellules méristématiques se divisent transversalement pour accroître la circonférence de la racine mais la majorité d'entre elles se divisent de façon longitudinale contribuant ainsi à l'élongation racinaire. Par conséquent, une très grande partie des micronoyaux formés va se retrouver dans les cellules filles de la région F1 définie par Ma et al. (1995) qui recommandent de ne prélever que cette partie de la racine pour le comptage des micronoyaux (Figure 8). D'autres auteurs pensent que des erreurs peuvent se produire lors du prélèvement de la région F1 et prélèvent donc toute l'extrémité, c'est-à-dire les régions M et F1 (Minissi et Lombi, 1997).

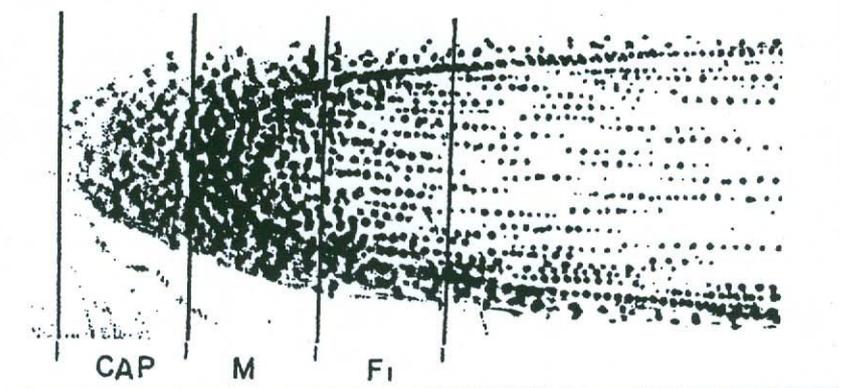


Figure 8 : Section longitudinale d'une racine d'*Allium cepa* avec la coiffe (cap), les cellules méristématiques (M) et les cellules filles (F1). (Ma *et al.*, 1995)

Les résultats sont généralement exprimés en nombre de micronoyaux pour 1000 cellules observées. Il faut noter cependant que certains auteurs définissent ce critère en nombre de cellules micronucléées (De Marco *et al.*, 1986 ; De Marco *et al.*, 1988 ; Jha et Singh, 1994).

Le taux de micronoyaux spontanés de *Vicia* est très faible (De Marco *et al.*, 1986) : en général compris entre 0 et 0,5 micronoyau (MCN) pour 1000 cellules selon les laboratoires. Ce taux augmente avec le traitement des racines de *Vicia* par des substances de référence telles que la mitomycine C (35 μ M) qui a induit 53 MCN/1000 cellules (Degrassi et Rizzoni, 1982). Par contre, lorsque ce sont des matrices complexes qui sont testées, la fréquence de micronoyaux pourtant significativement différente de celle du témoin est généralement peu élevée : 6 MCN/1000 cellules pour des échantillons d'eau (Ma *et al.*, 1995), 2 MCN/1000 cellules pour des échantillons de sédiment (Minissi et Lombi, 1997).

Après avoir détaillé les modes d'exposition des organismes lors du test *Vicia*-MCN, nous résumerons différentes applications de ce test aux substances chimiques et aux matrices contaminées (sol, déchets et eau).

IV.2.3.2. Modes d'exposition de *Vicia*

Dans la majeure partie des études effectuées sur *Vicia faba*, les analyses cytologiques se font sur les cellules des extrémités racinaires de la plante. Il s'agit donc de la faire germer dans un premier temps en induisant la formation de racines primaires puis de racines secondaires. Ensuite, le traitement des racines secondaires est réalisé en immergeant celles-ci dans les solutions à tester, les effluents, les lixiviats de sols contaminés, etc... . Lors du traitement, les solutions doivent contenir une quantité minimale en oxygène pour que les cellules racinaires présentent des effets génotoxiques. Read et Kihlman (1956) ont montré par exemple qu'une concentration minimale de 10% d'oxygène était nécessaire pour que des cassures de chromosomes puissent être détectées lors du traitement de *Vicia faba* à une solution de 8-ethoxycaféine.

Une approche directe est également réalisable dans le cas des sols contaminés, puisque les racines peuvent croître directement dans les sols et absorber ainsi les micropolluants (De Marco et al., 1990 ; De Simone et al., 1992 ; De Marco et De Simone, 1994 ; Steinkellner et al., 1998). D'autres auteurs ont testé des échantillons d'eau et des sédiments prélevés dans une rivière en faisant germer les graines directement dans un mélange de vermiculite et de chacun des échantillons (sédiment ou eau) (Minissi et Lombi, 1997).

IV.2.3.3. Les substances chimiques

Le tableau X illustre bien la polyvalence du test *Vicia*-MCN puisque de nombreux groupes de la table périodique des éléments sont représentés, qu'ils soient organiques ou métalliques. Notons par exemple les lanthanides tels que le néodyme et le praséodyme qui appartiennent au groupe III. Les lanthanides, présents dans la lithosphère, sont de plus en plus employés dans l'industrie et se sont avérés très génotoxiques pour *Vicia faba* (Jha et Singh, 1994). Ce test a également été efficace pour la détection du potentiel génotoxique d'insecticides (parathion, demeton, etc...), de fongicides (captan, folpet, etc...) (deKergommeaux et al., 1983) et d'herbicides (alachlor) mélangés à des sols (De Marco et al., 1990).

Le test Vicia-MCN a même été utilisé pour tester le contenu hydrosoluble de la fumée de cigarette (Ji et Chen, 1996). En effet, la fumée de cigarettes de dix marques différentes a été prélevée et des extraits hydrosolubles ont été préparés et mis en contact avec les racines de *V. faba*. Tous les échantillons ont induit un taux de micronoyaux important. Les auteurs ont aussi ajouté des

Substance chimique	Durée d'exposition	Domaine de concentrations	Référence bibliographique
1,2-dibromoéthane	2 h (+ 36 h) 6 h (+ 24 h)	5 mM 2 mM	Steinkellner <u>et al.</u> , 1998 Knasmüller <u>et al.</u> , 1998
acide nitrilotriacétique	24 h (+ 24 h)	2 - 4 mM	De Marco <u>et al.</u> , 1986
Atrazine	4 jours	0,7 - 7 mg/kg sol	De Simone <u>et al.</u> , 1992
bromure d'éthidium	24 h (+ 40 h)	16 µM	Degrassi et Rizzoni, 1982
chlorure de cadmium	24 h (+ 24 h) 30 h 2 h (+ 36 h)	400 - 800 µM 500 µM 50 - 100 mM	De Marco <u>et al.</u> , 1988 Radetski, 1996 Steinkellner <u>et al.</u> , 1998
chlorure de zinc	2 h (+ 36 h)	500 mM	Steinkellner <u>et al.</u> , 1998
Colchicine	24 h (+ 40 h) 24 h (+ 40 h)	30 - 300 µM 10 - 300 µM	Degrassi et Rizzoni, 1982 Gustavino <u>et al.</u> , 1987
Cyclophosphamide	2 h (+ 48 h)	15 µM	Sandhu et Acedo, 1988
dichromate de potassium	24 h (+ 48 h)	20 - 100 µM	De Marco <u>et al.</u> , 1988
éthyl méthanesulfonate	2 h (+ 22 h)	2,4 mM	De Kergommeaux <u>et al.</u> , 1983
Formaldéhyde	6 h (+ 44 h)	50 mM	Ma <u>et al.</u> , 1995
Glyphosate	8 jours	0,35 - 1 mg/kg sol	De Simone <u>et al.</u> , 1992
Griséofulvine	2 h (+ 48 h)	28 - 283 µM	Sandhu et Acedo, 1988
hydrazide maléique	2 h (+ 48 h) 48 - 96 h	45 - 268 µM 1 mg/kg sol	Sandhu et Acedo, 1988 De Simone <u>et al.</u> , 1994
méthyl méthanesulfonate	2 h (+ 46 h) 1 h (+ 63 h)	8 mM 1 - 9 mM	Chroust <u>et al.</u> , 1997 Degrassi et Rizzoni, 1982
mitomycine C	1 h (+ 61 h) 6 h (+ 44 h)	2,2 - 35 µM 2,2 - 4,4 mM	Degrassi et Rizzoni, 1982 Ma <u>et al.</u> , 1995
nitrate de plomb	2 h (+ 36 h)	4 mM	Steinkellner <u>et al.</u> , 1998
oxyde de néodyme	12 h (+ 60 h)	3 - 15 mM	Jha et Singh, 1994
oxyde de praséodyme	12 h (+ 60 h)	3 - 15 mM	Jha et Singh, 1994
trioxyde d'arsenic	2 h (+ 36 h)	3,5 - 5 mM	Steinkellner <u>et al.</u> , 1998

Tableau X: Exemples de résultats positifs du test *Vicia*-micronoyaux appliqué à des substances chimiques. La durée inscrite entre parenthèses est la durée de récupération succédant à la période de traitement.

solutions de nicotinamide adénine, de vitamine C, de sélénite de sodium et de polyphénol de thé aux extraits de fumée de cigarette et ont mis en évidence que ces solutions diminuaient chacune le pouvoir clastogène des substances contenues dans la fumée de cigarette.

Les relations entre concentration et formation de micronoyaux sont relativement linéaires. Lorsque les concentrations en produits génotoxiques augmentent, le taux de micronoyaux augmente dans un premier temps puis diminue à partir d'une certaine dose, ce qui est dû à l'effet cytotoxique (révélé par exemple par l'indice mitotique) (Degrassi et Rizzoni, 1982 ; AFNOR, 1998).

Les substances chimiques peuvent présenter des effets synergiques entre eux, comme cela a été démontré entre la caféine et l'acide nitrilotriacétique (substitut des polyphosphates dans les lessives) à des doses non génotoxiques quand ils sont testés séparément (De Marco et al., 1986). L'acide nitrilotriacétique interagit également avec des sels de cadmium comme le CdCO_3 ou des sels de chrome tel que PbCrO_4 qui n'induisent pas de micronoyaux dans les racines de *Vicia* sans ajout de l'acide. Il est probable que l'interaction entre ces substances mobilise les ions Cd^{2+} et CrO_4^{2-} qui, mieux solubilisés dans l'eau, seraient capables de pénétrer dans la plante plus facilement (De Marco et al., 1988).

IV.2.3.4. Les sols contaminés

La majeure partie des essais réalisés à l'aide du test *Vicia*-MCN dans le domaine terrestre a été menée sur des sols artificiellement contaminés au laboratoire. Les graines sont directement mises à germer dans les sols.

Il est intéressant d'étudier les effets des pesticides en les mélangeant à des sols de façon à reproduire les conditions dans lesquelles les plantes se trouvent dans le milieu naturel. C'est ainsi que l'herbicide alachlor a été ajouté à deux sols de nature différente : l'un argileux et l'autre plutôt sableux et contenant beaucoup de matières organiques. L'alachlor a induit un fort taux de micronoyaux dans les racines de *Vicia* et une forte diminution de sa croissance racinaire seulement dans le cas du sol pauvre en matières organiques. Cette étude montre bien l'importance de la constitution du sol dans l'induction d'effets génotoxiques, en particulier le rôle des matières organiques qui adsorbent l'alachlor, le rendant ainsi moins disponible pour les plantes (De Marco et al., 1990).

Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude relative à l'étude d'autres herbicides : l'atrazine et le glyphosate sur les racines de *Vicia faba*. En effet, l'atrazine n'a induit de micronoyaux que dans les racines qui ont poussé pendant quatre jours dans le sol le plus pauvre en matières organiques. L'atrazine semble être rapidement adsorbé par les matières organiques, ce qui est expliqué par les auteurs par un probable mécanisme d'interaction entre l'atrazine donneur d'électrons et les substances humiques acceptrices d'électrons. Cette différence de génotoxicité des herbicides en fonction des caractéristiques des sols était bien moins marquée avec le glyphosate qui est aussi adsorbé par les matières organiques mais cette interaction présente une réversibilité beaucoup plus rapide que dans le cas de l'atrazine (De Simone et al., 1992).

Une étude ultérieure a permis de détailler et d'expliquer ces observations, mais cette fois en mélangeant de l'hydrazide maléique (1 mg/kg) à neuf sols caractérisés par des contenus en matières organiques différents. Les graines étaient mises à germer dans un sol dépourvu en matières organiques, puis exposées pendant 2 jours aux neuf sols artificiellement contaminés. La proportion de cellules micronucléées était alors la plus forte dans les sols contenant le moins de matières organiques. Là encore, il semblerait que l'hydrazide maléique ait été adsorbé par les matières organiques.

Ce qui est intéressant, c'est que les mêmes observations ont été faites lorsque les graines étaient mises à germer dans les neuf sols non contaminés puis exposées au sol contaminé qui contenait le moins de matières organiques (le même sol pour toutes les graines) : la fréquence de micronoyaux était la plus forte dans les cas où les graines avaient été mises à germer dans les sols les plus pauvres en matières organiques. Dans cette dernière expérimentation, l'activité génotoxique de l'hydrazide maléique est donc conditionnée par les caractéristiques des sols non contaminés dans lesquels étaient mises à germer les graines. Les auteurs expliquent ce phénomène pour le moins étonnant par le fait que les substances humiques (acide humique et acide fulvique) des matières organiques étaient absorbées par les racines et inhibaient ensuite l'activité génotoxique de l'hydrazide maléique dans les plantes (De Marco et al., 1995). Cette inhibition pourrait être la conséquence du blocage des synthèses protéiques et des activités enzymatiques (peroxydase, phosphorylase, etc...) par les substances humiques (De Marco et De Simone, 1994 ; De Simone et al., 1994).

L'influence des substances humiques des sols sur la génotoxicité de l'hydrazide maléique a été confirmée par De Simone et al. (1995). En effet, des graines de *Vicia* ont germé dans un sol sans

substances humiques. Puis un mélange d'hydrazide maléique et d'extraits humiques a été ajouté à ce sol six heures après sa préparation. Le nombre de cellules micronucléées était significativement diminué par rapport au témoin, ce qui démontre une fois de plus l'importance des substances humiques sur l'activité génotoxique de l'hydrazide maléique.

IV.2.3.5. Les déchets

Assez peu d'études ont été réalisées sur les déchets. Radetski (1996) a testé le lixiviat de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères (MIOM) à l'aide du test *Vicia*-MCN. Ces mâchefers sont des cendres provenant des fours où sont brûlées les ordures ménagères. L'auteur a mis en évidence un taux de micronoyaux significativement plus élevé dans les racines exposées par rapport au témoin dès la concentration de 3,4 % de lixiviat.

IV.2.3.6. La pollution aquatique

Dans le domaine aquatique, le test *Vicia*-MCN s'est révélé efficace pour détecter le potentiel génotoxique d'échantillons d'eau, de sédiment ou d'effluent soupçonnés d'être contaminés.

La fréquence de micronoyaux a été déterminée dans les racines de *Vicia faba* minor après exposition à des effluents industriels prélevés dans une ville du Mexique (Ma et al., 1995). Le nombre de micronoyaux obtenu était certes significativement supérieur à celui du témoin, mais restait néanmoins assez faible.

Le test *Vicia*-micronoyaux a été sélectionné pour évaluer la génotoxicité d'échantillons d'eau et de sédiments prélevés dans le Tibre (contaminé par des produits phytosanitaires et par des effluents urbains et industriels) à quatre endroits différents de Rome. Tous les échantillons d'eau et de sédiment ont induit un nombre élevé de micronoyaux dans l'ensemble des sites testés (Rizzoni et al., 1995). Ces résultats ont été confirmés cinq ans plus tard et des teneurs importantes en métaux (Zn, Cu, etc...) ont été mises en évidence dans les sédiments du Tibre (Minissi et Lombi, 1997).

IV.2.3.7. Les radiations

Vicia est également sensible aux radiations ionisantes puisque de faibles doses de rayons X (2 rads) suffisent à induire un nombre statistiquement significatif de micronoyaux chez *Vicia* (Rizzoni et al., 1987). C'est aussi le cas des gamma-radiations générées par le ⁶⁰Co (Marshall et

Bianchi, 1983 ; Kuglik et Veselska, 1994). Dans tous les cas, la relation dose-réponse présente une forte linéarité.

En conclusion, le test *Vicia*-micronoyaux a été efficacement appliqué à l'étude des radiations ionisantes, au screening des produits chimiques, métalliques et organiques, à l'évaluation du potentiel génotoxique des sols artificiellement contaminés au laboratoire et à des échantillons de déchet, d'eau, de sédiment et d'effluent. Ces milieux contaminés peuvent être testés directement ou par l'intermédiaire de lixiviats. Les graines de fève sont en général directement mises à germer dans les sols. Contrairement à *Tradescantia*, nous n'avons pas répertorié d'études *in situ*.

IV.3. *Allium cepa*

IV.3.1. Présentation générale d'*Allium*

Allium cepa ($2n = 16$), l'oignon, fait partie de la famille des alliacées. Cette plante est cultivée dans de très nombreux pays pour son usage alimentaire. Le caryotype présente cinq paires de chromosomes (de 8 à 16 μm) avec des centromères situés de façon médiane à submédiane, deux paires dans lesquelles les centromères sont submédians et une paire de chromosomes satellites (Grant, 1982a).

Différentes variétés d'oignon peuvent être utilisées (Ma et al., 1995) dont notamment une variété mexicaine à petits bulbes, une variété américaine à gros bulbes jaunes et une troisième variété à petits bulbes blancs appelés, en France, oignons blancs printaniers.

Allium cepa permet l'évaluation de divers critères de toxicité et de génotoxicité (Tableau VII). Pour ce qui est de la toxicité, contrairement à *Vicia faba*, l'élongation racinaire d'*Allium cepa* est très souvent déterminée en parallèle avec les études de génotoxicité (cf. revue de Fiskesjö, 1997). Ce critère présente une bien meilleure répétabilité et une plus grande facilité de mesure pour *Allium* que pour *Vicia* car les racines d'*Allium* poussent de façon très homogène et forment un ensemble de racines de longueur égale.

IV.3.2. Les critères de génotoxicité déterminés sur *Allium cepa*

Allium cepa est utilisé depuis longtemps dans les études sur les chromosomes et en particulier sur les effets des rayons X (Marshak, 1937) mais c'est Levan qui fut, en 1938, le premier scientifique à évaluer les effets du traitement d'*Allium cepa* à un produit chimique, à savoir la colchicine. La modification du comportement mitotique due à la colchicine fut baptisé c-mitose qui se traduit en fait par une modification du nombre de chromosomes.

Les racines d'*Allium cepa* ont surtout été utilisées pour évaluer le nombre d'aberrations chromosomiques. Ce critère s'est avéré très sensible pour détecter le potentiel génotoxique de produits chimiques (Fiskesjö, 1997), métaux (Fiskesjö, 1988 ; Liu et al., 1994a, b, c ; Borboa et De la Torre, 1996) produits phytosanitaires (Butt et Vahidy, 1994) ou autres substances organiques (Cortes et al., 1985). La revue de Grant (1982a) montre que, sur 148 produits chimiques étudiés avec ce test, 76 % ont donné une réponse positive.

Ce test s'est également montré efficace dans l'étude de la génotoxicité de :

- sols prélevés dans la région de Tchernobyl et présentant une forte radio-activité (Kovalchuk et al., 1998)
- lixiviats de déchets d'industries métallurgiques et chimiques (Odeigah et al., 1997a)
- eau de rivière (Fiskesjö, 1985 ; Smaka-Kincl et al., 1996)
- eau de pluie dans des régions industrialisées (Al-Sabti, 1989)
- effluents industriels (Smaka-Kincl et al., 1996)
- effluents de papeteries et d'industries métallurgiques et chimiques (Nielsen et Rank, 1994)
- effluents d'une raffinerie de pétrole (Al-Sabti, 1989)
- effluents de tannerie (Thangapandian et al., 1995)
- effluents d'industries pétrochimiques (Odeigah et al., 1997b)

D'autres critères ont aussi été étudiés dans les racines d'*Allium cepa* : les échanges de chromatides sœurs (Cortes et al., 1985 ; Panda et al., 1996 ; Khora et al., 1997) et très récemment, le test des comètes, mais cet aspect sera développé dans le paragraphe sur ce test (cf. § IV.4.2.) (Navarrete et al., 1997).

Enfin, de la même façon que dans le cas de *Vicia faba*, le critère "micronoyaux" évalué dans les racines d'*Allium* est de plus en plus utilisé dans les études de génotoxicité (test Allium-MCN). Au niveau de la sensibilité des deux tests, quelques études sur *Allium cepa* ont démontré qu'il y avait peu de différences entre le test des micronoyaux et le test des aberrations chromosomiques (Dash et al., 1988 ; Panda et al., 1992 ; Rank et Nielsen, 1997). Fiskesjö (1997) a mis en évidence une corrélation entre la fréquence de micronoyaux et le nombre d'aberrations chromosomiques dans les racines d'*Allium cepa* après exposition à du paraquat.

Nous détaillerons donc le principe et les applications possibles du test des micronoyaux dans le prochain paragraphe.

IV.3.3. Le test *Allium*-micronoyaux (*Allium*-MCN)

IV.3.3.1. Principe

Le principe est exactement le même que celui de *Vicia faba* (cf.§ IV.2.3.1), c'est-à-dire que les bulbes sont généralement mis à germer puis, après exposition des racines aux solutions ou aux matrices complexes, les cellules racinaires sont observées et les micronoyaux dénombrés.

Le taux de micronoyaux spontanés est en général compris entre 0 et 0,5 micronoyau (MCN) pour 1000 cellules selon les laboratoires. Les fréquences de micronoyaux obtenues après traitement des racines d'*Allium cepa* à des substances de référence sont de 24 MCN/1000 cellules pour le méthyl méthanesulfonate (90 µM) (Rank et Nielsen, 1997) et de 105 MCN/1000 cellules pour le chlorure de méthylmercure (1 mg/l) (Dash et al., 1988). En revanche, les matrices complexes induisent en général de très faibles taux de micronoyaux, par exemple 0,8 MCN/1000 cellules a été obtenu avec l'extrait aqueux d'un sol contaminé et présenté comme un taux significativement supérieur à celui du témoin par les auteurs (Monarca et al., 1997a).

IV.3.3.2. Modes d'exposition d'*Allium*

Les bulbes peuvent être placés dans la solution à tester après germination, c'est le mode d'exposition le plus courant, mais ils peuvent aussi être mis directement en contact avec la solution avant toute germination. Ce dernier protocole a été proposé par Fiskesjö (1985) mais est assez peu utilisé (Panda et al., 1992 ; Liu et al., 1994a, b et c).

Lorsque les racines d'*Allium cepa* sont placées dans les solutions à tester, il est nécessaire de maintenir une oxygénation satisfaisante du milieu pendant le traitement. Pour cela, il suffit de placer un système de bullage dans les récipients, mais certains auteurs préfèrent changer régulièrement les solutions pour éviter l'élimination des substances volatiles et renouveler les éléments nutritifs (Fiskesjö, 1994 ; Smaka-Kincl et al., 1996 ; Rank et Nielsen, 1997).

Enfin, de même que pour *Vicia faba*, les bulbes d'oignon peuvent être mis à germer dans des sols contaminés pour évaluer leur potentiel génotoxique, mais cette approche est extrêmement rare (Dash et al., 1988).

IV.3.3.3. Les substances chimiques

Le test *Allium*-micronoyaux a été employé pour tester la génotoxicité de divers composés organiques tels que des pesticides et des toxines et des métaux (Tableau XI). Une étude originale de Chetia et al. (1996) a mis en évidence le caractère génotoxique d'extraits de noix d'arec largement consommées en Inde comme masticatoire. Citons également la tétrodotoxine extraite d'un poisson et qui est extrêmement bien connue dans les pays asiatiques pour être à l'origine d'intoxications alimentaires. Cette substance a aussi donné une réponse positive dans le test Allium-MCN (Khora et al., 1997).

IV.3.3.4. Les sols contaminés

L'efficacité du test Allium-MCN a été démontrée par quelques études portant sur des sols artificiellement ou réellement contaminés. Les bulbes peuvent être mis à germer dans ces matrices ou placés après germination dans les extraits aqueux de sols.

Des bulbes non germés d'*Allium cepa* ont été placés dans des sols constitués de terre et de sable dans des proportions de 1:2 qui ont été artificiellement contaminés avec quatre composés mercuriques différents. Ce mode d'exposition direct a été comparé avec celui qui est couramment utilisé, c'est-à-dire lorsque les racines sont mises en contact avec les produits en phase liquide. La durée d'exposition, ainsi que la concentration de chacun des produits était la même dans les deux cas (en g/kg en phase solide et en g/l en phase liquide). Chacun des quatre produits a donné une réponse positive dans les deux approches. Toutefois, le test Allium-MCN est apparu moins sensible en phase solide qu'en phase liquide (Dash et al., 1988).

Des échantillons de sol prélevés en Lombardie, région fortement industrialisée de l'Italie (Monarca et al., 1997a), ont été testés à l'aide du test *Allium*-micronoyaux. Le premier sol, prélevé trois fois à 20 cm de profondeur, était principalement contaminé par des métaux lourds (Zn, Pb, Cu, etc...). Aucun des extraits aqueux n'a induit de micronoyaux ou d'aberrations chromosomiques chez *Allium cepa*. Le deuxième sol, prélevé sur le site d'une usine, contenait d'importantes concentrations en métaux (Pb, Zn, etc...) et en HAPs (benzo(a)pyrène, fluoranthrène, etc...). Seul l'extrait aqueux de l'un des quatre prélèvements induisait une légère augmentation de micronoyaux mais aucun d'entre eux ne provoquait d'aberrations chromosomiques.

Substance chimique	Durée d'exposition	Domaine de concentrations	Référence bibliographique
1,2-dibromoéthane	2 h (+ 36 h)	5 mM	Steinkellner <u>et al.</u> , 1998
2,4-D	3 h (+ 24 - 48 h)	339 - 452 µM	Kumari et Vaidyanath, 1989
acide nitrilotriacétique	24 h (+ 24 h)	4 mM	De Marco <u>et al.</u> , 1986
chlorure de cadmium	2 h (+ 36 h)	50 - 100 mM	Steinkellner <u>et al.</u> , 1998
chlorure de zinc	2 h (+ 36 h)	500 - 1000 mM	Steinkellner <u>et al.</u> , 1998
chlorure d'aluminium	48 h	1 mM	Liu <u>et al.</u> , 1995
chlorure de méthylmercure	3 h (+ 18 h) 96 h 2 h (+ 15 - 24 h) 48 h 120 h	1,3 µM 0,4 µM 1,2 µM 2 µM 0,004 - 4 µM	Panda <u>et al.</u> , 1995 Panda <u>et al.</u> , 1992 Reddy <u>et al.</u> , 1995 Subhadra et Panda, 1992 Dash <u>et al.</u> , 1988
chlorure de mercure	96 h 120 h	3,7 µM 0,4 - 3,4 µM	Panda <u>et al.</u> , 1992 Dash <u>et al.</u> , 1988
Colchicine	2 h (+ 6 - 15 h)	250 µM	Reddy <u>et al.</u> , 1995
éthyl méthanesulfonate	48 h	806 µM	Rank et Nielsen, 1997
formaldéhyde	6 h (+ 44 h)	25 - 50 mM	Ma <u>et al.</u> , 1995
hydrazide maléique	6 h (+ 44 h) 3 h (+ 24 h) 48 h 2 h (+ 24 - 30 h) 48 h	0,01 - 1 mM 0,3 mM 45 - 89 µM 0,3 mM 0,1 mM	Ma <u>et al.</u> , 1995 Panda <u>et al.</u> , 1995 Rank et Nielsen, 1997 Reddy <u>et al.</u> , 1995 Subhadra et Panda, 1992
méthyl nitrosourée	48 h	0,13 - 1,3 mM	Rank et Nielsen, 1997
méthyl méthanesulfonate	48 h	90 µM	Rank et Nielsen, 1997
nitrate de chrome	48 h	0,2 µM	Liu <u>et al.</u> , 1995
nitrate de plomb	48 h 2 h (+ 36 h)	1 µM 4 mM	Liu <u>et al.</u> , 1994c Steinkellner <u>et al.</u> , 1998
Paraquat	48 h	4 - 400 µM	Fiskesjö, 1997
Saccharine	6 h (+ 44 h)	80 - 120 mM	Ma <u>et al.</u> , 1995
sulfate de magnésium	48 h 24 h	1 µM 10 µM	Liu <u>et al.</u> , 1994b Liu <u>et al.</u> , 1995
sulfate de manganèse	48 h	1 - 100 mM	Liu <u>et al.</u> , 1995
térodotoxine	1 h (+ 6 - 24 h)	30 µM	Khora <u>et al.</u> , 1997
thiometon (pesticide)	2 h	4 - 40 mM	Grover et Malhi, 1988
thioridazine-HCl	48 h	1,2 - 5 µM	Fiskesjö, 1997
trioxyde d'arsenic	2 h (+ 36 h)	2,5 - 5 mM	Steinkellner <u>et al.</u> , 1998

Tableau XI: Exemples de résultats positifs du test *Allium*-micronoyaux appliqué à des substances chimiques. La durée inscrite entre parenthèses est la durée de récupération succédant à la période de traitement

IV.3.3.5. Les déchets

Des échantillons de déchets contaminés au mercure provenant d'une usine de Ganjam, Inde, ont été ajoutés à un sol de nature sableuse (Panda et al., 1989). Les bulbes d'oignon étaient placés directement dans ce mélange, sans germination préalable. L'élongation racinaire diminuait, alors que la fréquence de micronoyaux et la concentration de mercure dans les racines augmentaient avec la concentration de déchets dans le sol.

IV.3.3.6. La pollution aquatique

Les expérimentations présentées ci-dessous mettent en évidence la sensibilité du test *Allium-MCN* dans le cas d'effluents et d'échantillons d'eau. Là encore, les bulbes peuvent être mis en contact avec ces matrices avec ou sans germination préalable.

Des échantillons d'effluent industriel contenant de fortes teneurs en mercure et d'eau prélevée en aval d'une usine en Inde ont induit un nombre de micronoyaux significativement supérieur à celui du témoin, ce qui n'était pas le cas des échantillons d'eau collectés en amont de l'usine. Les auteurs ont constaté une étroite corrélation entre la fréquence de micronoyaux, la concentration du mercure dans les racines d'*Allium* et dans les échantillons d'eau (Panda et al., 1990 ; Panda et al., 1992).

De la même façon, l'effluent d'une tannerie en Inde a été testé à l'aide du test *Allium-MCN*, ainsi que des échantillons d'eau de la rivière dans laquelle se jette cet effluent : un échantillonnage a été réalisé à l'endroit de rejet et un autre un peu plus loin. Seul le dernier échantillon ne présentait plus de génotoxicité à une concentration de 25 %. Les auteurs attribuent cet effet génotoxique au fait que les effluents de tannerie contiennent des substances très variées tels que des métaux (chrome, magnésium, etc...) et des substances organiques (Thangapandian et al., 1995).

En outre, un effluent d'une raffinerie de sucre a induit de nombreux micronoyaux et aberrations chromosomiques dans les racines d'*Allium cepa* (Kaushik et al., 1997).

Enfin, la génotoxicité d'échantillons d'eau de différente nature a été évaluée en plaçant les bulbes directement dans les solutions à tester pendant 7 jours sans germination préalable. Des réponses positives du test *Allium-MCN* ont été obtenues avec des eaux résiduaires d'origine urbaine

et des eaux contenant des effluents d'industries chimiques, métallurgiques et textiles. Notons que le nombre de micronoyaux était, dans la plupart des cas, plus important après le traitement des eaux qu'avant (Smaka-Kincl et al., 1996).

IV.3.3.7. Les radiations

Une étude comparative des effets des rayons X sur les racines de *Vicia* et d'*Allium* a permis de constater la plus grande sensibilité d'*Allium cepa* vis-à-vis de ces radiations (Ma et al., 1995).

En conclusion, le test *Allium*-micronoyaux s'est avéré beaucoup plus utile pour mettre en évidence la génotoxicité de substances chimiques et d'échantillons d'eau et d'effluent que de sols et de déchets. Ces milieux contaminés peuvent être testés directement ou par l'intermédiaire de lixiviats. Les bulbes peuvent être mis en contact avec ces matrices avec ou sans germination préalable. De la même façon que pour *Vicia*, nous n'avons pas répertorié d'études *in situ* réalisées avec le test *Allium*-MCN. Enfin, ce test a assez peu été utilisé dans l'étude des effets des radiations.

IV.4. Le test des comètes

IV.4.1. Historique

Le test des comètes, ou Comet assay en anglais, encore appelé “single cell gel electrophoresis assay” (SCGE) ou “microgel electrophoresis assay” (MGE) mesure les cassures de brin d’ADN dans des cellules individuelles.

Rydberg & Johanson (1978) furent les premiers à déterminer les dommages de l’ADN dans des cellules individuelles incluses dans un gel d’agarose et lysées dans des conditions légèrement alcalines permettant un déroulement partiel de l’ADN. Après neutralisation, les cellules étaient colorées à l’acridine orange et les dommages de l’ADN étaient quantifiés en mesurant le rapport de la fluorescence verte (indiquant l’ADN double brin) et de la fluorescence rouge (révélant l’ADN simple brin). En 1984, Östling et Johanson ont ajouté une étape à cette technique : après la lyse des cellules incluses dans un gel d’agarose, elles subissent une électrophorèse dans des conditions neutres et sont marquées à l’aide d’un colorant fluorescent : le bromure d’éthidium. Lors de l’électrophorèse, les molécules d’ADN étant chargées négativement, les fragments cassés ou relaxés vont davantage migrer vers l’anode et former ainsi une image ressemblant fortement à des comètes. Le test était alors baptisé, il restait à Singh et al. (1988) à améliorer ce protocole, car les conditions de lyse étaient inefficaces pour enlever toutes les protéines. Des conditions de lyse plus rigoureuses induisant la perte de 95% des protéines cellulaires ont été obtenues en réalisant les étapes de lyse et d’électrophorèse en conditions fortement alcalines (pH > 12,3) qui facilitent ainsi la dénaturation, le déroulement de l’ADN et l’expression des cassures simple brin et des “lésions alcali-labiles” en plus des cassures double brin.

Aujourd’hui, le protocole de Singh et al. (1988) sert de référence à la grande majorité des études publiées dans ce domaine. Des systèmes d’analyse d’images permettent de mesurer des paramètres densitométriques et géométriques et d’augmenter ainsi la sensibilité et la rapidité de ce test. Le test des comètes est capable de détecter les effets des agents alkylants, des substances intercalantes et des produits induisant un stress oxydant (Henderson et al., 1998). Depuis la publication de Singh et al. (1988), le test des comètes a fait l’objet de très nombreuses études dans de nombreux domaines : applications cliniques, surveillance humaine, études des effets des radiations, toxicologie génétique, études des systèmes de réparation de l’ADN, de l’apoptose, etc... .

Organisme	Type cellulaire	Référence
Vers		
polychètes (<i>Nereis virens</i>)	coelomocytes	De Boeck et Kirsch-Volders, 1997
ver de terre (<i>Lumbricus terrestris</i>)	coelomocytes	Verschaeve <u>et al.</u> , 1993
ver de terre (<i>Eisenia foetida</i>)	coelomocytes	Verschaeve et Gilles, 1995
		Verschaeve et Gilles, 1995
		Salagovic <u>et al.</u> , 1996
Mollusques		
moule	hémocytes	Steinert, 1996
		Steinert <u>et al.</u> , 1998
moule (<i>Mytilus edulis</i>)	cellules branchiales	Wilson <u>et al.</u> , 1998
huître (<i>Crassostrea virginica</i>)	hémocytes	Nacci <u>et al.</u> , 1996
palourde (<i>Tapes japonica</i>)	cellules branchiales	Sasaki <u>et al.</u> , 1997b
<i>Patunopecten yessoensis</i>	cellules branchiales	Sasaki <u>et al.</u> , 1997b
Poissons		
poisson-chat (<i>Ameiurus nebulosus</i>)	érythrocytes	Pandrangi <u>et al.</u> , 1995
carpe (<i>Cyprinus carpio</i>)	érythrocytes	Pandrangi <u>et al.</u> , 1995
carrelet (<i>Pleuronectes americanus</i>)	érythrocytes	Nacci <u>et al.</u> , 1996
poisson zèbre (<i>Brachydanio rerio</i>)	cellules de foie, intestin	
	cellules de foie, branchies	Deventer, 1996
truite fario (<i>Salmo trutta fario</i>)	érythrocytes	Belpaeme <u>et al.</u> , 1996a
truite arc-en-ciel (<i>Onchorynchus mykiss</i>)	cultures primaires d'hépatocytes	Devaux <u>et al.</u> , 1997
turbot (<i>Psetta maximus</i>)	érythrocytes, cellules de branchies, foie, rein	Belpaeme <u>et al.</u> , 1998
chevesne (<i>Leuciscus cephalus</i>)	érythrocytes	Devaux <u>et al.</u> , 1998
Amphibiens		
crapaud américain (<i>Bufo americanus</i>)	érythrocytes	Ralph <u>et al.</u> , 1996
grenouille criarde (<i>Rana clamitans</i>)	érythrocytes	Ralph <u>et al.</u> , 1996
		Ralph et Petras, 1997
grenouille léopard (<i>Rana pipiens</i>)	érythrocytes	Ralph et Petras, 1997
grenouille taureau (<i>Rana catesbeiana</i>)	érythrocytes	Clements <u>et al.</u> , 1997
Mammifères		
dauphin (<i>Tursiops truncatus</i>)	lymphocytes	Betti et Nigro, 1996
souris	cellules de lymphome	Miyamae <u>et al.</u> , 1997a
	kératinocytes	Yendle <u>et al.</u> , 1997
	cellules de foie, rein, rate, poumon, moelle osseuse	Sasaki <u>et al.</u> , 1997a
	lymphocytes	Villani <u>et al.</u> , 1998
Rat	cellules d'estomac, colon, mucus nasal	Pool-Zobel <u>et al.</u> , 1993
	cellules de cerveau	Singh <u>et al.</u> , 1995
	cellules de testicule	Scassellati-Sforzolini <u>et al.</u> , 1997
	hépatocytes	Moller <u>et al.</u> , 1998
hamster chinois	cellules ovariennes	Miyamae <u>et al.</u> , 1997b

Tableau IV : Exemples d'applications du test des comètes à différents organismes

D'excellentes revues bibliographiques présentent ces diverses applications (McKelvey-Martin et al., 1993; Fairbairn et al., 1995; Tice, 1995; Anderson et Plewa, 1998).

Dans le domaine environnemental, le test des comètes a été appliqué avec succès à différents types d'organismes : plantes, vers, mollusques, poissons, amphibiens et mammifères (Tableau V). Nous ne détaillerons que les publications relatives à l'application de ce test aux plantes qui nous intéressent plus particulièrement, ayant déjà résumé les autres applications de ce test dans une revue (Cotelle, 1999). En outre, une revue de Mitchelmore et Chipman (1998) consacrée uniquement aux organismes animaux aquatiques présente l'application de différentes méthodes d'analyse de la génotoxicité, dont le test des comètes.

IV.4.2. Application du test des comètes aux plantes (Tableau VI)

Le test des comètes peut en théorie être appliqué à toute cellule eucaryote individuelle (Tice et al., 1991). Les premiers auteurs à s'être intéressés à l'application du test des comètes au domaine végétal sont Cerda et al. (1993) qui ont évalué les dommages de l'ADN dans les aliments irradiés, dont notamment des végétaux (oignon et pomme de terre). Les étapes de lyse et d'électrophorèse ont été réalisées à pH = 8.

Ultérieurement, Koppen et Verschaeve (1996) ont appliqué pour la première fois le test des comètes en conditions alcalines dans le domaine végétal, et c'est *Vicia faba* qui avait été choisie pour cette étude. L'exposition des plantes aux substances chimiques dissoutes dans l'eau a été réalisée en immergeant les racines dans les solutions. Pour éviter les problèmes dus aux caractéristiques des cellules végétales (en particulier la présence de paroi pecto-cellulosique), les auteurs ont ensuite isolé les noyaux des racines, et non pas les cellules comme c'est généralement le cas dans le domaine animal. De nombreux produits chimiques (substances organiques et métaux) ont été testés à l'aide du protocole décrit par Singh et al. (1988) appliqué à ces suspensions nucléaires : méthyl methanesulfonate, éthyl methanesulfonate, mitomycine C, cycloheximide, chlorure de cadmium, dichromate de potassium and trichlorure de chrome. A l'exception du cycloheximide, tous ces agents ont induit une augmentation significative du nombre de comètes. Avec le cycloheximide, les auteurs ont observé une diminution de la migration d'ADN qui pourrait refléter un processus de pontage.

Organisme	type cellulaire ou nucléaire	substance chimique	durée d'exposition	domaine de concentration	paramètre	réponse	référence
fève (<i>Vicia faba</i>)	noyaux des racines primaires	MMS EMS mitomycine C dichromate de potassium trichlorure de chrome chlorure de cadmium cycloheximide	2 h	1 mM 1 µM - 1 mM 1 nM 1 mM 1 µM - 1 mM 0,01 - 1 µM 0,01 µM - 1 mM	moment	+ + + + + + -	Koppen et Verschaeve, 1996
tabac (<i>Nicotiana tabacum</i>)	noyaux des feuilles	EMS	18 h	1 - 8 mM	distance de migration moment	+ +	Gichner et Plewa, 1998
algue unicellulaire (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)	cellules algales	4-nitroquinoline-1-oxyde N-nitrosodiméthylamine peroxyde d'hydrogène	2 h	25 - 50 nM 14 - 140 µM 0,25 - 1 mM	moment	+ + +	Erbes <u>et al.</u> , 1997

Tableau XIII: application du test des comètes aux végétaux

Une autre étude portant sur l'application du test des comètes à une plante supérieure a été publiée par Gichner et Plewa (1998). Le traitement de plants de tabac (*Nicotiana tabacum*) a été réalisé en immergeant les racines dans l'éthyl méthanesulfonate (EMS). Les feuilles étaient ensuite récoltées pour l'isolement des noyaux. Les dommages à l'ADN étaient ensuite déterminés par le protocole alcalin (Singh et al., 1988) avec de légères modifications. Une relation dose-effet était obtenue après exposition des plants de tabac à l'EMS. Les auteurs ont aussi comparé les résultats obtenus dans cette étude avec ceux du test des mutations également réalisé sur les feuilles. Les relations dose-effet des deux tests étaient très fortement corrélées. Les auteurs ont dû adapter la procédure aux noyaux et analyser l'effet de la lyse sur la formation de comètes. Les noyaux des plantes témoins et des plantes traitées à l'EMS ne montraient pas de différence de dommages à l'ADN avec ou sans lyse. Cette observation confirme les travaux de Navarrete et al. (1997) qui ont noté, dans une étude des effets des radiations ionisantes (à l'aide d'une source de ^{137}Cs) dans les racines d'oignon (*Allium cepa*), que l'étape de lyse n'était pas nécessaire dans le domaine végétal.

Dans ces deux expérimentations sur le tabac et l'oignon, l'isolement des noyaux a été réalisé en coupant respectivement les feuilles et les racines afin de récupérer les noyaux dans l'agarose ou dans une solution tamponnée.

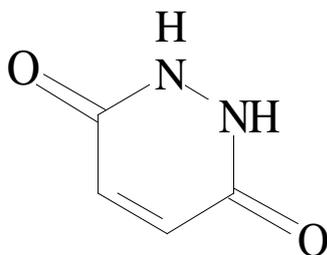
Le test des comètes peut également être appliqué aux algues planctoniques, sans isolement préalable des noyaux, malgré leurs caractéristiques (notamment la présence d'une paroi cellulaire constituée de trois couches de glycoprotéines) qui auraient pu compliquer les étapes du test. Le protocole, décrit par Singh et al. (1988) a servi de base mais avec certaines modifications, comme l'utilisation d'une solution alcaline de lyse avec des détergents ioniques et la diminution des temps de dénaturation et d'électrophorèse. A titre d'exemple, l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* a répondu de façon très sensible à l'exposition aux produits suivants : 4-nitroquinoline-1-oxyde, le N-Nitrosodiméthylamine et le peroxyde d'hydrogène. Les résultats de cette étude, et particulièrement après exposition au peroxyde d'hydrogène, ont montré l'influence de la lumière sur le métabolisme des algues. En effet, lorsque le traitement se faisait à la lumière, *Chlamydomonas* luttait plus efficacement contre le stress oxydatif que dans l'obscurité (Erbes et al., 1997).

En conclusion, nous retiendrons qu'il n'y a que quatre publications qui traitent du test des comètes appliqué à des organismes photosynthétiques dans le domaine de l'écoxicologie. Trois d'entre elles sont consacrées à l'étude des effets de substances chimiques et une aux radiations ionisantes. Nous n'avons pas eu connaissance d'applications de ce test à des matrices complexes dans le domaine végétal.

V. L'hydrazide maléique

Nous terminerons cette partie relative à l'analyse bibliographique par quelques généralités à propos de la substance de référence que nous avons choisie pour le test *Vicia/Allium*-micronoyaux, à savoir l'hydrazide maléique.

L'hydrazide maléique (HM ; 1,2-dihydro-pyridazine-3,6-dione ; C₆H₄N₂O₂ ; P.M. = 112,09 g/mol ; CAS N° 123-33-1) est une pyridazine produite principalement en combinant de l'anhydride maléique et de la dihydrazine en solution aqueuse. Le HM est un isomère structural de la pyrimidine uracile et est plutôt stable *in vivo* et *in vitro*. Ce produit peut exister sous trois formes tautomériques possibles, mais la plus courante est la suivante :



Cette substance, qui est appliquée en agriculture principalement comme herbicide et fongicide, est l'un des premiers inhibiteurs de la croissance des plantes à avoir été utilisé puisque le HM a été commercialisé dès 1948. Il a été appliqué sur des pommes de terre, des oignons, du tabac, etc... (Gichner et al., 1982). Ce produit s'est également montré efficace pour retarder la floraison et inhiber la fertilité du pollen de nombreuses plantes (Grant et Salamone, 1994). Le HM pénètre facilement dans les racines et dans les feuilles, il s'accumule préférentiellement dans les cellules en division (Swietlinska et Zuk, 1978) mais est très peu rémanent dans le sol et présente très peu de résidus dans les légumes et le tabac (Ponnampalam et al., 1983).

Dans le domaine de la génotoxicité, le HM a été étudié par Darlington et McLeish (1951) qui ont mis en évidence des aberrations chromosomiques dans les racines de *Vicia faba* exposées à ce produit. Ses propriétés clastogènes radiomimétiques ont ensuite été révélées chez *Allium* par McManus (1960). Depuis ces premières découvertes, ces propriétés ont été confirmées dans d'autres plantes (l'orge, la tomate, le maïs, etc...) (Ma et al., 1994a). Le HM a d'ailleurs été utilisé dans une étude inter-comparaison de l'«International Programme on Chemical Safety» sur les tests *Vicia*-aberrations chromosomiques et les tests micronoyaux et mutations sur *Tradescantia*.

L'induction d'un grand nombre d'aberrations chromosomiques dans les racines de *Vicia* exposées au HM a été mise en évidence par les six laboratoires impliqués dans cette étude pour des concentrations comprises entre 1 et 11 mg/l (Kanaya et al., 1994). Cinq laboratoires ont réalisé le test *Tradescantia*-micronoyaux avec l'hydrazide maléique qui a donné une réponse positive dans chacun de ces laboratoires à des concentrations comprises entre 5 et 190 mg/l (Ma et al., 1994a). D'autres laboratoires ont effectué le test des mutations et ont tous mis en évidence un effet mutagène de l'hydrazide maléique entre 10 et 80 mg/l (Ma et al., 1994b). Le HM a également été trouvé mutagène pour *Zea mays* (maïs) et *Hordeum vulgare* (orge) mais pas pour *Arabidopsis thaliana* (arabette de Thalius) ni *Salmonella typhimurium* (Grant et Salamone, 1994). Enfin, il a induit un fort taux d'aberrations chromosomiques dans les racines de tomate (Grant et Harney, 1960) et dans celles d'orge (Subhadra et al., 1993).

En revanche, ces propriétés clastogènes sont faibles ou inexistantes chez les animaux et en particulier les mammifères (Heindorff et al., 1984). Cette différence peut s'expliquer par des capacités de conversion de l'hydrazide maléique en mutagène que possèderaient uniquement les plantes, mais aussi par des différences de pH interne ou d'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN. Il y a différentes hypothèses sur la nature des métabolites du HM : acide maléique diamide, acide succinique, acide lactique et hydrazine ou bien encore β -glycoside d'hydrazide maléique. Cependant, l'hydrazine induit beaucoup moins d'aberrations chromosomiques que le HM dans les racines de *V. faba* (Heindorff et al., 1984). Le mécanisme d'action du HM n'est pas connu, il semble néanmoins que le HM ne se lie pas directement à l'ADN. Les auteurs sont plutôt favorables à l'implication de radicaux libres dans le mécanisme d'action de ce promutagène (Gichner et al., 1982). Ceci a été mis en évidence à l'aide de *Tradescantia* : Xiao et Ichikawa (1995 et 1997) ont montré que l'activation de l'hydrazide maléique se faisait par les peroxydases dans les tissus floraux.

Une étude que nous avons déjà détaillée dans le paragraphe IV.2.3.4. a montré que les substances humiques (acide humique et acide fulvique) des matières organiques contenues dans les sols étaient absorbées par les racines et inhibaient ainsi l'activité génotoxique de l'hydrazide maléique dans les racines de *Vicia* (De Marco et al., 1995). Cette inhibition pourrait être la conséquence du blocage des synthèses protéiques et des activités enzymatiques (peroxydase, phosphorylase, etc...) par les substances humiques (De Marco et De Simone, 1994 ; De Simone et al., 1995). Par ailleurs, des substances anti-radicalaires, telles que l'hydroquinone ou des enzymes

comme la catalase réduisent les altérations génomiques du HM chez *Vicia faba* (Heindorff et al., 1984).

Une autre théorie précise que le HM peut remplacer une base purique ou pyrimidique, bloquant ainsi l'ADN polymérase ce qui aurait pour effet de retarder la réplication. Bien que l'incorporation du HM dans l'ADN ne soit qu'une hypothèse, des études ont montré qu'il s'incorporait bien dans l'ARN (Cortés et al., 1985).

L'hydrazide maléique induit des aberrations chromosomiques, et en particulier des ponts, dans les extrémités racinaires de *Tradescantia*. HM est un agent qui agit lors de la période S (Xiao et Ichikawa, 1997). L'action de ce composé sur les chromosomes de *Tradescantia* a été décrite très similaire à celle des agents alkylants (Swietlinska et Zuk, 1978).

Le délai mitotique induit par le HM peut être dû à une inhibition de la synthèse d'ADN et des protéines nucléaires. Cependant, une réparation des dommages à l'ADN semble se faire en phase G2 (Cortés et al., 1985). Le HM induit des aberrations chromosomiques et des échanges de chromatides sœurs (ce qui laisse penser que l'un des effets du HM serait la formation d'adduits à l'ADN) dans les cellules d'*Allium cepa* traitées avec une solution de 0,3 mM de HM (Cortés et al., 1985).

Dans tous les cas, son action génotoxique dépend étroitement de la température, mais surtout du pH puisque six fois plus d'aberrations chromosomiques étaient produites dans les racines de *Vicia* après exposition à l'hydrazide maléique à pH 4,7 qu'à pH 7,3 (Kihlman, 1975). Cette notion a été confirmée après exposition de l'algue verte *Anacystis nidulans* à l'hydrazide maléique qui s'est avéré mutagène à pH = 5 mais pas à pH = 8 (Gupta et Kumar, 1970). D'autre part, une solution de HM de 0,3 mM, à un pH de 5,4, a induit dans les cellules racinaires d'*Allium* une diminution importante de l'indice mitotique jusqu'à 10 heures pour redevenir normal 24 heures après (Cortés et al., 1985).

Enfin, il a été montré que le HM avait une affinité plus grande avec certaines régions ("hot spots") du segment 4 du grand chromosome métacentrique de *Vicia faba* (Heindorff et Rieger, 1984).

VI. Généralités sur le mode d'action génotoxique des micropolluants chez les végétaux

Le mode d'action des micropolluants chez les végétaux supérieurs présente des caractéristiques particulières : pour agir au niveau du génome, une substance chimique doit franchir un certain nombre d'étapes (Durst, 1991) :

La première étape est physique :

- la pénétration : passage de la barrière cuticulaire constituée de cutines et de cires dans les parties aériennes et de subérines dans les parties souterraines. Ces substances sont lipophiles et vont laisser passer préférentiellement les substances lipophiles. Le nombre d'époxydes et d'hydroxyles qui régulent le caractère lipophile de cette barrière varie selon les plantes et l'âge des plantes, ce qui rend certains végétaux plus sensibles aux polluants que d'autres.

Les autres étapes impliquent des systèmes enzymatiques assez similaires à ceux des animaux, au point que certains auteurs n'hésitent pas à définir le concept du " foie vert " pour décrire les étapes du métabolisme des plantes (Sandermann, 1994). De nombreux promutagènes sont ainsi activés : le benzo[a]pyrène, certaines nitrosamines, etc... (Plewa et Wagner, 1993), des aflatoxines, des amines aromatiques, etc... (Veleminsky et Gichner, 1988).

- la fonctionnalisation assurée par des enzymes de phase I, qui rendent les molécules réactives en ajoutant une fonction nouvelle. Ceci se traduit par un gain de polarité des micropolluants qui se déplacent des phases membranaires vers le cytoplasme. Il y a trois types de transformation : les réductions dont les mécanismes ne sont pas parfaitement connus, les hydrolyses de groupements amides ou esters par exemple, et les oxydations. Ce dernier type de transformation est le plus important au niveau qualitatif et quantitatif. Il met en jeu des enzymes telles que des peroxydases (qui sont des hémoprotéines), des peroxygénases et des monooxygénases à cytochrome P-450 (ces dernières étant des enzymes endomembranaires qui peuvent être inhibées, par exemple, par le cadmium).

- la conjugaison est réalisée par des enzymes de phase II qui assurent le transfert d'acide glucuronique, glutathion, acides aminés, etc... vers la molécule fonctionnalisée qui accroît encore sa polarité.

- la compartimentation : stockage dans la vacuole des molécules devenues hydrophiles, incorporation dans la paroi (e.g. le benzo[a]pyrène forme des liaisons covalentes avec la lignine des parois).

Ces étapes de métabolisation peuvent constituer une source d'espèces réactives de l'oxygène. Ces radicaux libres sont des atomes ou des molécules présentant un ou plusieurs électrons célibataires qui sont facteurs d'instabilité et de réactivité. Les formes réactives de l'oxygène sont par exemple l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, l'anion superoxyde O_2^- , le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , le radical hydroxyle OH° et les radicaux hydroperoxydes. Le système des monooxygénases à cytochrome P-450 présente notamment un puissant potentiel de production d'espèces réactives. Il faut encore noter que les cellules photosynthétiques sont prédisposées au stress oxydant parce qu'elles produisent et consomment de l'oxygène (Vangronsveld et al., 1997).

Les plantes supérieures ont un système antioxydant relativement efficace pour faire face à la toxicité et à la génotoxicité des espèces réactives de l'oxygène. Les enzymes du stress oxydant qui existent aussi bien chez les animaux que chez les plantes sont les suivantes:

- les superoxyde dismutases (SOD) présentes notamment dans les chloroplastes (Asada, 1992), mais aussi dans le cytoplasme et les mitochondries éliminent le radical superoxyde et empêchent ainsi la formation de radicaux hydroxyles plus nocifs. Ces métalloenzymes existent sous différentes formes (Cu-Zn, Mn et Fe).

- les catalases sont des enzymes hémiques localisées principalement dans les peroxysomes. Ces enzymes catalysent la conversion du peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau (Willekens et al., 1995).

- les peroxydases catalysent la réduction d'une grande variété de peroxydes. Chez les plantes, ces enzymes sont notamment localisées dans les chloroplastes et dans les vacuoles où elles sont très efficaces pour inhiber les effets du peroxyde d'hydrogène (Takahama et Oniki, 1997).

- les glutathion réductases assurent le maintien du rapport glutathion réduit/oxydé.

L'activité de ces enzymes peut par conséquent être quantifiée dans les végétaux pour détecter un effet toxique de substances chimiques ou de matrices complexes, puisqu'elles semblent induites par la formation d'espèces radicalaires de l'oxygène. A titre d'illustration, Radetski (1996) a mis en évidence une augmentation de ces quatre enzymes dans les feuilles et les racines de *Vicia faba* exposé à un lixiviat de MIOM (mâchefer d'incinération d'ordures ménagères). D'autres auteurs ont utilisé l'activité de la peroxydase dans une plante aquatique comme biomarqueur d'effet de métaux (Byl et al., 1994) ou constaté une augmentation de l'activité glutathion réductase dans les aiguilles de sapins exposés aux pluies acides (Chen et al., 1991).

Il faut cependant noter que les enzymes du stress oxydant peuvent être induites par d'autres facteurs que l'exposition à des toxiques, comme par exemple le froid, la blessure des tissus, l'infection par des agents pathogènes, etc... (Vangronsveld et al., 1997). L'exposition de nombreuses plantes à des métaux tels que le plomb ou le cuivre a révélé une induction notable des catalases (Vangronsveld et al., 1997). Les inhibiteurs des glutathion réductases les plus connus sont les métaux thioloxydants tels que le cadmium et le plomb (Cossu et al., 1997). Un examen attentif des effets des métaux montre par ailleurs que le cadmium inhibe presque complètement l'activité de la CuZn-SOD (Vangronsveld et al., 1997).

En plus des enzymes du stress oxydant, les plantes supérieures contiennent des substances anti-oxydantes telles que des composés phénoliques, des caroténoïdes, etc.... qui réagissent avec les espèces réactives de l'oxygène (Larson, 1995).

Lorsque les enzymes du stress oxydant sont inefficaces, les espèces réactives de l'oxygène peuvent avoir une action nocive sur l'ensemble des constituants cellulaires (Cossu et al., 1997) :

- peroxydation des acides gras polyinsaturés des phospholipides (qui peut se traduire par une destruction des membranes de la cellule et des organites). Certains auteurs ont ainsi mis en évidence une diminution de l'intégrité des membranes cellulaires dans de nombreuses plantes, en particulier après une exposition au cadmium (Vangronsveld et al., 1997).

- altération des protéines

- dommages à l'ADN, comme des coupures de brins d'ADN et des lésions de bases par l'anion superoxyde. Radetski (1996) a ainsi montré qu'il y avait une augmentation de la fréquence de micronoyaux dans les racines de *Vicia faba* exposé au lixiviat de MIOM, mais à des concentrations de lixiviat supérieures à celles qui induisaient l'augmentation des enzymes du stress oxydant.

Par ailleurs, les effets génotoxiques des métaux ne se produisent pas seulement par l'intermédiaire des espèces réactives de l'oxygène, ils peuvent également agir directement, comme le plomb par exemple qui perturbe l'activité physiologique de la calmoduline en l'empêchant de réguler la dépolymérisation et la polymérisation des microtubules du fuseau mitotique (Liu et al., 1994c). Le plomb est également soupçonné d'inhiber les enzymes de réparation (Dryanovska, 1987). Pour ce qui est du chrome, la forme chromate est celle qui est la plus toxique car elle est capable de traverser les membranes cellulaires en utilisant les mêmes mécanismes de transport que les ions sulfate et phosphate. Dans le cytoplasme, il est réduit par les enzymes du cytochrome P-450 et par le NADPH en chrome III qui se lie aux acides nucléiques et aux nucléoprotéines et par conséquent peut induire des effets génotoxiques (Villalobos-Pietrini et al., 1986).

Matériel et Méthodes

I. Présentation des matrices à tester

Les deux programmes de recherches concertées de l'ADEME auxquels nous avons participé concernent d'une part des sols contaminés et d'autre part des boues de station d'épuration. Ces deux programmes ont impliqué différentes équipes qui ont évalué le potentiel toxique et/ou génotoxique de ces matrices (Savanne, 1996).

I.1. Programme relatif aux sols contaminés

Le choix des matrices a été effectué par l'ADEME sur proposition de l'IRH (Institut de Recherches Hydrologiques, Nancy), il s'agit d'un sol de référence, de deux sols artificiellement contaminés dans des conditions contrôlées et de deux sols pollués réels :

- **sol de référence** : ce sol non pollué (S0) sert de matrice de référence et est en réalité un sol agricole (sol brun lessivé, limono-argileux, de classification FAO : Luvisol), le plus représentatif des sols rencontrés en Europe et donc en France. Son lieu d'échantillonnage est La Bouzule (54) bien connu du point de vue pédologique et déjà bien caractérisé.

- sol SI : sol S0 artificiellement contaminé par des métaux (Tableau XIV)

Quatre métaux ont été sélectionnés en fonction de leur comportement physico-chimique, de leur degré de biodisponibilité et de leur représentativité par leur degré de contamination dans les déchets et les sols pollués. Il s'agit du cadmium, du chrome, du plomb et du zinc. Le zinc et le cadmium ont été choisis en raison de leur fréquence de contamination, de leur mobilité et de leur toxicité, en particulier pour le cadmium. Le plomb est plus facilement retenu sous forme précipitée d'hydroxyde ou de métal adsorbé par la matrice et le chrome plus facilement libre dans la phase aqueuse.

Produits chimiques	Concentration dans le sol (mg/kg)
Cadmium	20
Chrome	800
Plomb	800
Zinc	2000

Tableau XIV : Concentration des produits chimiques dans le sol SI. Les analyses chimiques ont été réalisées par l'IRH, Nancy (Bispo, 1998).

- sol SII : sol S0 artificiellement contaminé par des polluants organiques (Tableau XV)

Trois contaminants différents sur le plan de leur solubilité dans l'eau ont été choisis : le 2,4,6-trichlorophénol, molécule hydrosoluble, et le pentachlorophénol, molécule peu soluble dans l'eau, ont été ajoutés au sol S0 selon des concentrations ajustées en rapport avec les directives CEE et dans les limites de détection de la toxicité engendrée. Un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) a également été sélectionné, il s'agit du phénanthrène, substance intermédiaire en termes de solubilité, de comportement physique et de toxicité. Sa toxicité limitée permet en outre son utilisation facile en laboratoire et il est souvent rencontré dans les sols pollués par des goudrons de houille.

Produits chimiques	Concentration dans le sol (mg/Kg)
Phénanthrène	800
2,4,6-trichlorophénol	80
Pentachlorophénol	80

Tableau XV : Concentration des produits chimiques dans le sol SII. Les analyses chimiques ont été réalisées par l'IRH, Nancy (Bispo, 1998).

- deux sols pollués réels : l'ADEME s'est engagée à garder confidentielle leur provenance exacte. Ils ont été sélectionnés à partir de sols excavés provenant de sites bien caractérisés :

- sol SIII : sol pollué par des résidus de solvants organiques et des métaux (Tableau XVI)

- sol SIV : sol pollué par des résidus de cokerie (Tableau XVII)

I.2. Programme relatif aux boues de station d'épuration (programme VADETOX)

Ce deuxième programme de recherches concertées initié par l'ADEME concerne l'évaluation des risques écotoxicologiques liés à l'épandage des déchets et de produits dérivés, en l'occurrence des boues de station d'épuration. Parmi les différentes matrices proposées, nous avons choisi, en concertation avec l'ADEME, d'en tester deux :

- boue B1 : boue de station d'épuration (STEP 300 000 EqHab). Il s'agit d'une boue fraîche ayant subi des procédés de digestion et d'élutriation.

- boue B3 : boue B1 ayant été déshydratée et compostée.

Produits chimiques	Concentration dans le sol	Concentration dans le lixiviat
Métaux	(mg/kg de MS)	(mg/l)
Hg	2,24	0,0024
Cd	29,6	0,22
As	12,03	0,07
Cu	201	2,3
Ni	50,3	0,16
Cr	342	2,2
Pb	1200	25
Zn	2270	28,4
HAPs	(mg/kg de MS)	(µg/l)
naphtalène	Nd	253
fluoranthène	1,21	15
benzo-b-fluoranthène	0,43	6
benzo-k-fluoranthène	0,21	2,9
benzo-a-pyrène	0,25	4,5
benzo-g,h,i-pérylène	0,22	4,9
indéno-1,2,3-pyrène	0,33	6,3
PCBs	(mg/kg de MS)	(µg/l)
PCB Arochlor 1242	4,5	< 100
PCB Arochlor 1254	204	3020
PCB Arochlor 1260	13,7	290
PCB 28	0,8	< 5
PCB 52	12,9	106
PCB 101	17,1	43
PCB 138	17,5	241
PCB 153	14,5	169
PCB 180	3,9	43
Organiques	(µg/kg de MS)	(µg/l)
benzène	<500	16,6
toluène	<500	850
xylènes	<500	4845
bromoforme	<100	< 1
chloroforme	<20	30,8
1-2 dichloroéthane	<500	25
dichlorométhane	<1000	31
trichloroéthylène	<100	95
tétrachloroéthylène	<10	97
trichlorobenzène 1-2-3	221	nd
trichlorobenzène 1-2-4	558	nd
Phenol	Nd	50
Diméthylphénols	Nd	400
Méthylphénol	Nd	230

Tableau XVI : Concentration des produits chimiques dans le sol et dans le lixiviat du sol SIII. Les analyses chimiques ont été réalisées par l'IRH, Nancy (Bispo, 1998). nd = non déterminé

Produits chimiques	Concentration dans le sol	Concentration dans le lixiviat
Métaux	(mg/kg de MS)	(mg/l)
Hg	12,56	0,1
Cd	<5	< 0,05
As	68,1	0,17
Cu	66,6	0,28
Ni	70,6	0,16
Cr	134	0,18
Zn	2080	3,1
HAPs	(mg/kg de MS)	(µg/l)
Naphthalene		63
Fluoranthène	96	2880
benzo-b-fluoranthène	35,5	1045
benzo-k-fluoranthène	21,1	500
benzo-a-pyrène	32,5	940
benzo-g,h,i-pérylène	25,5	820
indéno-1,2,3-pyrène	27,6	730
PCBs	(mg/kg de MS)	(µg/l)
PCB Arochlor 1242	<1	nd
PCB Arochlor 1254	<1	nd
PCB Arochlor 1260	<1	nd
PCB 28	<0,1	nd
PCB 52	<0,1	nd
PCB 101	<0,1	nd
PCB 138	<0,1	nd
PCB 153	<0,1	nd
PCB 180	<0,1	nd
Organiques	(µg/kg de MS)	(µg/l)
trichlorobenzène 1-2-3	<2	nd
trichlorobenzène 1-2-4	82	nd
Phenol		140
Diméthylphénols		110
Méthylphénol		120

Tableau XVII : Concentration des produits chimiques dans le sol et dans le lixiviat du sol SIV. Les analyses chimiques ont été réalisées par l'IRH, Nancy (Bispo, 1998).
nd = non déterminé

II. Descriptif des différentes expériences

II. 1 Programme relatif aux sols contaminés

L'ensemble des critères toxiques et génotoxiques a été étudié en exposant les divers organismes végétaux au lixiviat des matrices à tester. Deux autres modes d'exposition ont également été envisagés sur une partie seulement des critères.

Les quatre sols et les lixiviats correspondants nous ont été fournis par l'IRH, Nancy : les sols SI et SII étaient artificiellement contaminés juste avant la lixiviation alors que les sols SIII et SIV ont été conservés à 4°C après leur prélèvement sur des sites pollués réels. La lixiviation, réglementée par la norme AFNOR X31-210 (1992), consiste à mettre en agitation 100 g de sol avec 1 litre d'eau déminéralisée pendant 24 heures à une température de 20°C et à l'obscurité. Les solutions ainsi obtenues sont ensuite décantées pendant 24 heures et les surnageants sont prélevés pour être testés. Les lixiviats de ces sols ont été préparés par Monsieur Bispo (IRH) et envoyés au laboratoire le jour même de leur préparation. Notons que les organismes végétaux étaient mis à germer auparavant de façon à ce qu'ils soient prêts le jour même de la réception des matrices.

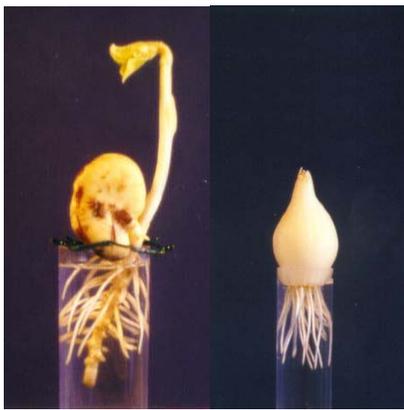
Parallèlement à l'exposition des plantes aux lixiviats, il nous a semblé intéressant d'étudier deux autres modes d'exposition des fèves et des oignons aux sols contaminés.

a) immersion des racines dans une suspension de sol :

Les racines de *Vicia* et d'*Allium* ont été immergées dans un mélange constitué de sol et de milieu de Hoagland (MH) afin de savoir si l'agitation de 24 heures et la décantation étaient indispensables pour l'extraction des polluants éventuellement présents dans ces matrices. Les différentes concentrations ont été préparées en mélangeant chacun des sols SI, SII, SIII et SIV dans le milieu de Hoagland (ex.: 5% = 5 g de sol qsp. 100 g de milieu de Hoagland). La durée d'exposition est la même que celle choisie pour les lixiviats, à savoir 30 heures.

b) germination des plantes dans les sols :

Les organismes végétaux sont directement mis à germer dans les sols. Dans ce cas, nous avons préparé les concentrations en mélangeant chaque sol à du sable de Fontainebleau (e.g.: 5% = 5 g de sol qsp. 100 g de sable). La durée d'exposition, dans ce cas, a dû être prolongée car la phase de germination doit se dérouler dans le sol : nous avons donc laissé les oignons pendant 3 jours et les fèves pendant 5 jours dans les sols afin de permettre la croissance racinaire.



lixiviat

MCN - ER - IM
+
test des comètes



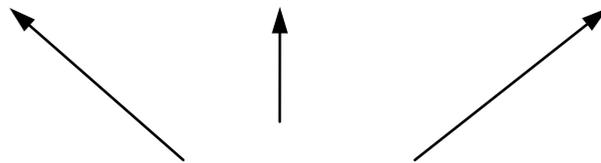
sol + milieu de Hoagland

MCN - ER - IM



sol + sable

MCN - ER - IM



SOLS CONTAMINES



lixiviat



Tradescantia-micronoyaux
+
Tradescantia-mutations

Figure 9 : Récapitulatif des expérimentations réalisées sur les sols contaminés

Ces trois approches ont été menées à une température comprise entre 15 et 20°C et à l'obscurité. Les différentes expérimentations sont résumées sur la figure 9.

Une première série d'expériences a été conduite sur les lixiviats des sols contaminés avec *Vicia* et *Allium* (exp 1) afin de caractériser le potentiel génotoxique des lixiviats. La deuxième batterie d'essais a été effectuée ultérieurement (exp 2) pour pouvoir comparer d'une part les différents tests biologiques entre eux et d'autre part, les 3 modes d'exposition. Notons que pour l'expérience 2, les lixiviats ont été préparés non pas avec de l'eau déminéralisée mais avec du milieu de Hoagland afin de permettre la comparaison des résultats entre le protocole "lixiviat" et le protocole "sol + MH". Le calendrier des expériences est résumé dans le Tableau XVIII. Le test Mutatox a été utilisé comme un contrôle interne.

Sol		<i>Vicia/Allium</i>		<i>Tradescantia</i>		Mutatox
		ER – IM - MCN	Comètes	MCN	SH	
SI	A exp1	Mai 96				
	exp2	Mai 98	Juil 98	Dec 97	Mai 98	Juil 98
	B	Mai 98				
SII	A exp1	Juil 96				
	exp2	Juil 98	Juil 98	Dec 97	Juil 98	Juil 98
	B	Juil 98				
SIII	A exp1	Dec 96				
	exp2	Mars 98	Juil 98	Dec 97	Mars 98	Juil 98
	B	Mars 98				
SIV	A exp1	Fev 97				
	exp2	Nov 97	Juil 98	Dec 97	Nov 97	Juil 98
	B	Nov 97				

Tableau XVIII : Calendrier des différentes expériences (ER = élongation racinaire, IM = indice mitotique, MCN = micronoyaux, SH = mutations) réalisées selon divers modes d'exposition : A = lixiviat, B= mélange (sol + milieu de Hoagland) ou (sol + sable)

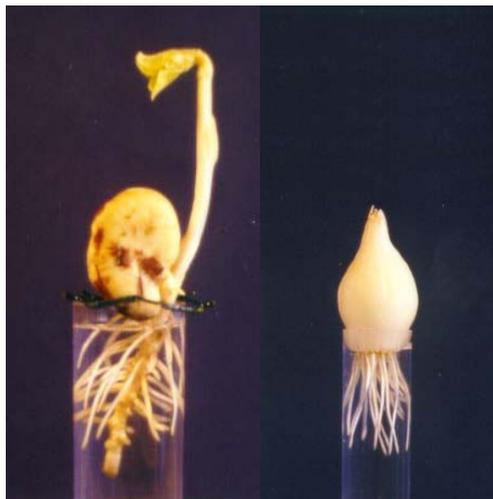
II.2. Programme relatif aux boues de station d'épuration

Les boues de station d'épuration ont également été fournies par l'IRH. Avant lixiviation, les boues ont été conservées au laboratoire (C.S.E.) pendant une durée variable selon les expérimentations (cf. ci-dessous) dans leur emballage d'origine, c'est-à-dire des containers en plastique, à 4°C et à l'obscurité. Les lixiviats des deux boues B1 et B3 ont été préparés au C.S.E. selon la norme AFNOR X31-210 (1992) : 100 g de boues (pesées à l'état brut, sans dessiccation préalable) sont mis en agitation avec 1 litre d'eau déminéralisée pendant 24 heures, à une température de 20°C et à l'obscurité. Les solutions ainsi obtenues sont ensuite centrifugées à 2000 tpm pendant 15 minutes, et les surnageants sont prélevés pour être testés. Les tests ont été réalisés le jour même de la préparation des lixiviats puisque les organismes végétaux avaient été mis à germer auparavant. Seuls les lixiviats des boues ont été étudiés, nous n'avons pas envisagé d'autres modes d'exposition pour ce programme. Les expérimentations sont résumées sur la figure 10.

BOUES DE STATION D'EPURATION



lixiviat



test des micronoyaux
élongation racinaire
indice mitotique

Figure 10 : Récapitulatif des expérimentations réalisées sur les boues de station d'épuration

Les tests ont été répétés à deux reprises pour la première campagne effectuée en Avril 1997 (Tableau VII), successivement après 7 et 21 jours de conservation pour la boue B1, et après 7 et 70 jours de conservation pour la boue B3 (pour des raisons d'ordre pratique, il n'a pas été possible de tester la boue B3 après 21 jours de conservation).

Pour la deuxième campagne (Septembre 1997), il a été décidé en liaison avec Monsieur Savanne de l'ADEME, de ne réaliser qu'une seule expérimentation sur *Vicia faba* 7 jours après réception des boues B1 et B3.

boue			<i>Vicia/Allium</i>	<i>Vicia</i>
			ER - IM - MCN	ER - IM - MCN
B1	1ère campagne	exp1	Avril 97	
		exp2	Mai 97	
	2ème campagne			Sept 97
B3	1ère campagne	exp1	Avril 97	
		exp2	Juin 97	
	2ème campagne			Oct 97

Tableau XIX : Calendrier des différentes expériences (ER = élongation racinaire,

IM = indice mitotique, MCN = micronoyaux, SH = mutations)

exp 1 = expérience réalisée 7 jours après réception des boues B1 et B3 et exp 2 = expérience réalisée 21 jours après réception de B1 et 70 jours après réception de B3

III. Présentation des tests

III.1. Tests sur *Tradescantia*

III.1.1. Test des mutations

Tradescantia clone 4430 est un hybride interspécifique qui est hétérozygote pour les allèles bleu/rose dans tous les organes floraux, y compris les poils staminaux que nous observons plus particulièrement dans ce test. Cet hybride résulte du croisement de *Tradescantia hirsutiflora* (parties florales bleues) et *Tradescantia subcaulis* (parties florales roses) avec un phénotype dominant bleu. Après exposition des inflorescences de cette plante à une substance mutagène, une mutation somatique peut se produire et avoir pour conséquence un changement de couleur des cellules staminales qui présentent alors une couleur rose.

Le protocole suivi est celui défini par Ma et al. (1994b).

III.1.1.1. Références des produits et du matériel

Huile minérale	M-3516	Sigma
Loupe binoculaire	Highlight 3000	Olympus

III.1.1.2. Culture des plantes

Il est nécessaire d'avoir une centaine de pots de diamètre 15 cm, soit environ 1000 plantes adultes pour disposer de 60 à 80 jeunes inflorescences par semaine, ce qui permet de réaliser un test avec 1 témoin et 3 traitements.

Les expériences ont été effectuées sur des inflorescences du clone 4430 de *Tradescantia hirsutiflora* x *subcaulis* originaire du laboratoire du Professeur Te-Hsiu Ma (Université de Macomb, Illinois, USA) et cultivé dans les chambres de culture du C.S.E. (Metz) dans les conditions suivantes :

Les plantes sont placées dans une chambre de culture thermostatée

Photopériode : 16/8 lum/obs

Luminosité : - lampes fluorescentes : environ 1.000 lux

- lampes à sodium : environ 15.000 lux (mesurée à l'extrémité des plantes)

- Le sol est constitué de terreau (terreau pour plantes à fleurs) et de sable (10:1).
- Arrosage : eau déminéralisée 2 fois par semaine
- Engrais liquide (engrais pour plantes fleuries) : 1 fois par semaine
- Température : 23-26°C

Dans le cas où les inflorescences qui apparaissent ne seraient pas utilisées pour une expérimentation, il est nécessaire de les enlever pour induire la formation d'autres inflorescences. D'autre part, l'entretien des plantes consiste à les repoter régulièrement, tous les 3 mois environ, afin de disposer continuellement d'une culture jeune susceptible de produire de nombreuses inflorescences. Les plantes étant des hybrides, la propagation peut se faire soit en divisant leur système racinaire, soit en coupant les tiges en-dessous d'un nœud à l'aide d'une lame de rasoir. Dans ce dernier cas, il est préférable de choisir les boutures qui ne portent pas d'inflorescences et qui présentent des tiges assez épaisses.

Le taux de mutations spontanées a été contrôlé tous les mois depuis le début de la culture au laboratoire (cf. carte de contrôle du test *Tradescantia*-mutations, figure 21). Il est relativement stable, à l'exception du mois d'octobre 97, où nous avons été contraints de traiter les plantes avec du malathion suite à une infestation des plantes par des insectes.

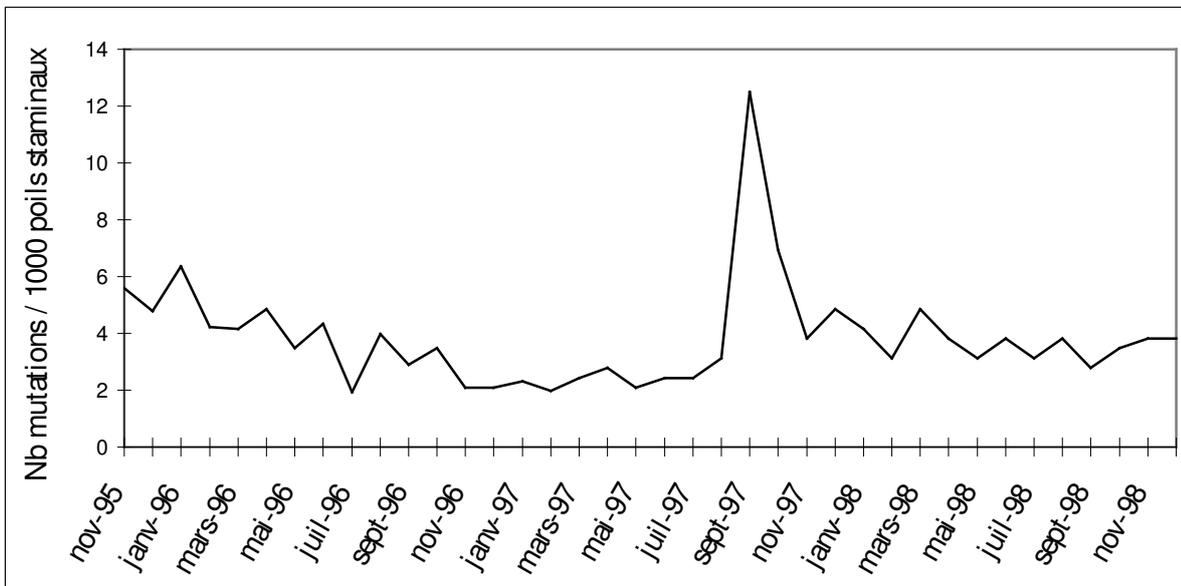


Figure 11 : Carte de contrôle du test *Tradescantia*-mutations

III.1.1.3. Traitement des inflorescences

Les jeunes inflorescences, composées d'au moins une dizaine de bourgeons, doivent avoir poussé dans de bonnes conditions ($> 15^{\circ}\text{C}$ et $< 36^{\circ}\text{C}$) et dans des milieux non contaminés. La longueur des tiges est de 10 à 15 cm, les inflorescences avec de longues tiges et de nombreuses feuilles ont une meilleure capacité d'absorption (Ma, 1979a). Les tiges doivent être coupées à l'aide d'une lame de rasoir afin de ne pas obturer les vaisseaux.

Le traitement se fait en plaçant 20 inflorescences dans des béciers en verre de 200 ml contenant les milieux à tester, de façon à n'immerger que les tiges. Les lixiviats sont dilués dans du milieu de Hoagland (Annexe B) préalablement oxygéné. Le témoin négatif est constitué de ce même milieu. Les tests sont réalisés à l'obscurité et à une température comprise entre 15 et 20°C .

La durée d'exposition est de 30 heures avec un changement de tous les milieux testés après 12 heures. La conservation du lixiviat se fait à 4°C et à l'obscurité.

III.1.1.4. Examen des étamines

La période optimale d'observation des fleurs se situe entre 7 et 16 jours après le traitement. Cette période est nécessaire à la formation des poils staminaux que nous observerons lors de ce test. Durant cette période de récupération, les inflorescences sont transférées dans une solution nutritive renouvelée tous les jours et composée de milieu de Hoagland préalablement oxygéné et d'eau du robinet dans des proportions respectives de 2 pour 1. Pendant cette période de récupération, les inflorescences sont placées dans les chambres de culture.

Entre 7 et 16 jours après le traitement, toutes les fleurs écloses sont prélevées chaque jour puis maintenues à 4°C pendant environ 10 minutes afin de rendre les poils staminaux plus rigides et permettre ainsi une observation plus facile. Les anthères sont ensuite enlevées et les six étamines déposées sur de l'huile de paraffine. Il s'agit alors de bien étaler les poils staminaux, de les dénombrer et de compter les mutations roses à l'aide d'une loupe binoculaire (grossissement x 25).

Les résultats sont définis en terme de nombre de mutations roses pour 1000 poils staminaux. Les cellules de chaque poil staminal proviennent d'une cellule épidermale du filament. Toutes les cellules terminales ou subterminales se divisent par mitose, ce qui explique qu'une cellule mutée

peut donner une suite de cellules roses, et ce, quelle que soit sa position dans le poil staminal. C'est pour cette raison qu'une seule mutation est comptée dans les cas où l'on rencontre une succession de cellules roses. Par contre, si deux cellules roses sont séparées par une cellule bleue, deux mutations sont dénombrées.

III.1.1.5. Analyse statistique

L'ensemble des valeurs obtenues pour tous les témoins montre dans ce cas qu'il n'y a pas de raison d'écarter une distribution normale. De plus, s'agissant d'une variation non monotone, nous avons exploité ces données avec le test paramétrique de Williams (précédé d'un test d'homogénéité de variance et d'une ANOVA) pour déterminer les concentrations pour lesquelles il y a un effet statistiquement significatif. Ces analyses sont réalisées grâce au logiciel de statistiques "TOXSTAT" fourni par l'US EPA.

III.1.2. Test des micronoyaux

Cet essai de génotoxicité est basé sur la détection de micronoyaux dans les cellules mères de pollen de *Tradescantia*.

Le protocole suivi est celui détaillé par Ma (1979a). Les principales étapes sont résumées par Ma et al. (1994a) et schématisées sur la figure 12. Les essais ont été réalisés au cours d'un séjour dans le laboratoire du Professeur Ma (Université de l'Illinois, USA).

III.1.2.1. Références des produits et du matériel et préparation des solutions

Références des produits et du matériel :

Acide acétique glacial	A-6283	Sigma
Trioxyde d'arsenic (As ₂ O ₃)	119	Merck
Carmin	2157 244	Fluka
Microscope	BX 40	Olympus
Lames 76x22	05.633.922	Prolabo
Lamelles 16x16	05.640.163	Prolabo

Préparation de la solution d'acéto-carmin 1% :

Il s'agit d'ajouter 0,2 g de carmin à 20 ml d'acide acétique 45% (9 ml d'acide acétique + 11 ml d'eau ultra-pure). Ce mélange est ensuite mis à ébullition pendant 10 minutes et filtré après refroidissement sur un filtre en papier. Lors de son utilisation, la solution est filtrée une fois par semaine afin d'éviter la formation de cristaux de carmin qui pourraient être confondus avec des micronoyaux pendant l'examen microscopique des cellules.

III.1.2.2. Culture des plantes

Les expériences ont été effectuées sur des inflorescences du clone 4430 de *Tradescantia hirsutiflora* x *subcaulis* cultivées dans les conditions suivantes (conditions du laboratoire du Professeur Ma à l'Université de l'Illinois, USA) :

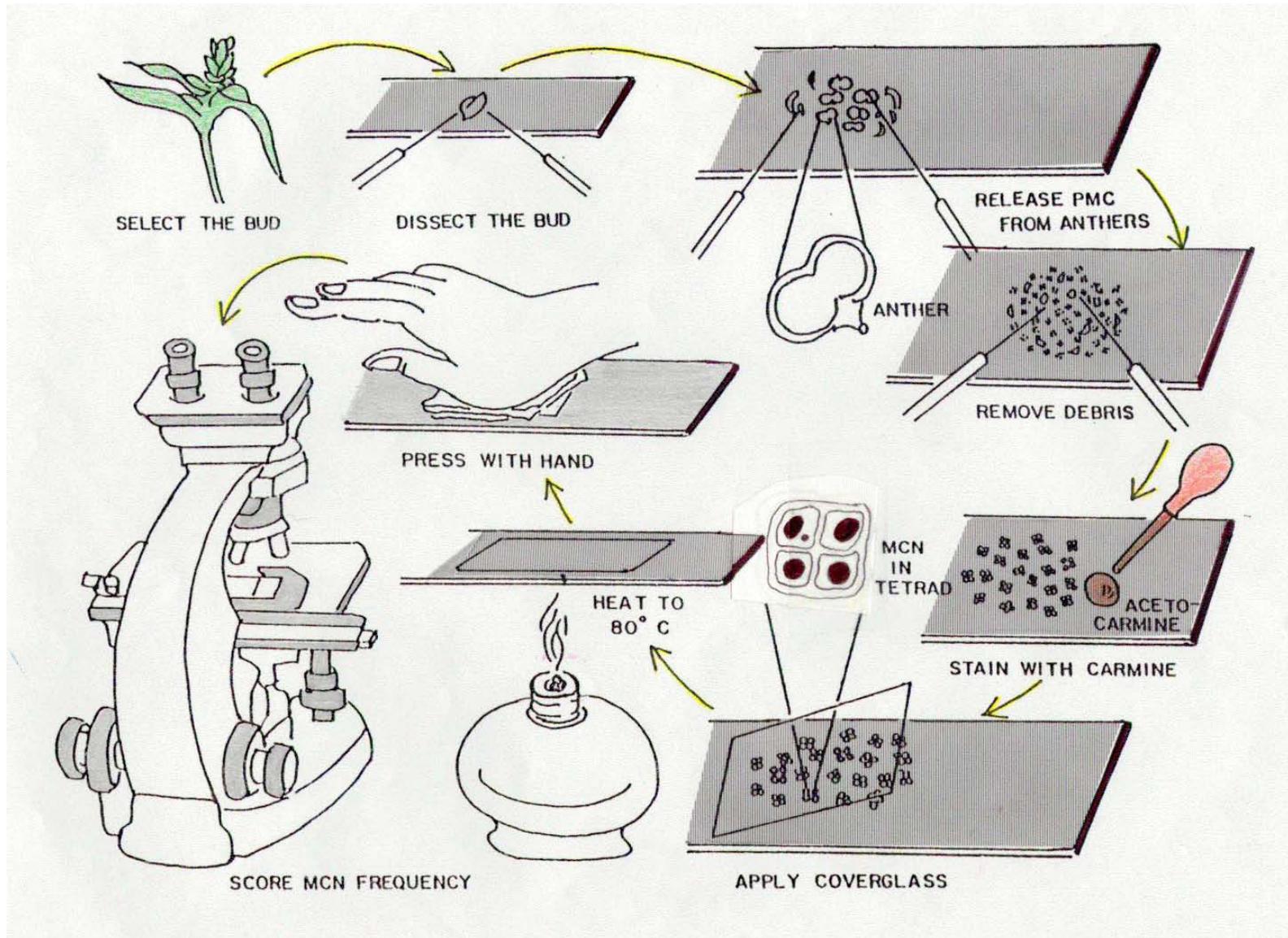


Figure 12 : Protocole du test Tradescantia-MCN d'après Ma et al., 1981

- Les plantes sont placées dans une serre où elles bénéficient de la lumière solaire et d'un éclairage artificiel :
 - lampes fluorescentes : environ 20.000 lux.
 - lampes à sodium : environ 2.000 lux.
- L'intensité lumineuse est mesurée à l'extrémité des plantes.
- Photopériode : 16/8 lum/obs
- Le sol est constitué de terreau, de sable et de tourbe horticole selon des proportions 4:2:1.
- Arrosage : eau du robinet 2 fois par semaine
- Engrais liquide : 2 fois par mois
- Température : 21-25°C le jour et 16°C la nuit.

III.1.2.3. Traitement des inflorescences

De la même façon que pour le test des mutations, les jeunes inflorescences doivent avoir poussé dans de bonnes conditions et sont prélevées de la culture à l'aide d'une lame de rasoir. Les tiges doivent être de longueur comprise entre 10 et 15 cm.

Il est nécessaire de sélectionner 15 inflorescences par concentration pour pouvoir réaliser 5 à 7 lames de cellules au stade tétrade, car toutes les inflorescences ne présentent pas forcément de cellules au bon stade de division. Les inflorescences sont placées dans des béciers en verre de 200 ml contenant les milieux à tester, de façon à n'immerger que les tiges. Les lixiviats sont dilués dans du milieu de Hoagland (Annexe B) préalablement oxygéné. Le témoin négatif est constitué de ce même milieu. Quant au témoin positif, il est réalisé avec une solution de trioxyde d'arsenic (As_2O_3) 1mM dilué dans l'eau ultra-pure.

En principe, il y a 50% de chances pour que les chromosomes soient au stade précoce de la prophase méiotique au début du traitement (stade auquel les cellules sont les plus sensibles). Les cellules seront au début du stade tétrade au bout de 30 heures, c'est le stade le plus adéquat pour la détection des micronoyaux. Dans le cas d'un traitement aigu (inférieur à 30 heures), une période de récupération est nécessaire. Dans ce cas, les inflorescences sont transférées dans du milieu de Hoagland préalablement oxygéné et dilué dans de l'eau du robinet dans des proportions de 2 pour 1.

Dans notre cas, la durée d'exposition a été de 6 heures et a été suivie d'une période de récupération de 24 heures. Les tests sont réalisés à l'obscurité et à une température comprise entre 15 et 20°C.

III.1.2.4. Fixation et coloration des cellules de pollen

Les inflorescences, débarrassées de leurs feuilles et de leur tige, sont fixées pendant une nuit à 4°C dans une solution de Carnoy (aceto-éthanol 1:3) préparée extemporanément. Le fixateur détruit toute vie cellulaire ; il a une action rapide pour bloquer toute évolution des divisions cellulaires et pour permettre de conserver l'intégrité structurale des chromosomes. Les bourgeons peuvent être gardés pendant plusieurs mois dans de l'éthanol à 70% pour une observation ultérieure.

Les bourgeons sont classés selon leur taille sur un contraste noir. Les plus petits bourgeons, qui sont en général près des feuilles protégeant l'inflorescence, sont alors disséqués l'un après l'autre sur une lame de verre pour récupérer les six anthères. En général, un seul bourgeon de l'inflorescence contient les cellules au bon stade (Figure 13).

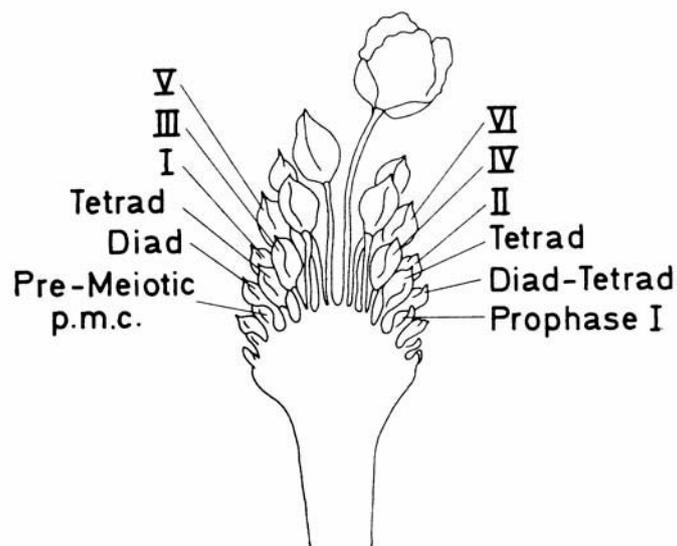


Figure 13 : Stades de division des cellules de pollen dans les différents bourgeons de *Tradescantia*

Il se peut aussi qu'il n'y en ait aucun, d'où la nécessité de prévoir davantage d'inflorescences qu'il n'en faut pour obtenir cinq réplicats. Les anthères susceptibles de contenir les cellules au début du stade tétrade sont sélectionnées sur un fond sombre selon leur taille et leur couleur qui doit être jaune pâle. Il suffit ensuite d'ajouter une goutte de carmin à 1% dans l'acide acétique 45%, et d'écraser doucement les anthères afin de libérer les cellules mères de pollen.

Les lames sont observées à un grossissement de 200 pour vérifier si les cellules sont au début du stade tétrade (stade où une enveloppe entoure les quatre cellules). Si ce n'est pas le cas, d'autres bourgeons sont disséqués et si les cellules sont au stade recherché, il suffit d'éliminer les morceaux d'anthères et d'ajouter à nouveau une goutte d'acéto-carmin avant de poser une lamelle. Les lames sont alors chauffées légèrement sur une flamme ou une plaque chauffante à 80°C et pressées doucement avec la paume de la main sous plusieurs couches de papier absorbant. Ceci a pour but de vérifier que la membrane qui entoure les quatre cellules est bien intacte, et que les cellules sont au bon stade. Seules les lames où les cellules sont au début du stade tétrade sont gardées pour le comptage des micronoyaux.

III.1.2.5. Préparation de lames permanentes

Des lames permanentes peuvent être réalisées selon la technique de Conger & Fairchild (1953). Il s'agit de congeler les lames en les plaçant à -20°C pendant 30 minutes (jusqu'à une nuit si besoin), puis d'enlever la lamelle à l'aide d'une lame de rasoir. Les lames sont ensuite laissées à température ambiante pendant au moins 4 heures, puis elles sont immergées dans les bains successifs :

- acide acétique 45% pendant 1 minute au maximum, cette étape sert à enlever les excès de colorant. L'efficacité de cette étape doit être vérifiée au microscope.

- éthanol 70% pendant 15 minutes

- éthanol 95% pendant 1 heure (jusqu'à quelques jours si nécessaire)

Il s'agit ensuite de préparer une lame à la fois, car il faut sortir une lame du dernier bain d'alcool et y déposer aussitôt une goutte d'Eurapal et une lamelle. Enfin, les lames sont pressées pendant au moins une journée.

III.1.2.6. Examen des cellules de pollen

Il est nécessaire d'observer les cellules "en aveugle", c'est-à-dire d'affecter un code à chacune des lames, de façon à ce que l'expérimentateur ne sache pas de quel groupe il s'agit et ne puisse donc pas être influencé lors du comptage des micronoyaux.

L'examen microscopique des lames est réalisé à un grossissement de 400. 5 lames présentant les cellules au stade tétrade sont examinées pour chacun des groupes. 300 tétrades par lame sont observées, ce qui permet de compter les micronoyaux dans 1500 tétrades par groupe.

Les résultats sont exprimés en nombre de micronoyaux (et non pas en nombre de cellules micronucléées) pour 100 tétrades. Un micronoyau est considéré comme tel lorsqu'il présente les caractéristiques suivantes :

- Il doit :
- être situé dans le cytoplasme de la cellule, entre la membrane nucléaire et la membrane cytoplasmique.
 - ne pas être en contact avec le noyau ou bien être lié à celui-ci par une fraction de chromatine très fine.
 - être de forme arrondie.
 - avoir un aspect comparable à celui du noyau après modification de la mise au point du microscope (même réfraction de la lumière).

III.1.2.7. Analyse statistique

Les données ne présentant pas une distribution normale, les résultats sont analysés à l'aide du test non paramétrique de Kruskal-Wallis. Lorsque l'hypothèse H_0 (selon laquelle les moyennes des différents groupes ne sont pas statistiquement différentes) est rejetée, le test de Dunn permet d'identifier les concentrations testées différentes du témoin négatif. Ces deux tests peuvent être effectués à l'aide du logiciel de statistiques " TOXSTAT " créé par l'US EPA.

III.2. Tests sur *Vicia faba* et *Allium cepa*

Les racines des fèves et des oignons permettent de réaliser deux tests de génotoxicité : le test des micronoyaux et le test des comètes. Elles permettent en outre de déterminer des critères de phytotoxicité tels que l'élongation racinaire et l'indice mitotique. Les étapes de conservation et de préparation des graines de fèves et des bulbes d'oignon étant similaires pour tous les tests, nous les présenterons avant de détailler le protocole de chacun des tests.

III.2.1 Conservation des graines et bulbes

Les graines de *Vicia faba* (variété fève d'Aguadulce à très longue cosse commercialisée par Vilmorin) et les bulbes d'*Allium cepa* (variété oignon blanc printanier parisien commercialisé par Vilmorin) sont conservés à 4°C en chambre froide pendant une durée maximale d'un an.

III.2.2. Préparation des organismes végétaux

- Vicia faba

Les graines sont nettoyées et immergées dans de l'eau déminéralisée pendant une journée à 20°C. Les cosses sont alors enlevées et les graines mises à germer à environ 22°C dans du coton constamment humidifié (Ma et al., 1995). Au bout de 3 jours, les graines laissent apparaître une racine primaire de quelques centimètres dont l'extrémité est coupée (environ 5 mm) afin d'interrompre la croissance de cette racine principale et de stimuler celle des racines secondaires. Les graines dont la taille de la racine primaire est de 3 à 5 cm sont sélectionnées et placées à l'obscurité et à 22°C au-dessus d'un récipient contenant du milieu de Hoagland préalablement aéré par bullage (Kanaya et al., 1994). La composition du milieu de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950), qui est renouvelé une fois par jour est donnée en annexe B. Les racines secondaires des graines atteignent 1 à 3 cm après une période de 4 jours, celles-ci sont alors utilisées pour le test.

- Allium cepa

Les bulbes d'un diamètre de 1,5 cm sont sélectionnés et nettoyés à l'eau déminéralisée. Après avoir ôté les racines et la première pelure (Fiskesjö, 1994), les bulbes sont placés à l'obscurité et à environ 22°C au-dessus d'un récipient contenant du milieu de Hoagland (Annexe B) préalablement aéré par bullage et renouvelé une fois par jour. Au bout de 2 jours, les bulbes dont les racines ont une longueur de 1 à 2 cm sont utilisés pour le test.

III.2.3. Test des micronoyaux

Cet essai de génotoxicité est basé sur la détection de micronoyaux dans les cellules des extrémités racinaires de *Vicia faba* (fève) et d'*Allium cepa* (oignon blanc).

Notons que les 2 tests *Vicia* et *Allium* ont été réalisés au même moment, avec les mêmes matrices et dans les mêmes conditions expérimentales afin de permettre une comparaison des 2 végétaux. Le protocole du test des micronoyaux est inspiré de celui de Ma et al. (1995) pour *Vicia faba* et de celui de Fiskesjö (1994) pour *Allium cepa*. Les principales étapes sont résumées sur la figure 14.

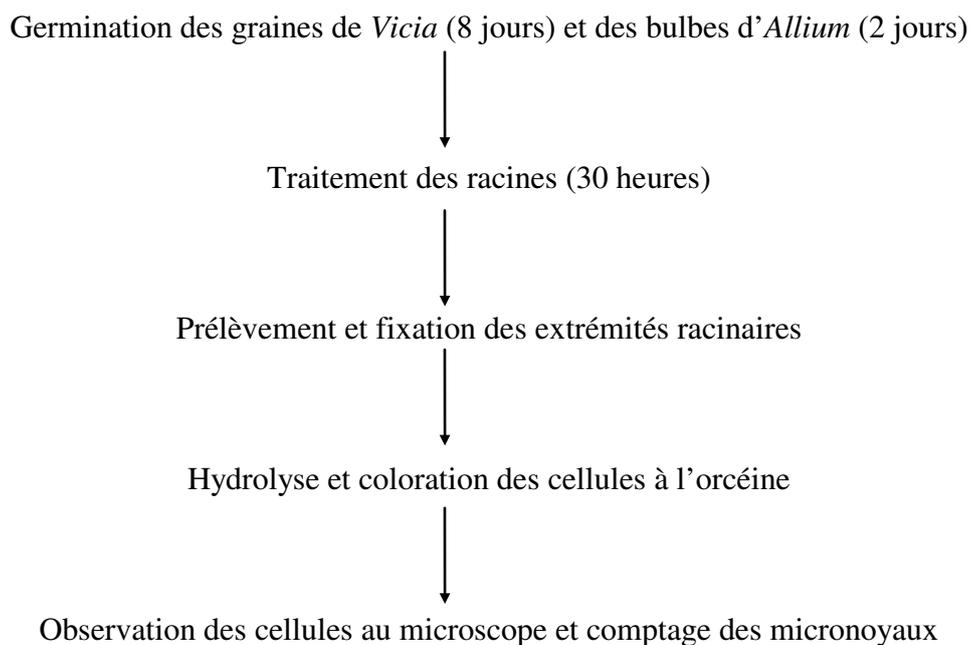


Figure 14 : Schéma du protocole du test des micronoyaux appliqué à *Vicia* et *Allium*

III.2.3.1. Références des produits et du matériel et préparation des solutions

Références des produits et du matériel :

Acide acétique glacial	A-6283	Sigma
HCl	1.00313	Merck
Orcéine	O-7380	Sigma
Hydrazide maléique	D 11,980-6	Aldrich
Sable de Fontainebleau	27460.513	Prolabo
Microscope	BX 40	Olympus
Lames 76x22	05.633.922	Prolabo
Lamelles 16x16	05.640.163	Prolabo

Préparation de la solution d'acéto-orcéine 1% :

0,2 g d'orcéine sont ajoutés à 20 ml d'acide acétique 45% (9 ml d'acide acétique + 11 ml d'eau ultra-pure). Ce mélange est mis à ébullition pendant 10 minutes et filtré après refroidissement. Lors de son utilisation, il est important de filtrer le colorant une fois par jour afin d'éviter la formation de cristaux d'orcéine qui pourraient être confondus avec des micronoyaux pendant l'examen microscopique des cellules.

III.2.3.2. Traitement des graines et bulbes

Il s'agit de placer chacune des graines (ou bulbes) germées sur un tube à essai en plastique contenant le liquide à tester de façon à ce que seules les racines soient immergées. Les lixiviats sont dilués dans du milieu de Hoagland préalablement oxygéné. Le témoin négatif est constitué de ce même milieu. La durée d'exposition est de 30 heures, chaque concentration de lixiviat est remplacée toutes les 12 heures (entre chaque changement, les lixiviats sont conservés à 4°C et à l'obscurité). Cette durée d'exposition a été sélectionnée d'après les résultats d'expériences préliminaires menées sur le lixiviat du sol SI (Tableaux XX et XXI).

La substance de référence utilisée est l'hydrazide maléique. Des expériences préliminaires nous ont conduits à choisir les conditions suivantes d'exposition des organismes à l'hydrazide maléique :

- concentration : 10^{-5} M (soit 1,12 mg/l) pour *Vicia* et 10^{-4} M (soit 11,2 mg/l) pour *Allium*
- milieu de dilution : milieu de Hoagland
- durée d'exposition : 6 heures + période de récupération de 42 heures

En ce qui concerne l'exposition des racines des fèves et des oignons aux sols mélangés au milieu de Hoagland, la durée d'exposition est aussi de 30 heures.

Concentration de lixiviat (%)	Durée d'exposition				
	6h	18h	30h	42h	54h
0	0,7 ± 0,9	0,7 ± 0,7	0,3 ± 0,7	1,4 ± 1,5	0,6 ± 0,7
0,1	0,6 ± 0,7	0,6 ± 0,7	0,7 ± 0,5	0,6 ± 0,7	2,0 ± 1,9
1	0,6 ± 0,7	0,3 ± 0,7	0,7 ± 0,9	1,8 ± 1,2	2,0 ± 1,5
10	0,6 ± 1,0	0,2 ± 0,4	0,3 ± 0,5	0,8 ± 0,7	0,7 ± 1,0
100	1,0 ± 0,9	0,7 ± 0,7	4,4 ± 2,2 *	2,7 ± 0,7 *	1,0 ± 0,9

Tableau XX : Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux/1000 cellules (nb lames observées = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations du lixiviat du sol S1. La durée d'exposition est de 6 heures (suivie d'une période de récupération de 24 heures), 18 heures (suivie d'une période de récupération de 12 heures), 30, 42 ou 54 heures.

* moyennes significativement différentes au seuil de 5%

Concentration de lixiviat (%)	Durée d'exposition				
	6h	18h	30h	42h	54h
0	0,3 ± 0,5	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,7	0,2 ± 0,4	0,3 ± 0,7
0,1	0,4 ± 0,7	0,3 ± 0,7	0,3 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,2 ± 0,4
1	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0,4	0,4 ± 0,7	0,2 ± 0,4
10	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,9 ± 1,0
100	0,7 ± 1,0	0,4 ± 0,5	0,9 ± 0,5	0,3 ± 0,5	0,9 ± 1,0

Tableau XXI : Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux/1000 cellules (nb lames observées = 9) dans les racines d'*Allium cepa* exposées à différentes concentrations du lixiviat du sol S1. La durée d'exposition est de 6 heures (suivie d'une période de récupération de 24 heures), 18 heures (suivie d'une période de récupération de 12 heures), 30, 42 ou 54 heures.

* moyennes significativement différentes au seuil de 5%

Quant à l'exposition directe des organismes végétaux aux sols contaminés (qui est réalisée dans des pots en plastique), ceux-ci ne sont pas préparés de la même façon. En effet, les graines de *Vicia faba* sont mises à germer de façon à n'obtenir que des racines primaires puisque les racines secondaires pousseront directement dans les sols testés ; les bulbes d'*Allium cepa* sont placés sans aucune germination préalable à la surface des sols à tester dans lesquels les racines se développeront. Les différentes concentrations de sol contaminé sont réalisées en mélangeant chaque sol à du sable de Fontainebleau (granulométrie : 150-210 μm) qui est également utilisé comme témoin négatif. La durée d'exposition est respectivement de 3 et 5 jours pour *Allium cepa* et *Vicia faba*. Pendant cette période, les sols sont arrosés une fois par jour avec de l'eau ultra-pure.

Afin de limiter la variabilité intra-individuelle, 5 réplicats par concentration sont utilisés mais seuls les 3 organismes présentant la plus forte croissance racinaire sont conservés pour déterminer les critères étudiés.

Les conditions des tests sont : - obscurité
- 15 à 20°C

III.2.3.3. Fixation et coloration des extrémités racinaires

Les racines sont nettoyées à l'eau ultra-pure et les deux derniers centimètres sont prélevés et fixés à 4°C pendant une durée minimale d'une nuit dans un mélange éthanol/acide acétique glacial (3:1) préparé extemporanément (Kanaya et al., 1994). Ce mélange appelé solution de Carnoy est très instable, il peut se produire une estérification s'il n'est pas préparé au moment de l'utilisation. L'éthanol a pour effet de précipiter et dénaturer les protéines, de dissoudre certains lipides et de durcir les tissus. L'acide acétique est un bon fixateur des chromosomes, il précipite les protéines du noyau.

Les extrémités racinaires peuvent ensuite être conservées à long terme dans de l'éthanol à 70% pour une observation différée ou bien être hydrolysées dans le cas d'une observation immédiate. Les extrémités racinaires sont alors placées dans de l'eau distillée pendant 10 minutes, hydrolysées dans HCl 1N à 60°C pendant 4 à 6 minutes pour *Vicia faba* et 5 et 9 minutes pour *Allium cepa* et à nouveau transférées dans de l'eau distillée. L'hydrolyse a pour but la destruction de la lamelle moyenne composée principalement de pectines, ce qui facilite les étalements cellulaires.

Il s'agit ensuite de poser une extrémité racinaire sur une lame, d'enlever la coiffe et le premier millimètre correspondant à la région méristématique et de ne garder que le deuxième

millimètre qui est constitué par les cellules filles F1 (Ma et al., 1995). La coloration des cellules est réalisée en écrasant les racines avec une goutte d'acéto-orcéine avant de placer la lamelle.

III.2.3.4. Examen des cellules des extrémités racinaires

Il est nécessaire, avant l'observation des cellules, d'affecter un code à chacune des lames, de façon à ce que l'expérimentateur ne sache pas à quel groupe les lames correspondent et ainsi ne puisse pas être influencé lors du comptage des micronoyaux.

L'examen microscopique des lames est réalisé à un grossissement de 1000. Trois lames sont préparées pour chacun des 3 réplicats au sein de chaque groupe. Etant donné que 1000 cellules par lame sont observées, le comptage des micronoyaux est effectué dans 9000 cellules par groupe.

Les résultats sont exprimés en nombre de micronoyaux (et non pas en nombre de cellules micronucléées) pour 1000 cellules.

III.2.3.5. Analyse statistique

Dans le cas présent, le nombre de micronoyaux, pour les témoins, est soit de 0, soit de 1, ce qui pose un problème particulier pour ce qui concerne l'interprétation des données. Compte-tenu de la présence de nombreux 0 dans la distribution des valeurs du témoin qui se traduit par un écart-type plus élevé que la moyenne, nous n'avons pas exploité ces valeurs avec un test qui supposait une distribution normale des valeurs pour le témoin (cf. test de Williams ou test de Dunnett).

En accord avec le travail de Maul et Férard (1998), nous avons préféré utiliser, pour le calcul des LOEC, le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn (tous deux intégrés dans le logiciel "TOXSTAT") en évitant de prendre en compte les données résultant du phénomène de cytotoxicité, où le nombre de micronoyaux diminue. En effet, ces résultats représentent un biais car cette diminution correspond non pas à une diminution de l'effet génotoxique, mais à un effet cytotoxique qui empêche de rendre les micronoyaux visibles. Par ailleurs, afin de ne pas diminuer la puissance du test de Dunn et dans le but de pouvoir comparer les résultats à ceux du test *Tradescantia*-micronoyaux, nous avons considéré que les neuf racines prélevées sur les trois organismes étaient des vrais réplicats. Bien que critiquable, ce choix se justifie par les différences entre les modes opératoires (5 vrais réplicats pour *Tradescantia*, 3 x 3 pseudo-réplicats pour *Vicia* et *Allium*) et le souci de comparer un maximum de données entre elles.

III.2.4. Test des comètes

Ce test est basé sur la détection des coupures simple et double brin ainsi que des sites "alcalilabiles" dans les cellules des extrémités racinaires des fèves et des oignons. Le principe est d'isoler les noyaux des cellules racinaires, de les inclure dans un gel d'agarose, et de les observer après une lyse et une électrophorèse dans des conditions alcalines.

Le protocole suivi est celui décrit par Singh et al. (1988) avec quelques modifications dont la plus importante est liée au fait que ce sont des noyaux qui sont isolés et non pas des cellules. Les principales étapes sont résumées sur la figure 15

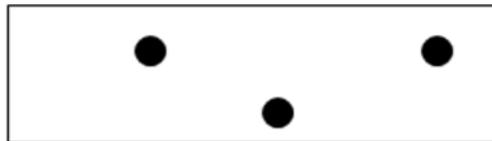
Notons que les 2 tests *Vicia* et *Allium* ont été réalisés au même moment, avec les mêmes matrices et dans les mêmes conditions expérimentales afin de permettre une comparaison des résultats obtenus avec les deux végétaux.

III.2.4.1. Références des produits et du matériel et préparation des solutions

Références des produits et du matériel :

Agarose LMP	1690701	Boehringer Mannheim
NaCl	1.06404	Merck
Na ₂ HPO ₄ , 2 H ₂ O	6580	Merck
KCl	1.11736	Merck
KH ₂ PO ₄	P-5379	Sigma
Na ₂ EDTA	1.08418	Merck
Tris	T-1378	Sigma
DMSO	D-5879	Sigma
Triton X-100	T-9284	Sigma
NaOH	1.06498	Merck
Bromure d'éthidium	E-1510	Sigma

- ◆ Germination : Allium-comètes : 2 jours
Vicia-comètes : 8 jours
- ◆ Exposition des racines : 4 heures
- ◆ Préparation des suspensions nucléaires : découpe de 20 racines dans 200 μ l de tampon (PBS + Na₂EDTA 1 mM), filtration 20 μ m.
- ◆ Préparation des lames : 1^{ère} couche = 70 μ l LMPA 0,5%
2^{ème} couche = mélanger 70 μ l suspension nucléaire + 150 μ l LMPA 0,8% et déposer 100 μ l de ce mélange sur chaque lame (2 lames par réplicat)
3^{ème} couche = 85 μ l LMPA 0,5%



- ◆ Lyse alcaline : solution de lyse = NaCl 2,5M + Na₂EDTA 100mM + Tris 10mM, ajuster le pH à 10,5. A conserver à 4°C 1 mois au maximum.

Extemporément, ajouter à la solution de lyse DMSO 10% + Triton X100 1%.

Durée = 3 jours à 4°C

- ◆ Rinçage dans la solution d'électrophorèse = NaOH 300 mM + Na₂EDTA 1 mM
- ◆ Dénaturation dans la solution d'électrophorèse. Durée = 1 heure à 4°C
- ◆ Electrophorèse : 25 Volts, 300mA, 25 minutes.
- ◆ Neutralisation : solution Tris 0,4 M, pH ajusté à 7,5 avec HCl. 3 fois 10 min.
- ◆ Rinçage dans eau MilliQ à 4°C
- ◆ Fixation dans le méthanol pur (de 5 minutes à 1 nuit)
- ◆ Rinçage dans eau MilliQ à 4°C
- ◆ Révélation : Bromure d'éthidium : 30 μ l de BET 2 μ g/ml
- ◆ Mesure des dommages de l'ADN au microscope à fluorescence et analyse d'images

Figure 15 : Etapes du test des comètes (protocole de Singh *et al.*, 1988 modifié)

Microscope à fluorescence	BX 60	Olympus
Caméra CCD monochrome		Hitachi
Polystat	B 33194	Bioblock
Cuve d'électrophorèse	BM 200	Boehringer Ingelheim
Générateur	PAC 200	Bio-Rad
Lames Superfrost 76x22	A 14.467.01	Fisher Scientific
Lamelles 22x50	A 14.481.27	Fisher Scientific
Filtre Nytrel TI-20	74100 S	UGB

Préparation des solutions :

- Tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline) : une solution mère est préparée selon les concentrations suivantes :

NaCl	8 g/l
Na ₂ HPO ₄	1,15 g/l
KCl	200 mg/l
KH ₂ PO ₄	200 mg/l

Les produits sont dissous les uns après les autres dans l'eau ultra-pure et le pH est ajusté à 7,4. La solution peut se garder à 4°C pendant 1 mois.

- Solutions d'agarose LMP (Low Melting Point) à 0,5% et 0,8% : l'agarose LMP est dissous le jour même de l'utilisation dans du tampon PBS à 90°C (la température de fusion est de 65°C). Les solutions sont maintenues à 35°C dans un bain-marie.

- Solution de lyse : une solution mère est préparée dans les concentrations suivantes :

NaCl 2,5 M	146,1 g/l
Na ₂ EDTA 100 mM	37,2 g/l
Tris 10 mM	1,2 g/l

Les produits sont dissous les uns après les autres dans l'eau ultra-pure (il est nécessaire de chauffer la solution à 40°C pour faciliter leur dissolution) et le pH est ajusté à 10,5 avec des pastilles de NaOH. Cette solution peut se garder à 4°C pendant 1 mois.

Avant chaque expérimentation, du DMSO (diméthylsulfoxyde) et du Triton X-100 sont ajoutés à la solution stock à des concentrations respectives de 10 et 1%. Par exemple, à 75 ml de solution stock sont ajoutés 8,5 ml de DMSO et 0,85 ml de Triton X-100.

- Tampon d'électrophorèse : deux solutions mères sont préparées dans les concentrations suivantes :

NaOH 10 N	400 g/l
Na ₂ EDTA 200 mM	74,4 g/l

Ces deux solutions se conservent à 4°C pendant 2 semaines.

Le tampon d'électrophorèse est préparé extemporanément à partir de ces deux solutions mères afin d'obtenir des concentrations respectives en NaOH et en Na₂EDTA de 300 mM et de 1 mM. Par exemple, 45 ml de NaOH et 7,5 ml de Na₂EDTA sont mélangés à de l'eau ultra-pure pour obtenir un volume total de 1,5 l de tampon d'électrophorèse.

- Tampon de neutralisation : il est composé de Tris 0,4 M (48,4 g/l). Le pH est ajusté à 7,5 en ajoutant du HCl concentré. Le tampon est conservé à 4°C pendant 1 mois et utilisé tel quel.

- Solution de révélation : une solution mère de bromure d'éthidium est préparée à 200 µg/ml à partir de laquelle une solution à 2 µg/ml est élaborée pour chaque expérimentation. Ce produit doit être manipulé avec précaution par l'expérimentateur du fait de ses effets mutagènes.

III.2.4.2. Traitement des graines et bulbes

Il s'agit de placer chacune des graines (ou bulbes) germées sur un tube en plastique contenant les lixiviats de sols contaminés de façon à ce que seules les racines soient immergées. Les lixiviats sont dilués dans du milieu de Hoagland préalablement oxygéné. Le témoin négatif est constitué de ce même milieu. La durée d'exposition est inférieure à celle requise pour le test des micronoyaux puisque des expériences préliminaires nous ont démontré qu'une durée de 4 heures était suffisante pour visualiser des effets, sans phase de récupération comme c'est le cas dans le test des micronoyaux.

III.2.4.3. Isolement des noyaux

Il faut souligner que ce sont les noyaux qui sont isolés, et non pas des cellules, comme c'est le cas lorsque le test des comètes est réalisé dans les domaines humain et animal.

L'ensemble des étapes suivantes se déroule à 4°C et en lumière rouge.

Dès la fin du traitement, les racines (au nombre de 10 pour *Vicia faba* et 20 pour *Allium cepa*) sont prélevées. Afin de réduire au mieux la variabilité des résultats entre les noyaux d'une même lame, il a été nécessaire de définir avec précision la zone racinaire à prélever. Etant donné que les extrémités racinaires sont le siège d'un grand nombre de mitoses (ce qui se traduit par

l'observation de noyaux de taille très différente), les cinq premiers millimètres sont enlevés et une zone de 1 cm est prélevée pour l'isolement des noyaux.

Ces fragments de racines sont ensuite nettoyés à l'eau ultra-pure et déposés dans un pilulier en verre placé sur de la glace et contenant 200 µl d'un tampon composé de PBS et de Na₂EDTA 1 mM. Ils sont alors précautionneusement découpés en très petits morceaux à l'aide d'une lame de rasoir, un certain nombre de noyaux sont alors libérés des cellules et se retrouvent dans le tampon. La suspension nucléaire ainsi obtenue est filtrée sur un filtre Nytrex[®] réalisé en polyamide monofilament de 20 µm, les noyaux des extrémités racinaires de *Vicia* et d'*Allium* ayant un diamètre d'environ 15 µm. Cette étape de filtration sert à éliminer les débris végétaux.

Notons que les racines proviennent de 2 organismes différents et sont mélangées ensemble. La suspension nucléaire obtenue sert à préparer 2 lames par lot expérimental.

III.2.4.4. Préparation des lames

Les lames de microscope sont recouvertes de 70 µl d'agarose LMP 0,5% par étalement avec un cône de micropipette. Afin d'éviter les problèmes de décollement des gels d'agarose, il est important de préparer ces lames au moins une semaine auparavant (de façon à ce que la première couche soit bien sèche). Ensuite il est possible de les conserver à température ambiante pendant une durée maximale de 3 mois.

Il s'agit ensuite de mélanger 70 µl de suspension nucléaire et 150 µl d'agarose LMP 0,8% dans un eppendorf et de déposer doucement 100 µl de ce mélange sur la lame. Cette seconde couche est recouverte d'une lamelle et les lames ainsi préparées sont posées sur de la glace pour que l'agarose se solidifie.

Après solidification des gels d'agarose, les lames sont débarrassées de leur lamelle et une troisième couche constituée de 85 µl d'agarose LMP 0,5% est déposée sur chaque lame. De la même façon, les lames sont recouvertes d'une lamelle et maintenues sur de la glace.

III.2.4.5. Lyse

Démunies de leur lamelle, les lames sont aussitôt immergées dans la solution de lyse pendant 24 heures à 4°C. Cette étape permet la lyse des membranes nucléaires et la dénaturation de l'ADN, c'est-à-dire la séparation des 2 brins de la double hélice.

Cette solution de lyse est composée de sels et de détergents ayant chacun un rôle précis :

- la force ionique du NaCl permet de désunir les protéines et l'ADN et induit ainsi la séparation des brins d'ADN.
- Na₂EDTA empêche l'action dégradatrice des nucléases sur l'ADN en complexant leurs cofacteurs métalliques Mg²⁺.
- NaOH et Tris permettent de rendre alcalin le pH de la solution.
- DMSO est un anti-oxydant, il capte les radicaux libres.
- triton X-100 est un détergent qui détruit les membranes cellulaires et nucléaires.

III.2.4.6. Dénaturation et électrophorèse

Lorsque la période de lyse des membranes nucléaires est achevée, les lames sont rincées dans la solution d'électrophorèse afin d'éliminer les sels et les détergents qui pourraient empêcher la migration de l'ADN pendant l'électrophorèse (comme le NaCl) ou interférer avec le BET.

Les lames sont ensuite immergées dans la solution d'électrophorèse pendant 1 heure à 4°C. Cette étape permet la dénaturation et le déroulement de l'ADN.

Cette étape importante doit être réalisée en conditions alcalines (grâce à la présence de NaOH) afin de permettre non seulement la mise en évidence des coupures double brin mais également des coupures simple brin et l'expression des sites " alcali-labiles ".

Il convient alors de placer les lames les unes à côté des autres dans une cuve d'électrophorèse horizontale. La solution d'électrophorèse maintenue à 4°C, immerge totalement les lames de quelques millimètres. L'électrophorèse est réalisée selon les paramètres suivants :

- voltage : 1 V/cm, soit 20 V
- ampérage : environ 300 mA réglé en faisant varier le volume du tampon d'électrophorèse (s'ajuste en réalité à environ 500 mA)
- durée : 25 minutes

Les molécules d'ADN, étant chargées négativement du fait de la présence de phosphates, migrent vers l'anode lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. La vitesse de migration ne dépend que de la taille des éléments, puisque la concentration en agarose et le voltage sont constants. Par conséquent, si des coupures de l'ADN ont eu lieu, les fragments de petite taille vont

migrer plus loin que la masse d'ADN principale et former ainsi une image ressemblant à une comète.

III.2.4.7. Révélation de l'ADN

Cette étape doit être précédée d'une neutralisation car le révélateur utilisé est le bromure d'éthidium (BET) qui est un intercalant entre les bases des deux brins d'ADN, par conséquent les brins d'ADN doivent être réappariés pour que le BET puisse révéler l'ADN. La neutralisation se fait en plaçant les lames dans le tampon de neutralisation pendant 10 minutes. Cette opération est renouvelée deux fois.

Les lames sont ensuite rincées dans de l'eau ultra-pure, fixées pendant 1 minute dans du méthanol pur, puis à nouveau rincées dans de l'eau ultra-pure. La révélation de l'ADN se fait en déposant 30 µl de bromure d'éthidium (BET) à 2 µg/ml sur le gel d'agarose avant de placer la lamelle. Ce fluorochrome, spécifique de l'ADN, a la propriété de s'intercaler entre les bases des acides nucléiques du fait de la planéité de sa structure.

III.2.4.8. Examen des lames

L'examen des lames est réalisé à l'aide d'un microscope à fluorescence équipé d'un miroir dichroïque DM 570 (filtre d'excitation : BP 510-550 nm ; filtre barrière BA 590 nm) et relié par l'intermédiaire d'une caméra CCD à un analyseur d'images. Le logiciel Komet 3.1 (Kinetic Imaging Ltd., Liverpool, UK) détermine les paramètres choisis après analyse d'images.

50 noyaux sont analysés (25 par lame) pour chaque groupe à un grossissement de 200.

Nous avons sélectionné deux paramètres :

- la distance de migration (" tail length ") qui correspond à la longueur de la queue des comètes.
- le moment de la queue des comètes défini selon Olive (" Olive tail moment ") :

(longueur de la queue de la comète) x (pourcentage d'ADN dans la queue de la comète)

III.2.4.9. Analyse statistique

Nous n'avons pas pu réaliser d'ANOVA avec les données obtenues dans le test des comètes car cela nécessite que les variances des différents échantillons soient homogènes. Or cette condition n'est pas vérifiée dans aucun des cas, même en réalisant les transformations de variables disponibles sur le logiciel TOXSTAT. Compte tenu de cet état de fait et faute d'avoir eu le temps de trouver une

transformation adéquate, nous avons dû nous résigner à utiliser le test de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn. Néanmoins, ce choix nous permet de respecter une certaine homogénéité dans le traitement statistique des données puisque les valeurs du test des micronoyaux sont analysées avec ce même test.

III.2.5. Tests de toxicité

Des critères de toxicité sont déterminés sur les mêmes organismes végétaux que ceux utilisés pour le test des micronoyaux. Il s'agit de l'élongation racinaire et de l'indice mitotique, tous deux révélateurs de la croissance des racines.

Les modes d'exposition de *Vicia* et d'*Allium* pour ces tests sont les mêmes que pour le test des micronoyaux, à savoir, une exposition des racines aux lixiviats et aux sols dilués dans du milieu de Hoagland, et une germination des organismes végétaux dans les sols contaminés (cf. § II.1.).

III.2.5.1. L'élongation racinaire

L'élongation racinaire est simplement calculée en mesurant les racines avant et après l'exposition des fèves et des oignons aux matrices contaminées.

Dans le cas de *Vicia faba*, les longueurs de trois racines par graine sont mesurées au début et à la fin de l'exposition et trois graines sont utilisées. Les résultats présentés correspondent à la moyenne des différences obtenues. Dans le cas d'*Allium cepa*, les racines croissent de façon homogène, il s'agit donc de mesurer le groupe de racines de chaque bulbe au début et à la fin de l'exposition (Fiskesjö, 1993a). De la même façon que pour *Vicia*, les résultats correspondent à la différence entre ces deux valeurs.

III.2.5.2. L'indice mitotique

L'indice mitotique correspond à la proportion de cellules en cours de division mitotique. Il est nécessaire d'exposer les racines puis de préparer les étalements cellulaires comme dans le cas du test des micronoyaux (cf. § III.2.3.). Enfin, les cellules en division sont dénombrées pour 1000 cellules par lame. 9 lames sont préparées par concentration. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules en cours de division pour 100 cellules.

Notons que tous les stades de la mitose sont pris en compte, de la prophase (lorsque les chromosomes commencent à se condenser) jusqu'à la télophase (lorsque la chromatine des deux noyaux formés à chaque pôle de la cellule finit de se décondenser).

III.2.5.2. Analyse statistique

Les valeurs de chacun des témoins suivent une loi de distribution normale, les variances sont relativement homogènes, en conséquence, nous avons choisi d'exploiter ces données avec une ANOVA puis le test paramétrique de Dunnett pour ce qui concerne la comparaison des diverses concentrations testées avec le témoin négatif.

III.3. Test Mutatox

III.3.1. Principe

Ce test de génotoxicité utilise des mutants non luminescents *Vibrio fischeri* M169 (Kwan et al., 1990). Le principe est basé sur le fait que ces bactéries peuvent subir une mutation réverse qui les fait récupérer leur propriété luminescente en présence d'agents mutagènes. Ce test présente l'avantage de ne pas nécessiter de filtration stérilisante, contrairement au test d'Ames.

III.3.2. Méthodologie

Les essais ont été réalisés selon la méthode décrite par la firme Microbics, avec ou sans activation métabolique (c'est-à-dire avec ou sans ajout de mélange S9 mix contenant les enzymes et les cofacteurs nécessaires à l'activation des substances testées) sur des échantillons qui n'ont pas besoin d'être nécessairement stériles. L'exposition de la souche bactérienne à l'échantillon, avec et sans S9 mix, a été effectuée en milieu liquide à 27°C pendant 16, 20 et 24 heures. Pour le test en présence de S9 mix, une pré-incubation à 35°C pendant 30 minutes est nécessaire avant l'exposition. La luminescence a été mesurée à l'aide du bioluminomètre Microbics M5000.

III.3.3. Interprétation des résultats

La différenciation entre échantillons génotoxiques et suspects se fera sur les bases ci-dessous :

a) les échantillons génotoxiques qui remplissent les 3 conditions suivantes :

- la luminescence induite est au moins deux fois supérieure à celle mesurée dans les témoins
- la luminescence induite est au moins supérieure à 50 URL (Unités relatives de luminescence)
- cette induction est trouvée croissante dans au moins deux concentrations successives de l'échantillon analysé (nécessité d'avoir une relation concentration-réponse).

b) les échantillons suspects qui remplissent seulement les 2 conditions suivantes :

- la luminescence induite est au moins deux fois supérieure à celle mesurée dans les témoins
- la luminescence induite est au moins supérieure à 50 URL

En outre, le temps d'exposition est une variable qui ne sera pas prise en compte : autrement dit il suffira que l'échantillon soit trouvé génotoxique pour la souche considérée à un seul temps pour le déclarer génotoxique.

Résultats et Discussion

1ère partie : Les sols contaminés

Pour mémoire, nous rappellerons ci-dessous la nature des quatre sols contaminés :

- sol SI : sol S0 (sol de La Bouzule) artificiellement contaminé par des métaux (Cr, Pb, Zn et Cd)
- sol SII : sol S0 (sol de La Bouzule) artificiellement contaminé par des substances organiques (trichlorophénol, pentachlorophénol et phénanthrène)
- sol SIII : sol industriel pollué par des métaux et des solvants
- sol SIV : sol pollué par des résidus de cokerie

I. Tests sur lixiviats

Nous présenterons, dans cette partie, un exemple de l'allure de la courbe concentration-réponse pour chacun des tests sélectionnés, suivi de l'ensemble des résultats relatifs aux tests de génotoxicité et de toxicité sur plantes réalisés sur les lixiviats des quatre sols contaminés. Une partie des résultats présentés dans ce chapitre ont fait l'objet d'une publication (Cotelle et al., 1999).

I.1. Tests sur *Tradescantia*

I.1.1. Test des mutations

Ce test permet d'évaluer, dans les poils staminaux de *Tradescantia* exposé aux lixiviats testés, la fréquence de mutations qui apparaissent sous forme de cellules roses (Figure 16).

I.1.1.1. Allure de la courbe concentration-réponse

Nous présentons en figure 17 le type de courbe concentration-réponse qui peut être obtenue avec ce test. Dans cet exemple, pour les témoins, le nombre de mutations pour 1000 poils staminaux varie de 0,81 à 4,33. La moyenne des valeurs obtenues pour le témoin (2,9) augmente d'un facteur proche de 4 pour la plus forte concentration de lixiviat (90%).

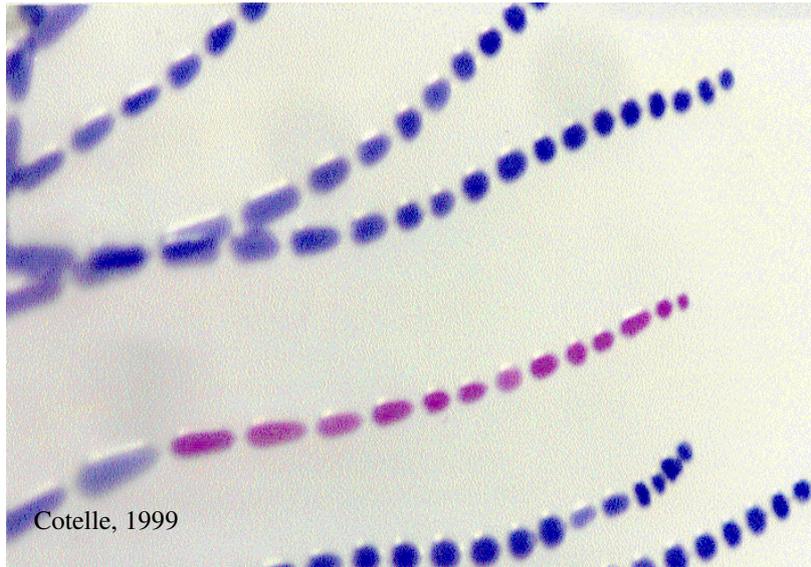


Figure 16 : Cellules mutées (de couleur rose) et cellules normales (de couleur bleue) des poils staminaux de *Tradescantia*

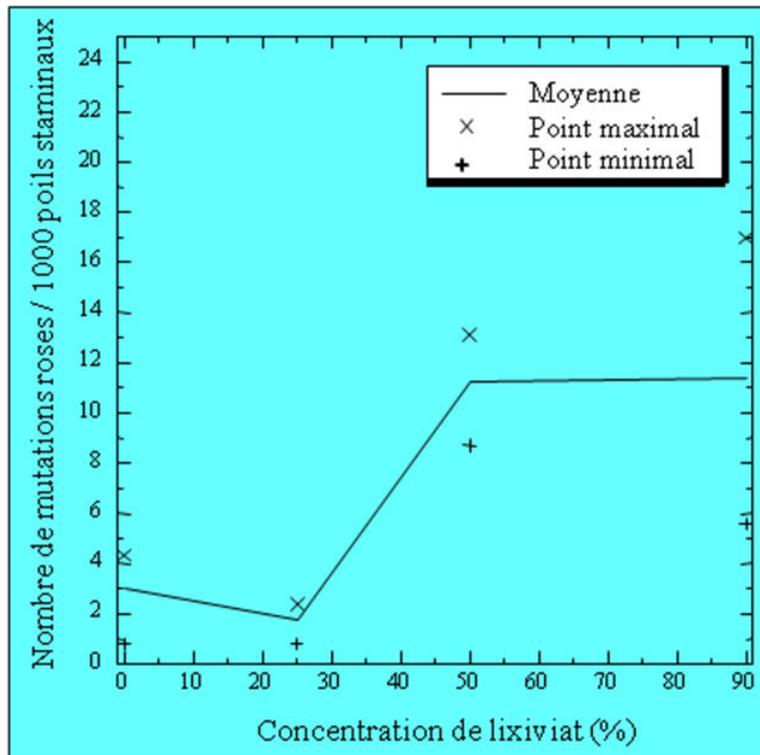


Figure 17 : Allure de la courbe concentration-réponse obtenue avec le test *Tradescantia*-mutations. Cas du lixiviat du sol SIII.

La fréquence de mutations augmente pour les plus fortes concentrations de lixiviat testées puis atteint un plateau.

I.1.1.2. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols

Le tableau XXII présente les résultats des tests *Tradescantia*-mutations réalisés sur les lixiviats des sols artificiellement contaminés SI et SII et des sols pollués réels SIII et SIV.

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)		
	25	50	90
SI			+
SII			
SIII			+
SIV			+

Tableau XXII : Résultats des tests *Tradescantia*-mutations réalisés sur le lixiviat des sols contaminés (expériences réalisées entre Nov 97 et Juil 98)

	concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)
+	concentration d'effet maximal

Les lixiviats des sols contaminés testés induisent très peu de mutations roses dans les poils staminaux. C'est le sol SIII qui est le plus mutagène pour cette plante, puisque nous observons un effet significatif dès 50% de lixiviat.

Pour les sols SI et SIV, la fréquence de mutations n'est significativement augmentée par rapport au témoin qu'à la concentration la plus forte, à savoir 90% de lixiviat.

Quant au sol SII, le lixiviat n'induit aucun effet mutagène significatif.

I.1.2. Test des micronoyaux

La fréquence d'apparition des micronoyaux est déterminée dans les cellules de pollen sous forme de tétrades après exposition des inflorescences de *Tradescantia* aux lixiviats testés (Figure 18).

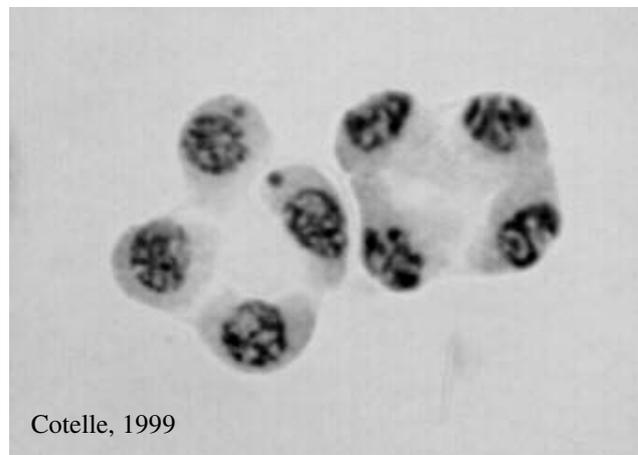


Figure 18 : Cellules de pollen au stade tétrade présentant des micronoyaux dans les bourgeons de *Tradescantia*

I.1.2.1. Allure de la courbe concentration-réponse

La figure 19 montre l'allure de la courbe concentration-réponse de ce test. Dans cet exemple, pour les témoins, le nombre de micronoyaux varie de 2,6 à 6,2 pour 100 tétrades.

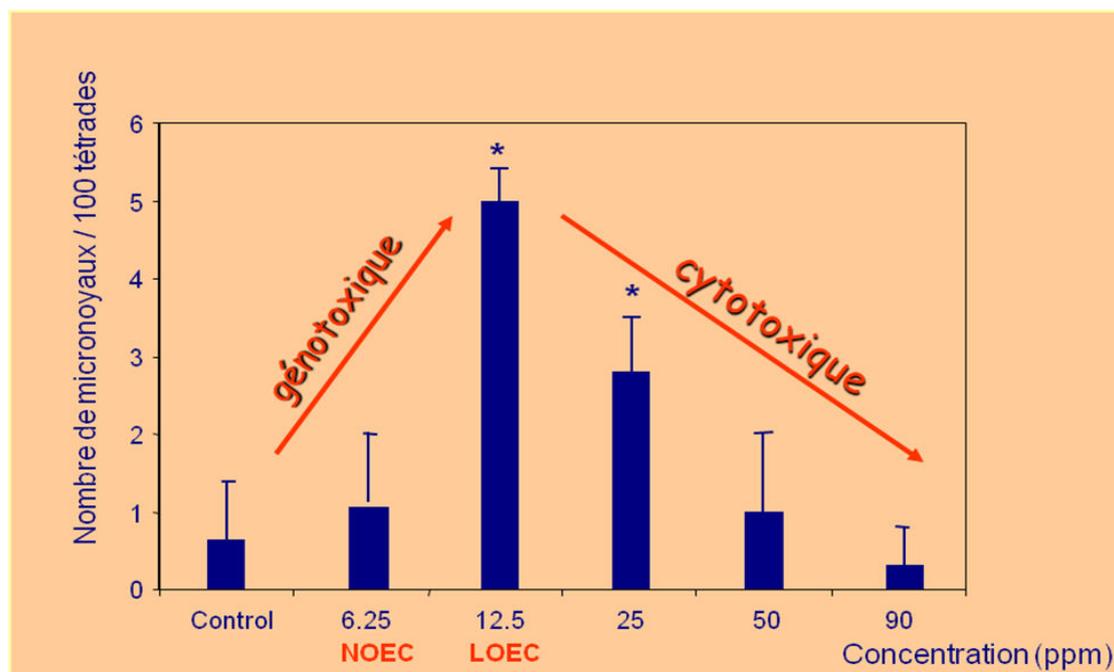


Figure 19 : Allure de la courbe concentration-réponse obtenue avec le test *Tradescantia*-micronoyaux.

La moyenne des valeurs obtenue pour les témoins (5,1) augmente d'un facteur proche de 3 pour la concentration de lixiviat qui entraîne le nombre maximal de micronoyaux (25 %). La fréquence de micronoyaux dans les cellules mères de pollen de *Tradescantia* augmente avec la concentration de lixiviat testée et peut ensuite diminuer si des effets cytotoxiques surviennent. La partie descendante de la courbe ne correspond pas forcément à une diminution de la génotoxicité, mais met en évidence un effet cytotoxique du lixiviat qui « masque » l'effet génotoxique. Ce phénomène, appelé "hormesis" (Calabrese et Baldwin, 1997), est relativement courant en génotoxicité. En effet, pour que les micronoyaux soient visibles dans le cytoplasme des cellules, il est impératif que la division cellulaire ne soit pas altérée car ils se forment pendant cette étape et sont séparés du noyau à la fin de la méiose. Or, dans le cas où les micropolluants retardent ou inhibent la division cellulaire, nous ne pouvons plus observer de micronoyaux.

I.1.2.2. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols

Pour chacun des sols contaminés, l'exposition des inflorescences de *Tradescantia* au lixiviat induit la formation de micronoyaux dans les cellules mères de pollen de façon significative (Tableau XXIII).

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)				
	6	12	25	50	90
SI			+		
SII			+		
SIII			+		
SIV					+

Tableau XXIII : Résultats des tests *Tradescantia*-micronoyaux réalisés sur le lixiviat des sols contaminés (expériences réalisées en Dec 97)

	concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)
+	concentration d'effet maximal

L'augmentation du nombre de micronoyaux dans les bourgeons de *Tradescantia* est significative à partir d'une concentration de 25% de lixiviat dans les cas des sols SI, SII et SIII. En revanche, cette augmentation n'est significative que pour 90% de lixiviat pour le sol SIV.

I.2. Tests sur *Vicia faba* et *Allium cepa*

Nous avons choisi de présenter les résultats des deux organismes végétaux *Vicia faba* et *Allium cepa* dans un même paragraphe car les tests ont toujours été réalisés en parallèle, exactement dans les mêmes conditions expérimentales.

I.2.1. Test des micronoyaux

La fréquence de micronoyaux dans les deux plantes exposées aux lixiviats des sols est déterminée cette fois dans les cellules des extrémités racinaires. Les micronoyaux observés en général dans les racines de *Vicia* ou d'*Allium* sont présentés dans la figure 20, mais il faut noter que nous avons relevé à plusieurs reprises la présence de micronoyaux atypiques (Figure 21).

Certains auteurs (Fiskesjö, 1985) ont également observé ces micronoyaux qui paraissent être expulsés de la cellule et ont qualifié ce phénomène de « cytomixis » : il semblerait que ces micronoyaux atypiques soient observés dans le cas particulier d'une exposition des racines à des métaux. En effet, nous les avons observés dans le cas de *Vicia* exposé au lixiviat du sol SI (sol pollué spécifiquement par des métaux), et d'autres auteurs les ont aussi remarqués dans les racines d'*Allium* exposées à du chrome (Liu et al., 1995), du magnésium (Liu et al., 1994b ; Liu et al., 1995) et du plomb (Liu et al., 1994c).



Figure 20 : Cellules racinaires de *Vicia faba* présentant un micronoyau

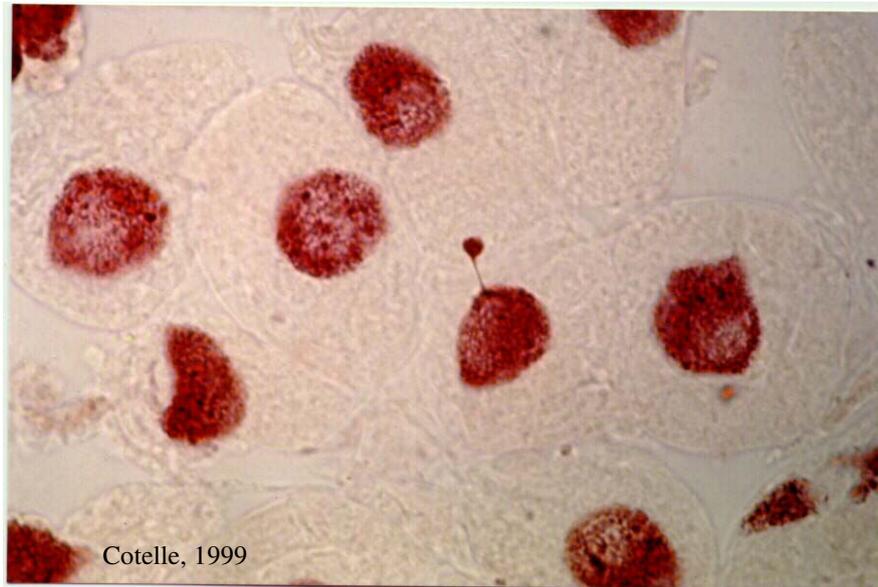


Figure 21 : Cellule racinaire de *Vicia faba* présentant un micronoyau atypique

I.2.1.1. Allure de la courbe concentration-réponse

La fréquence de micronoyaux dans les cellules des extrémités racinaires de *Vicia faba* et d'*Allium cepa* augmente avec la concentration de lixiviat puis diminue pour les plus fortes concentrations testées (Figure 22). Ce phénomène est beaucoup plus marqué et plus fréquemment observé pour *Vicia* et *Allium* que pour *Tradescantia*. La moyenne des valeurs obtenue pour les témoins (0,2) augmente d'un facteur proche de 13 pour la concentration de lixiviat qui induit le nombre maximal de micronoyaux pour 1000 cellules (3 %).

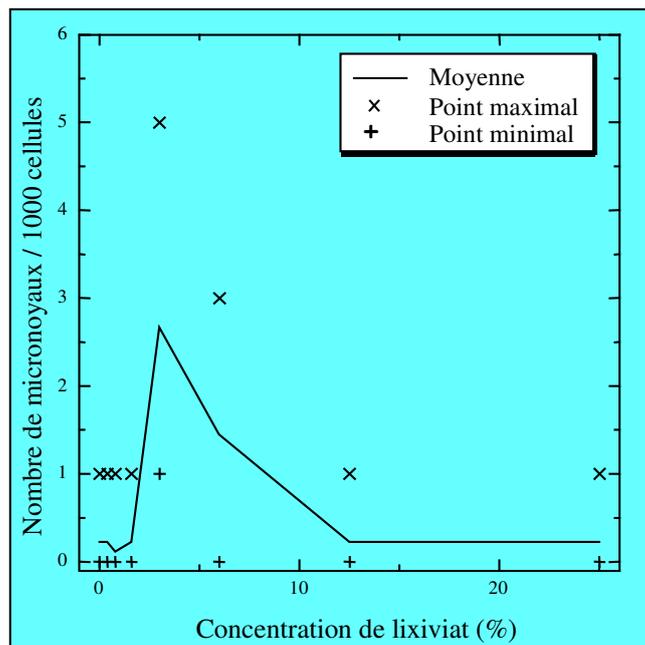


Figure 22 : Allure de la courbe concentration-réponse obtenue avec le test *Vicia*-micronoyaux. Cas du lixiviat du sol SIII

I.2.1.2. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols

Les tests *Vicia/Allium*-micronoyaux ont été appliqués au lixiviat de chacun des quatre sols dans deux séries d'expériences différentes (Tableaux XXIV et XXV). Les sols artificiellement contaminés (SI et SII) ont été fraîchement préparés pour chaque série d'expériences, alors que les sols pollués réels (SIII et SIV) ont été conservés à 4°C après leur prélèvement sur site. Par contre, tous les lixiviats ont été systématiquement préparés le jour même des tests.

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)									
	0,2	0,4	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 96)										+
SI (Mai 98)			+							
SII (Juil 96)							+			
SII (Juil 98)								+		
SIII (Dec 96)			+							
SIII (Mars 98)					+					
SIV (Fev 97)									+	
SIV (Nov 97)										+

Tableau XXIV: Résultats des tests *Vicia*-micronoyaux réalisés sur le lixiviat des sols contaminés lors de deux séries d'expériences différentes

	concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)
+	concentration d'effet maximal

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)									
	0,2	0,4	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 96)									+	
SI (Mai 98)					+					
SII (Juil 96)									+	
SII (Juil 98)									+	
SIII (Dec 96)						+				
SIII (Mars 98)						+				
SIV (Fev 97)									+	
SIV (Nov 97)										+

Tableau XXV: Résultats des tests *Allium*-micronoyaux réalisés sur le lixiviat des sols contaminés lors de deux séries d'expériences différentes

	concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)
+	concentration d'effet maximal

Nous observons tout d'abord une bonne reproductibilité dans le temps des résultats obtenus, à l'exception de la matrice SI pour laquelle les tests réalisés en 96 et en 98 révèlent des niveaux de génotoxicité très différents. Des effets génotoxiques statistiquement significatifs ont été mis en évidence dans les racines de *Vicia* pour des concentrations de lixiviat comprises entre 25 et 50% lors des premières expériences, et pour une concentration de 0,8% deux années plus tard. Concernant les cellules racinaires d'*Allium cepa*, un nombre significatif de micronoyaux a été observé pour 50 et 90% dans les premières expériences et pour 3% dans les secondes. Cette différence très nette, qui se retrouve dans les deux plantes, pourrait être expliquée soit par une plus grande sensibilité des organismes végétaux, soit par une différence de la génotoxicité du sol SI. En effet, l'origine des graines de fève et des bulbes d'oignon est la même pendant un an, mais d'année en année, des stocks différents de graines et de bulbes sont utilisés, ce qui pourrait expliquer une différence de sensibilité aux toxiques. Toutefois, le taux de micronoyaux spontanés (témoin négatif) et le taux de micronoyaux des deux organismes végétaux exposés à l'hydrazide maléique (témoin positif) ont été régulièrement vérifiés et se sont avérés relativement constants (Figures 23 et 24). Ceci exclut l'hypothèse d'une différence de sensibilité des organismes végétaux.

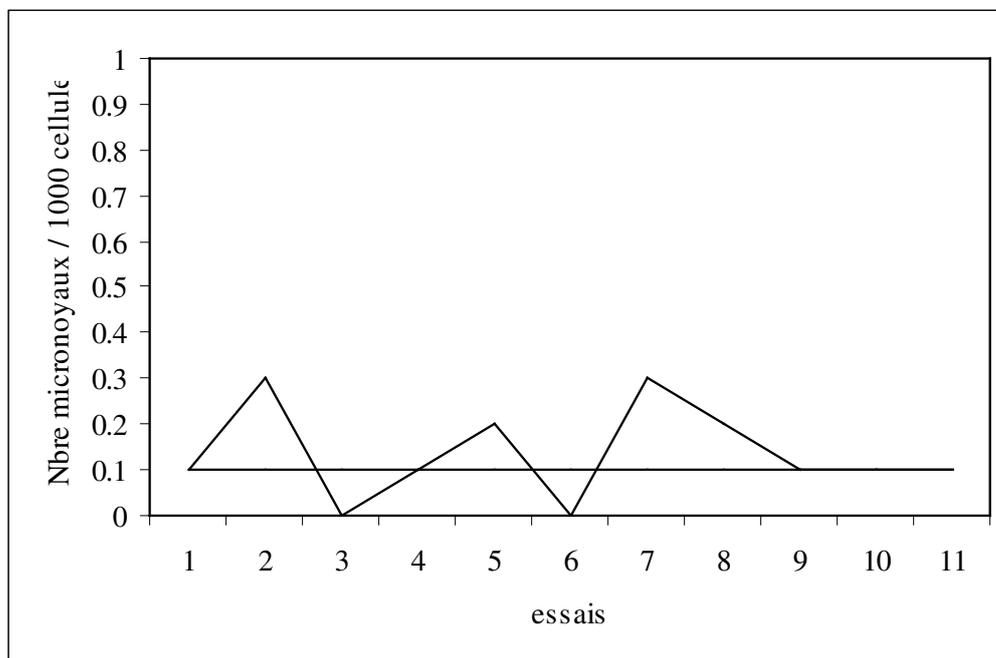


Figure 23 : Carte de contrôle du test *Allium*-micronoyaux avec le témoin négatif.

La droite représente la moyenne ($0,1 \pm 0,1$)

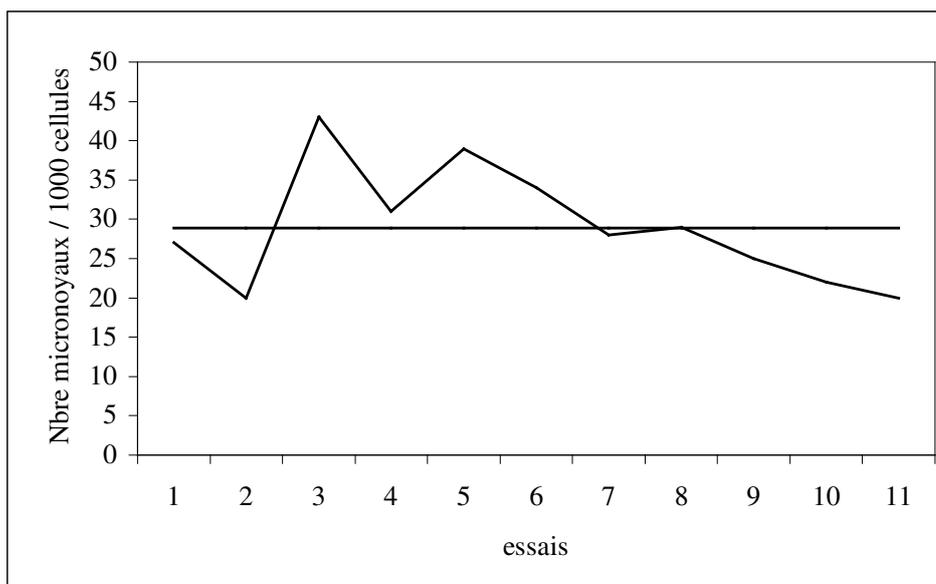


Figure 24 : Carte de contrôle du test *Allium*-micronoyaux avec une substance de référence : L'hydrazide maléique. La droite représente la moyenne ($28,9 \pm 7,5$)

La deuxième hypothèse concerne le manque de reproductibilité de la préparation du sol SI ou du lixiviat correspondant. Le sol SI a été, en effet, préparé par l'IRH à plusieurs reprises à partir de sol S0 lui-même prélevé à des temps différents⁴. Bien que les méthodes de préparation aient été identiques, il faut ajouter, pour être complet, que le lixiviat a été réalisé par l'IRH en Mai 96 et par nous-mêmes en mai 98. Il n'est donc pas impossible que des différences mineures de préparation des sols contaminés et des lixiviats engendrent une génotoxicité quelque peu différente d'une série d'expériences à l'autre. Très peu d'études ont porté sur la reproductibilité du processus de lixiviation, nous pouvons néanmoins citer celle de Ferrari et Féraud (1999) qui ont mis en évidence, à l'aide de tests sur algue et bactérie, une assez bonne reproductibilité entre des lixiviations effectuées sur des déchets solides, mais cette unique étude n'est pas suffisante pour en conclure quoi que ce soit dans notre cas.

Le lixiviat du sol SIII s'est révélé très génotoxique. En effet, de très faibles concentrations de lixiviat (0,4 et 0,8% pour les premières expériences et 3 et 6% pour les deuxièmes expériences) induisent des micronoyaux de façon significative dans les racines de *Vicia*. Il en est de même pour *Allium* : la LOEC est de 3% dans les deux séries d'expériences. Contrairement au sol SI, le sol SIII apparaît moins génotoxique en 1998 qu'en 1996, le stockage du sol SIII semble avoir eu une influence sur les résultats du test *Vicia* et pas d'influence notable sur ceux du test *Allium*.

⁴ A cet égard, d'autres expériences réalisées au laboratoire ont montré une phytotoxicité certaine du sol S0, et cela dès la fin 1997.

Peu de différences entre les deux séries d'expériences ont été constatées pour le sol SII. La plus faible concentration de lixiviat pour laquelle un effet significatif est observé (LOEC) est de 12% en 1996 et de 25% en 1998 dans les racines de *Vicia*. Pour ce qui est d'*Allium*, la LOEC est de 50% dans les deux cas. Le lixiviat du sol SII apparaît donc moyennement génotoxique pour les deux plantes testées.

Enfin, le nombre de micronoyaux dans les racines de *Vicia* exposées au lixiviat du sol SIV est significativement différent du témoin pour les concentrations les plus fortes : à partir de 50% pour les premières expériences et 90% pour les secondes, et ce, quelle que soit l'espèce végétale considérée. La génotoxicité de ce sol paraît avoir diminué légèrement avec le temps.

En définitive, le test des micronoyaux appliqué à *Vicia faba* et à *Allium cepa* permet de détecter efficacement le potentiel génotoxique des lixiviats des sols contaminés. Par ailleurs, si nous comparons la sensibilité des deux espèces, il apparaît que dans 5 cas sur 8, *Vicia* est plus sensible qu'*Allium* (facteur compris entre 2 et 8), alors que dans 3 cas sur 8 les deux espèces sont aussi sensibles. Ces constatations viennent confirmer les résultats de l'analyse bibliographique présentés dans les tableaux X et XI.

I.2.2. Test des comètes

Le mode d'exposition est le même que pour le test des micronoyaux, mais les noyaux sont ensuite isolés et subissent une lyse puis une électrophorèse. Les images ainsi formées ressemblent à des comètes dans le cas de dommages à l'ADN (Figure 25).

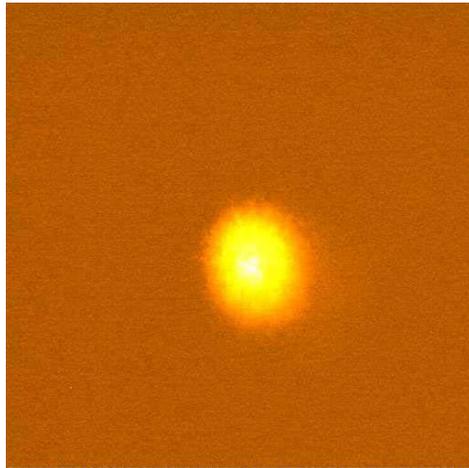


Figure 25a : ADN intact des noyaux de *Vicia faba* après lyse et électrophorèse en conditions alcalines



Figure 25b : ADN endommagé des noyaux de *Vicia faba* après lyse et électrophorèse en conditions alcalines

Avant toute chose, il convient de rappeler que l'un des principaux objectifs de cette étude était d'évaluer l'applicabilité du test des comètes aux organismes végétaux tels que *Vicia faba* et *Allium cepa*. Les résultats de ce test appliqué au lixiviat des quatre sols n'ayant pas été répétés faute de temps, nous considérons qu'ils confirment davantage la faisabilité du test des comètes dans le domaine végétal qu'ils n'évaluent le caractère génotoxique de ces matrices. Notons que seules trois publications relatives à l'application de ce test aux plantes supérieures sont publiées à ce jour (cf. analyse bibliographique § IV.4), il était donc intéressant d'étudier cet aspect.

I.2.2.1. Résultats des expériences préliminaires et discussion sur le protocole du test des comètes appliqué aux plantes

Nous allons maintenant revenir sur la mise au point de certaines étapes du test des comètes afin de les comparer aux publications déjà parues sur le sujet (Tableau XXVI).

a) viabilité des cellules

Dans le protocole défini par Singh et al. (1988), il est nécessaire d'évaluer la viabilité des cellules avant de réaliser le test des comètes. Dans notre cas, cette étape n'est pas respectée, nous nous sommes contentés de supposer qu'aux concentrations testées, les cellules étaient viables puisque l'indice mitotique (révélateur de l'efficacité de la division cellulaire et mesuré dans les mêmes conditions 30 heures après le début du traitement) n'était pas altéré (cf § I.2.4.2. dans ce chapitre). Cependant, c'est un point qu'il sera nécessaire de développer ultérieurement, surtout si nous choisissons d'isoler les cellules. Il est primordial de vérifier si le procédé d'isolement ne provoque pas de dommages au niveau cellulaire.

b) isolement des noyaux

La première grande différence avec le protocole défini par Singh et al. en 1988 réside dans le fait que ce sont les noyaux qui sont isolés, et non pas les cellules, comme c'est le cas lorsque le test des comètes est réalisé dans les domaines humain et animal.

	Koppen et Verschaeve, 1996	Navarrete <u>et al.</u> , 1997	Gichner et Plewa, 1998	étude présentée dans ce rapport
organe et plante utilisés	racines primaires de <i>Vicia faba</i>	racines d' <i>Allium cepa</i>	feuilles de <i>Nicotiana tabacum</i>	racines secondaires de <i>Vicia faba</i> et racines d' <i>Allium cepa</i>
isolement des noyaux	centrifugation en gradient de Percoll et congélation de la suspension nucléaire à -80°C	découpe des racines dans du tampon de Sørensen	découpe des feuilles dans du tampon de Sørensen	découpe des racines dans un tampon de PBS et Na ₂ EDTA et filtration de la suspension à 20 µm
préparation des lames	1ère couche : agarose NMP 1% grattée puis 300 µl d'agarose NMP 0,6% 2ème couche : 2 µl de suspension nucléaire + 100 µl d'agarose LMP 0,5% 3ème couche : 100 µl d'agarose LMP 0,5%	1ère couche : agarose 0,65% 2ème couche : 3 gouttes de suspension nucléaire + 120 µl d'agarose LMP 0,5% 3ème couche : 85 µl d'agarose LMP 0,5%	1ère couche : agarose NMP 1% 2ème couche : 30 µl de suspension nucléaire + 60 µl d'agarose LMP 0,75% 3ème couche : 90 µl d'agarose LMP 0,5%	1ère couche : 70 µl d'agarose LMP 0,5% 2ème couche : 70 µl de suspension nucléaire + 150 µl d'agarose LMP 0,8% (100 µl par lame) 3ème couche : 85 µl d'agarose LMP 0,5%
lyse	NaCl 2,5 M + Na ₂ EDTA 100 mM + Tris-HCl 10 mM + sodium lauroylsarcosine 1% + DMSO 10% + Triton X100 1% durée = 1 h	pas nécessaire	NaCl 2,5 M + sodium sarcosinate 1% + Na ₂ EDTA 100 mM + Tris 10 mM + DMSO 10% + Triton X100 1% durée = 1 h	NaCl 2,5 M + Na ₂ EDTA 100 mM + Tris 10 mM + DMSO 10% + Triton X100 1% durée = 24 h
Dénaturation	40 min	30 min	20 min	1 h
électrophorèse	NaOH 300 mM + Na ₂ EDTA 1 mM durée = 10 min	10 ou 20 min	NaOH 300 mM + Na ₂ EDTA 1 mM durée = 20 min	NaOH 300 mM + Na ₂ EDTA 1 mM durée = 25 min
neutralisation	Tris-HCl 0,4 M (pH = 7,5)	Tris-HCl 0,4 M (pH = 7,5)	Tris-HCl 0,4 M (pH = 7,5)	Tris-HCl 0,4 M (pH = 7,5)
Fixation	non	15 s dans le méthanol	non	1 min dans le méthanol
Révélation	100 µl de BET 20 µg/ml	BET 4 µg/ml	60 µl de BET 20 µg/ml	30 µl de BET 2 µg/ml

Tableau XXVI: Comparaison des protocoles publiés sur l'application du test des comètes aux plantes supérieures

Nous avons tout d'abord tenté de réaliser l'isolement des noyaux par la technique utilisée par Koppen et Verschaeve (1996), qui consiste à séparer les différents organites cellulaires par centrifugation en gradient de Percoll. Cette méthode est apparue très longue et délicate et a été ensuite délaissée au profit d'une technique beaucoup plus simple :

Les fragments racinaires sont précautionneusement découpés en très petits morceaux à l'aide d'une lame de rasoir afin de libérer les noyaux qui se concentrent ainsi dans un tampon composé de PBS et de Na₂EDTA. La suspension nucléaire ainsi obtenue est filtrée sur un filtre Nyltel[®] de 20 µm. Contrairement à Koppen (communication personnelle, VITO, Belgique), les racines ne sont pas préalablement congelées afin d'éviter la formation de dommages à l'ADN dûs à la congélation.

Cette méthode, malgré son aspect rudimentaire, permet d'obtenir des témoins négatifs en général satisfaisants. Cependant, cette étape mérite d'être sérieusement améliorée. Pour cette raison, nous avons envisagé, sur les conseils d'Alain Devaux, laboratoire LSE-ENTPE INRA, Vaulx-en-Velin, d'isoler les cellules (et non pas les noyaux) en immergeant des fragments de racines dans une solution d'enzymes ayant comme substrats les constituants de la paroi pecto-cellulosique des cellules. Les essais ont été réalisés avec la cellulase (à des concentrations comprises entre 0,1 et 0,2%) et la pectinase (de 0,2 à 0,4%) en s'inspirant des protocoles permettant l'obtention de protoplastes. Ce procédé n'a malheureusement pas donné de résultats probants dans la mesure où nous avons réussi à isoler des cellules dans seulement une expérience sur quatre et seulement avec *Vicia*. Toutefois, cette technique mérite d'être approfondie car elle présente l'avantage de ne pas altérer l'ADN.

c) Préparation des lames

Nous avons testé différents types de lames de microscope qui servent de support aux gels d'agarose contenant les noyaux : les lames à revêtement Superfrost (qui ont l'avantage d'être parfaitement nettoyées et dégraissées) ainsi que les lames dépolies sur une face (Touzart & Matignon, réf. 032.999.99). Ces deux modèles de lames permettent une bonne adhérence des gels d'agarose, même pour les lames non dépolies, à condition dans ce cas de déposer la première couche d'agarose et de l'étaler sur toute la lame à l'aide d'un cône de micropipette (et non avec une lamelle) au moins une semaine auparavant. De cette façon, la première couche d'agarose LMP est bien sèche et un stock de lames est constamment prêt à être utilisé pour les tests. Cette technique

nous a été proposée par Koppen et s'est avérée très efficace pour éviter les problèmes de décollement des gels d'agarose que rencontrent de nombreux auteurs.

D'autre part, les lames dépolies présentent l'inconvénient d'apporter un bruit de fond important lors de l'analyse des lames. Notre choix s'est donc porté sur les lames à revêtement Superfrost qui sont par ailleurs beaucoup moins coûteuses, ce qui représente un avantage considérable étant donné que les lames ne peuvent pas être réutilisées pour d'autres tests.

La deuxième couche d'agarose contient les noyaux : des expériences préliminaires nous ont conduit à fixer le volume de suspension nucléaire à 70 μ l et le volume d'agarose LMP 0,8% à 150 μ l afin d'obtenir un nombre adéquat de noyaux par lame. En effet, nous analysons un minimum de 25 noyaux par lame, mais un nombre trop élevé de noyaux nuit à l'analyse (les images doivent être bien distinctes les unes des autres pour pouvoir être analysées par l'analyseur d'images). Notre protocole n'inclut pas de comptage de noyaux, puisqu'à chaque fois, nous avons constaté que le nombre de noyaux était adéquat, malgré toutes les étapes qui auraient pu influencer sur ce nombre, à savoir la taille des racines, leur découpe, la filtration des noyaux, etc... Pour ce qui est du volume d'agarose, des essais préliminaires nous ont montré que si le celui-ci était supérieur à 100 μ l, les noyaux se trouvaient à des niveaux très différents dans le gel, ce qui pouvait nuire à la netteté de l'analyse d'images.

Par ailleurs, la concentration d'agarose est très importante car le gel étant constitué d'un réseau de mailles resserrées où migrent les molécules d'ADN, sa concentration a un impact considérable sur leur migration. Il s'agit donc de trouver le meilleur compromis pour obtenir à la fois une bonne migration et une stabilité satisfaisante de l'ADN dans le gel. Des concentrations comprises entre 0,5 et 1% ont été testées et les résultats les plus concluants ont été obtenus avec une concentration de 0,8%.

Enfin, une troisième couche d'agarose est apparue nécessaire pour diminuer les différences de migration entre les noyaux sur une même lame. Contrairement à la seconde couche, le volume et la concentration d'agarose sont beaucoup moins importants. N'ayant pas observé de différences entre les essais réalisés avec des concentrations d'agarose LMP comprises entre 0,5 et 1%, nous avons opté pour une concentration de 0,5%. Un volume de 85 μ l est apparu satisfaisant.

d) lyse

La nécessité de l'étape de lyse a été remise en cause par Navarrete et al. (1997), dans le cas des plantes car ce sont les noyaux qui sont isolés et non pas les cellules comme c'est le cas dans les domaines animal et humain. Par conséquent, la lyse n'apparaît pas nécessaire dans ce cas puisque les membranes nucléaires peuvent être détruites dans l'étape de dénaturation de l'ADN. Cette idée a ensuite été confirmée par Gichner et Plewa (1998) à l'aide de feuilles de tabac exposé à de l'éthyl méthanesulfonate. Ayant effectué nos expérimentations avant que la publication de Gichner et Plewa (1998) ne soit publiée, nous avons choisi de respecter cette étape, d'autant plus que les protéines nucléaires doivent être éliminées déjà lors de cette étape pour que l'ADN puisse migrer librement.

e) électrophorèse

L'électrophorèse est une étape critique puisque des paramètres comme la durée, le voltage, l'ampérage ou le pH contribuent directement à la qualité de la migration de l'ADN.

Lorsque la lyse est achevée, les lames sont rincées dans la solution d'électrophorèse. Cette étape s'est avérée primordiale afin d'éliminer les sels et les détergents qui pourraient empêcher la migration de l'ADN pendant l'électrophorèse (comme le NaCl) ou interférer avec le BET.

Les lames sont ensuite immergées dans la solution d'électrophorèse pendant 1 heure afin de permettre la dénaturation et le déroulement de l'ADN. Cette étape importante doit être réalisée en conditions alcalines (grâce à la présence de NaOH) afin de permettre non seulement la mise en évidence des coupures double brin mais également des coupures simple brin et l'expression des sites "alcali-labiles".

L'ADN subit alors une électrophorèse en conditions alcalines. Nous avons testé différentes durées d'électrophorèse entre 5 et 40 minutes, mais 25 minutes sont apparues suffisantes pour obtenir une migration satisfaisante de l'ADN des racines exposées à une substance de référence, à savoir l'hydrazide maléique à 10^{-4} M (l'application du test des comètes réalisé sur *Vicia* et *Allium* à cette substance de référence a été étudiée par Wohmann, 1997).

Enfin, des différences de migration de l'ADN ont été observées entre les lames d'un même lot expérimental. Afin de diminuer ces différences peut-être dues à l'hétérogénéité du champ électrique dans la cuve, des essais préliminaires ont été consacrés à la nécessité ou non d'utiliser une pompe péristaltique dans le but de faire circuler la solution d'électrophorèse. Il est apparu que les différences de migration de l'ADN subsistaient, même avec ce procédé que nous avons par la suite abandonné. Toutefois, il est important de préparer deux, voire trois lames par concentration et de les placer de manière aléatoire dans les cuves d'électrophorèse de façon à tenir compte de l'hétérogénéité de la migration de l'ADN entre les lames. D'autre part, il faut noter que l'analyse des images formées ne doit pas être réalisée au bord des lames, car il semble qu'un « effet de bord » se produise : il se traduit par un nombre plus important de comètes à cet endroit qui ne serait pas forcément dû à des dommages de l'ADN.

f) révélation de l'ADN

Les lames subissent ensuite une neutralisation, des rinçages et une fixation dans du méthanol. Cette dernière étape de fixation n'est pas décrite dans le protocole de Singh et al. (1988), mais dans ceux de Koppen et Verschaeve (communication personnelle) et de Navarrete et al. (1997). Elle s'est avérée indispensable car, dans le cas contraire, les images de comètes disparaissaient très rapidement. Toutefois, cette étape de fixation nous a permis de conserver les lames pendant quelques heures seulement, mais en aucun cas plus d'une journée. Différentes concentrations comprises entre 2 et 20 µg/ml de la solution de bromure d'éthidium (BET) ont été évaluées : il est apparu que l'ADN de *Vicia* et d'*Allium* se colorait très efficacement avec un très faible volume (30 µl) de la concentration la plus basse en BET testée. Nous avons également constaté lors de chaque expérience que le phénomène de « fading » (= perte de coloration) décrit par de nombreux auteurs était quasi inexistant (ce qui est apparu très surprenant) et que par ailleurs il était impossible de relire les lames même après un nouvel ajout de BET.

I.2.2.2. Sélection des paramètres

Après le traitement des racines de *Vicia* et d'*Allium* au lixiviat des sols contaminés, les noyaux sont analysés par un système d'analyse d'images. Un certain nombre de paramètres qui sont révélateurs des dommages à l'ADN peuvent alors être calculés à l'aide du logiciel KOMET 3.1 de Kinetic Imaging. Le choix des paramètres dépend du type cellulaire et doit donc être choisi selon le type de comètes obtenu (Devaux, communication personnelle). Nous en avons sélectionné deux : la distance de migration (« tail length ») et le moment défini par Olive (« Olive tail moment »).

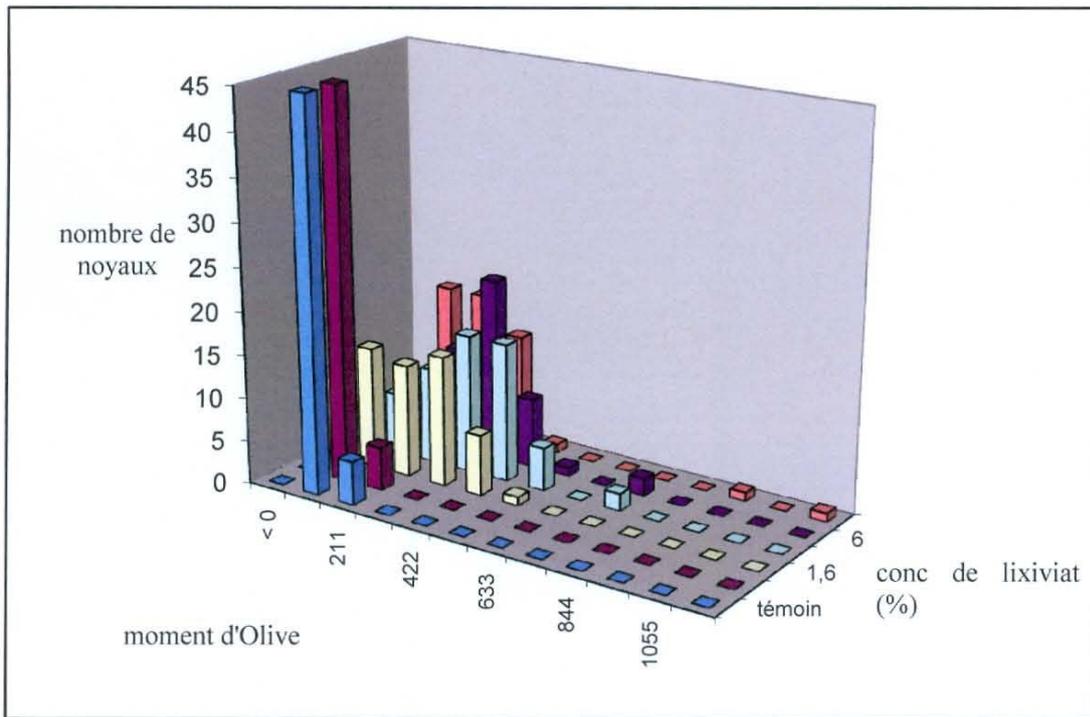


Figure 26a : Exemple de résultats obtenus avec le paramètre "moment d'Olive"
Cas de *Vicia* exposé au lixiviat du sol SIII

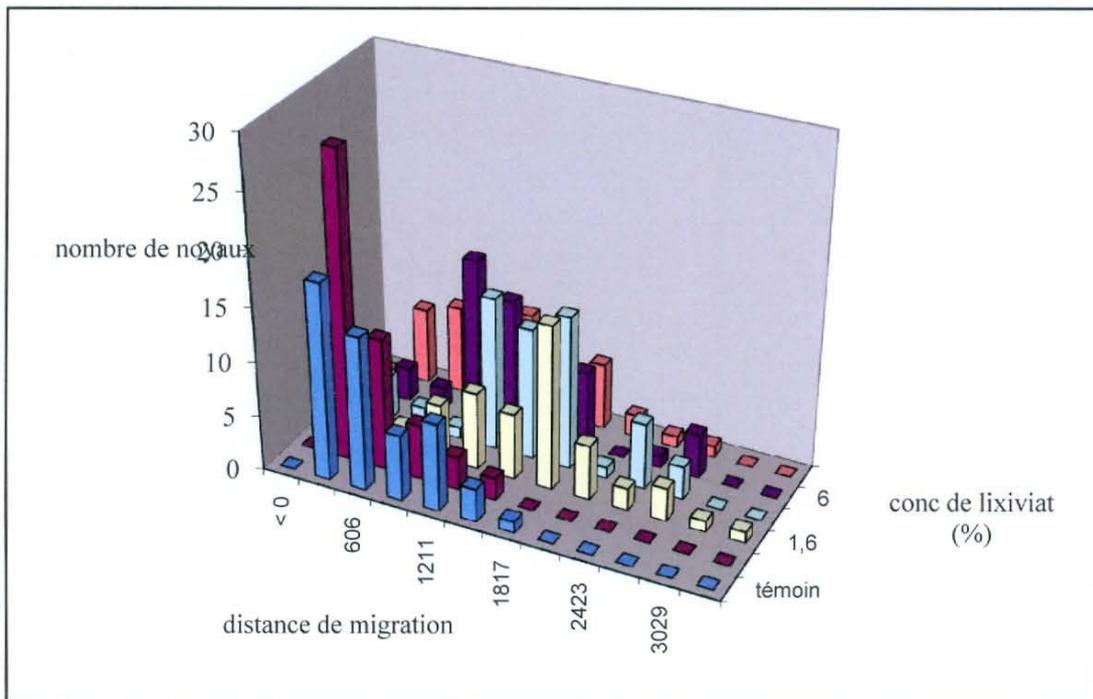


Figure 26a : Exemple de résultats obtenus avec le paramètre "distance de migration"
Cas de *Vicia* exposé au lixiviat du sol SIII

La figure 26 représente un exemple des résultats qui peuvent être obtenus avec chacun de ces deux paramètres dans le cas de l'exposition de *Vicia* au lixiviat du sol SIII. Notons que cet exemple est assez représentatif des résultats obtenus avec les trois autres sols et avec les deux espèces végétales. Nous pouvons constater que le moment défini par Olive permet d'obtenir une distribution des témoins très proche de l'origine et unimodale (par rapport à la distance de migration) et des valeurs relativement importantes pour les différentes concentrations du lixiviat. Nous retiendrons donc ce paramètre pour présenter les résultats du test des comètes appliqué aux quatre sols.

I.2.2.3. Allure de la courbe concentration-réponse

Le moment de la queue des comètes formées par l'ADN de *Vicia faba* et d'*Allium cepa* augmente avec la concentration de lixiviat. La moyenne des valeurs obtenue pour les témoins augmente d'un facteur proche de 5 et 11 respectivement pour *Vicia* et *Allium* aux concentrations d'effet maximal.

La variabilité des valeurs des témoins est importante (ce qu'avait déjà noté Gichner et Plewa (1998) dans les cellules de feuilles de tabac) : par exemple pour *Vicia* la moyenne est de 53 avec des valeurs minimale et maximale respectivement égales à 2 et 203, mais nous avons pu vérifier qu'elles suivaient une loi de distribution normale.

I.2.2.4. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols

De la même façon que pour le test des micronoyaux, nous avons choisi de présenter les résultats des deux organismes végétaux *Vicia faba* et *Allium cepa* dans un même paragraphe car les tests ont toujours été réalisés en parallèle, exactement dans les mêmes conditions expérimentales. Des expériences préliminaires nous ont permis de définir le domaine de concentrations choisi pour chaque sol et pour chaque espèce. Notons que les tests des comètes ont été réalisés sur les deuxièmes échantillons des sols (reçus en 1998).

Les tableaux XXVII et XXVIII présentent les résultats du test des comètes appliqué aux racines de *Vicia* et d'*Allium* exposées au lixiviat des sols contaminés. Toutefois, les figures 27a,b et 28b, c et d permettent d'observer que, dans les cas où le traitement statistique n'a pas mis en évidence de différences entre les lots expérimentaux (cf. sols SI et SII pour *Vicia* et SII, SIII et SIV pour *Allium*), nous observons tout de même un effet génotoxique puisque les histogrammes sont décalés vers la droite pour les plus fortes concentrations de lixiviat testées. Le manque de puissance

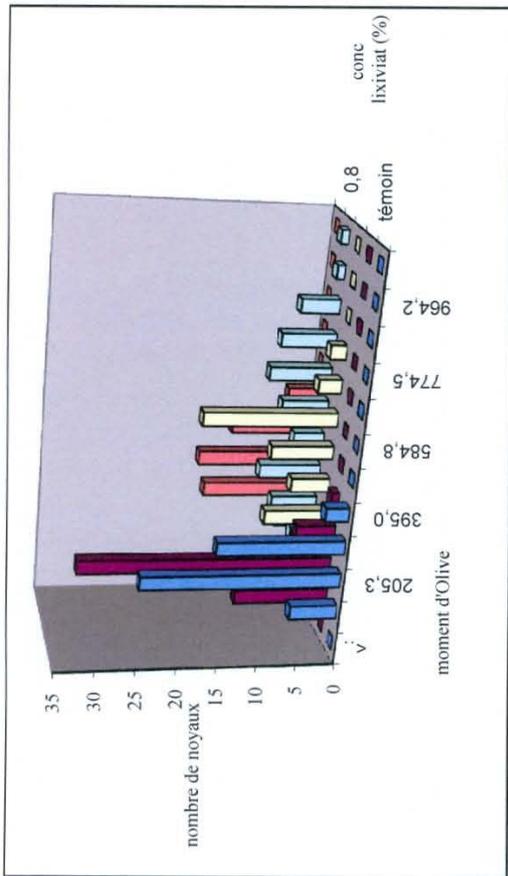


Figure 27a : Distribution des valeurs obtenues avec le test des comètes appliqué à *Vicia* dans le cas du lixiviat du sol S1

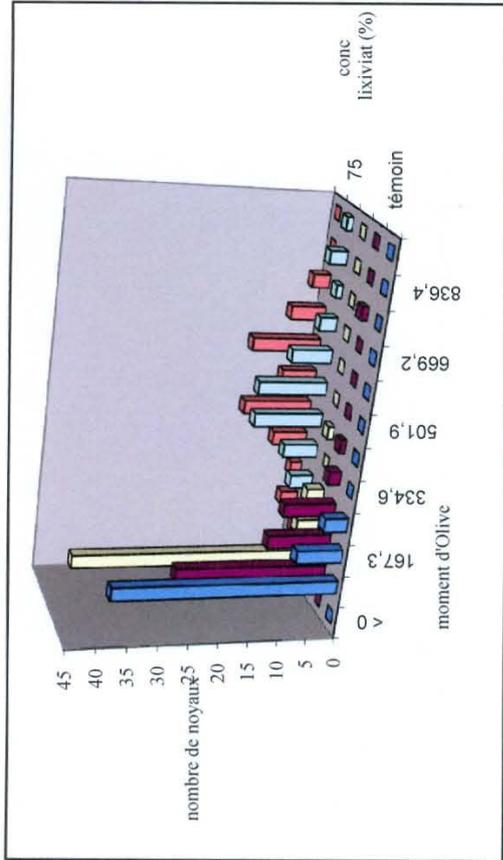


Figure 27b : Distribution des valeurs obtenues avec le test des comètes appliqué à *Vicia* dans le cas du lixiviat du sol SII

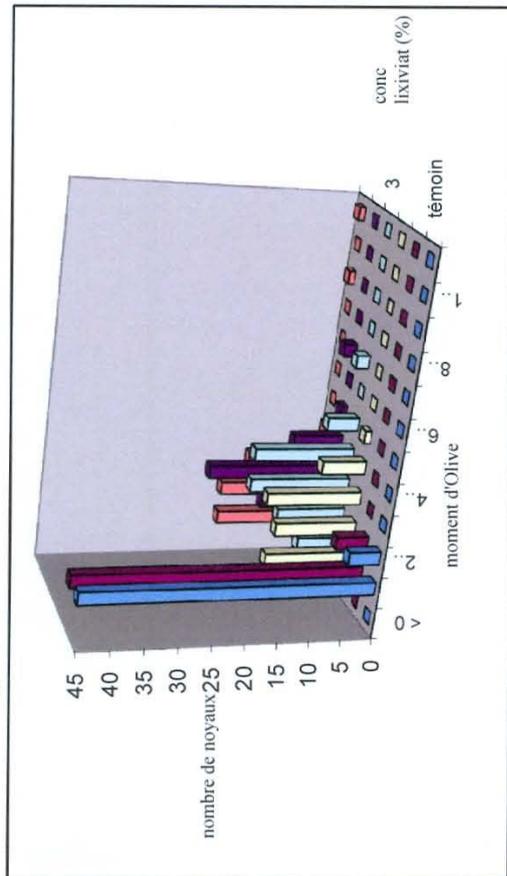


Figure 27c : Distribution des valeurs obtenues avec le test des comètes appliqué à *Vicia* dans le cas du lixiviat du sol SIII

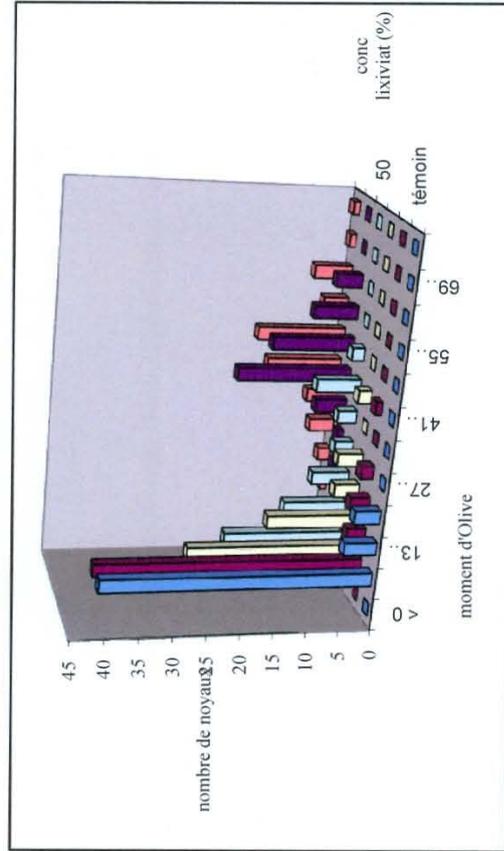


Figure 27d : Distribution des valeurs obtenues avec le test des comètes appliqué à *Vicia* dans le cas du lixiviat du sol SIV

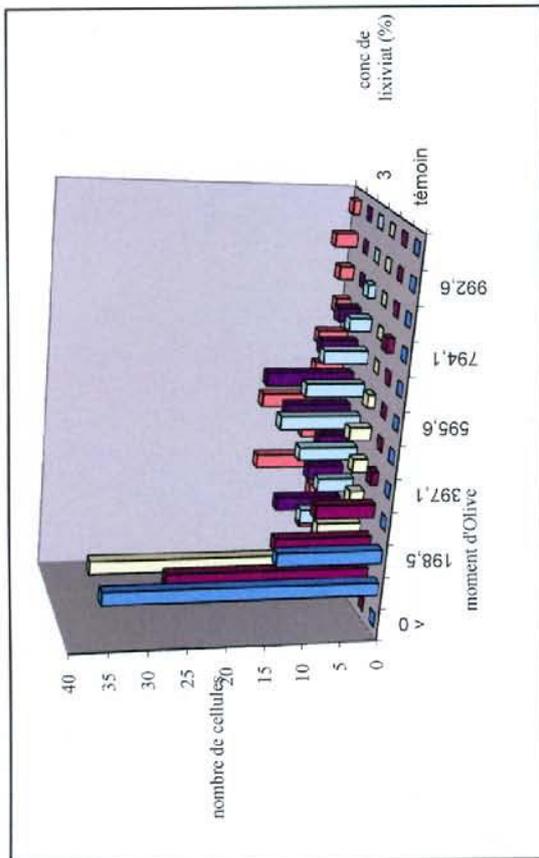


Figure 28a : Distribution des valeurs obtenues avec le test des comètes appliqué à *Allium* dans le cas du lixiviat du sol SI

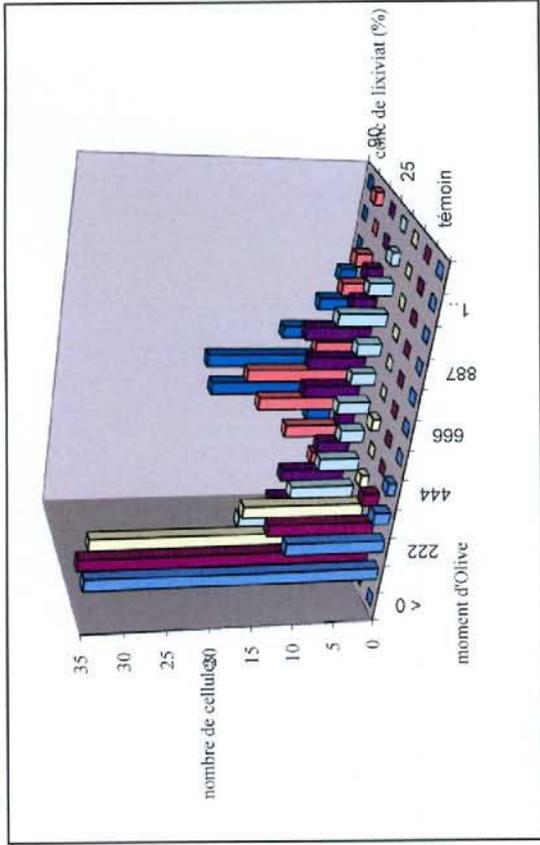


Figure 28b : Distribution des valeurs obtenues avec le test des comètes appliqué à *Allium* dans le cas du lixiviat du sol SII

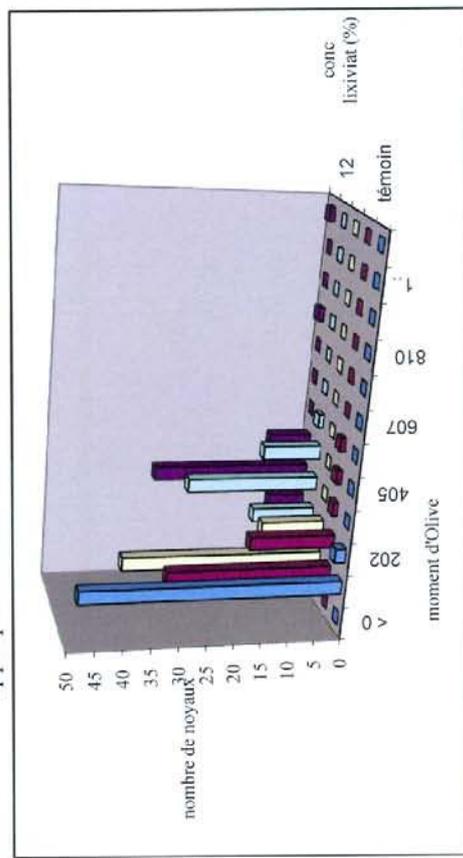


Figure 28c : Distribution des valeurs obtenues avec le test des comètes appliqué à *Allium* dans le cas du lixiviat du sol SIII

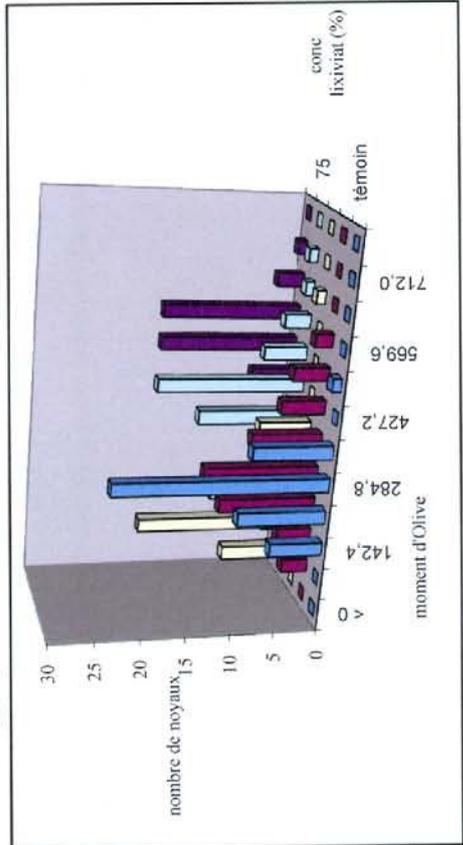


Figure 28d : Distribution des valeurs obtenues avec le test des comètes appliqué à *Allium* dans le cas du lixiviat du sol SIV

des tests statistiques qui ne mettent pas en évidence les effets visibles sur les histogrammes est certainement due à la grande dispersion des résultats.

	Concentration de lixiviat (%)									
lixiviat des sols	0,4	0,8	1,6	3	6	12	25	50	75	90
SI										
SII										
SIII				+						
SIV										+

Tableau XXVII: Résultats des tests des comètes appliqués à *Vicia* et réalisés sur le lixiviat des sols contaminés

concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)

+ concentration d'effet maximal

	Concentration de lixiviat (%)									
lixiviat des sols	0,4	0,8	1,6	3	6	12	25	50	75	90
SI						+				
SII										
SIII										
SIV										

Tableau XXVIII: Résultats des tests des comètes appliqués à *Allium* et réalisés sur le lixiviat des sols contaminés

concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)

+ concentration d'effet maximal

Si nous ne tenons compte que des résultats des tests statistiques, seul le lixiviat du sol SII n'est génotoxique pour aucune des deux plantes. Cependant, là aussi, les figures 27b et 28b mettent en évidence un effet génotoxique pour les concentrations de lixiviat les plus fortes, et ce, pour les deux espèces.

Allium révèle un effet entre 3 et 12% de lixiviat du sol SI. Quant à la non significativité des résultats obtenus avec *Vicia*, elle est vraisemblablement due à la distribution des valeurs du témoin qui est plus large que celle observée dans le cas des sols SIII et SIV (Figure 27a). *Vicia* détecte significativement une génotoxicité du lixiviat des sols SIII (aux concentrations comprises entre 1,6 et 12%) et SIV (entre 50 et 90%), alors qu'*Allium* ne la détecte pas. Il semble pourtant en observant les graphes relatifs à cette dernière plante qu'il y ait un léger effet génotoxique pour les concentrations de lixiviat les plus élevées, mais le témoin négatif n'est pas satisfaisant dans le cas de SIV.

En tout état de cause, l'utilisation simultanée de *Vicia* et d'*Allium* semble nécessaire dans ce cas afin d'éviter les "faux négatifs" et il faut noter que, même si nous avons obtenu des résultats intéressants dans la mesure où nous confirmons l'applicabilité du test des comètes à *Vicia* et à *Allium* qui avait été démontrée respectivement par Koppen et Verschaeve (1996) et Navarrete et al. (1997), le protocole et l'exploitation des données nécessitent d'être encore améliorés.

I.2.3. Détermination de l'élongation (ou croissance) racinaire

Ce critère de toxicité a été évalué au cours des mêmes expériences que le test des micronoyaux et sur les deux espèces végétales de façon simultanée. Il correspond simplement à la différence entre la taille des racines après le traitement et la taille des racines avant traitement.

I.2.3.1. Allure de la courbe concentration-réponse

L'élongation racinaire de *Vicia faba* et d'*Allium cepa* diminue de façon quasi monotone avec la concentration de lixiviat (Figure 29).

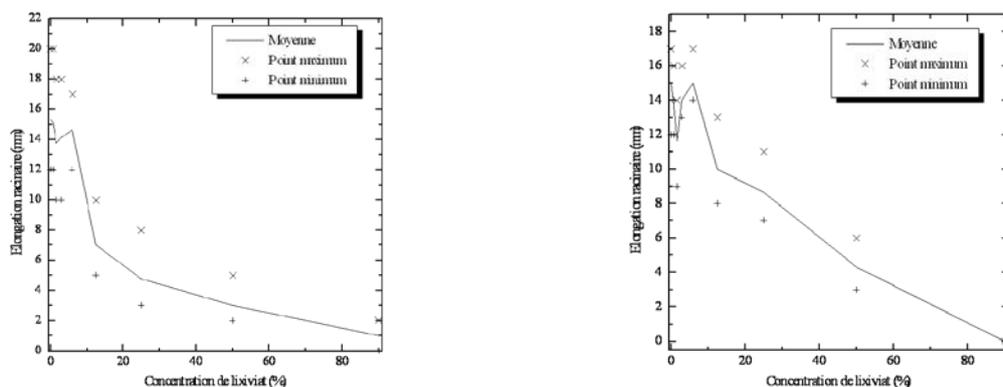


Figure 29 : Allure de la courbe concentration-réponse obtenue avec l'élongation racinaire chez *Vicia* (à gauche) et *Allium* (à droite). Cas du lixiviat du sol SI.

I.2.3.2. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols

Les tests d'élongation racinaire ont été réalisés sur les lixiviats des sols contaminés dans deux séries d'expériences différentes (Tableaux XXIX et XXX). Les sols artificiellement contaminés (SI et SII) ont été fraîchement préparés pour chaque série d'expériences, alors que les sols pollués réels (SIII et SIV) ont été conservés à 4°C après leur prélèvement sur site.

Lorsque *Vicia faba* est exposé au lixiviat du sol SI, la croissance des racines est significativement inférieure à celle du témoin pour les concentrations de 50 et 90% lors des premiers tests, et à partir de 12% lorsque le test est répété 2 ans plus tard. Dans le cas d'*Allium*, aucune différence significative de l'élongation racinaire n'est mise en évidence par le traitement statistique des données du premier test. En revanche, lors de la deuxième série d'expériences, une diminution significative de la croissance des racines est également observée à partir de 12% de lixiviat. La toxicité du lixiviat du sol SI est apparue plus forte lors des essais réalisés en 1998 qu'en 1996, ce qui confirme les résultats de génotoxicité obtenus précédemment avec ces mêmes plantes.

En ce qui concerne le sol SII, la croissance des racines de *Vicia faba* est significativement inférieure à celle du témoin dans les cas des concentrations 50 et 90% de lixiviat, et ce, dans les deux expérimentations différentes. Le même effet est observé pour *Allium* lors du premier test : les concentrations 50 et 90% de lixiviat entraînent une diminution significative de l'élongation racinaire. Dans le second test, un effet toxique n'est apparu que pour 90% de lixiviat. Les résultats du sol SII sont relativement reproductibles dans le temps et entre les deux espèces.

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)									
	0,2	0,4	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 96)										
SI (Mai 98)										
SII (Juil 96)										
SII (Juil 98)										
SIII (Dec 96)										
SIII (Mars 98)										
SIV (Fev 97)										
SIV (Nov 97)										

Tableau XXIX : Résultats de l'élongation racinaire de *Vicia*

 concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin (p<0,05)

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)									
	0,2	0,4	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 96)										
SI (Mai 98)										
SII (Juil 96)										
SII (Juil 98)										
SIII (Dec 96)										
SIII (Mars 98)										
SIV (Fev 97)										(1)
SIV (Nov 97)										

Tableau XXX : Résultats de l'élongation racinaire d'*Allium*

 concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)

(1) : augmentation significative

Dès la concentration de 6% de lixiviat du sol SIII, une diminution significative de l'élongation racinaire de *Vicia faba* est observée par rapport au témoin. Lorsque le test est répété ultérieurement, la toxicité a tendance à être moindre car c'est seulement à partir de 50% de lixiviat que nous avons observé un effet au niveau des racines. Le même schéma est retrouvé dans le cas d'*Allium cepa*, car la LOEC était de 3% lors des premières expériences et de 50% lors des secondes.

Enfin, aucune diminution significative de la croissance des racines de *Vicia* et d'*Allium* n'a été observée lorsque celles-ci sont exposées aux lixiviats du sol SIV, et ce, quelles que soient les expériences. Par ailleurs, nous avons constaté une légère augmentation pour les plus fortes concentrations pour les deux espèces végétales, qui est même significative dans le cas d'*Allium*.

I.2.4. Détermination de l'indice mitotique

Cet autre critère de toxicité, qui correspond à la proportion de cellules en cours de division, révèle si la mitose se déroule normalement ou non. Il a également été évalué au cours des mêmes expériences et sur les mêmes étalements cellulaires que le test des micronoyaux et sur les deux espèces végétales de façon simultanée.

I.2.4.1. Allure de la courbe concentration-réponse

L'indice mitotique de *Vicia faba* et d'*Allium cepa* diminue souvent brusquement avec la concentration de lixiviat (Figure 30).

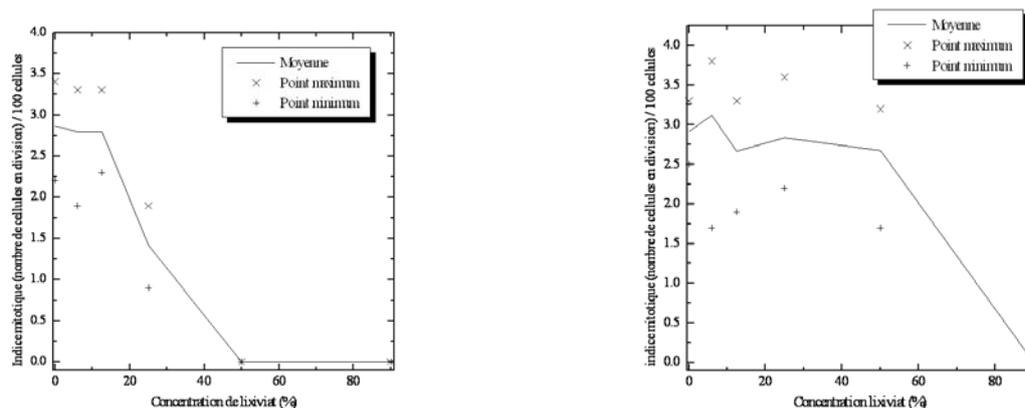


Figure 30 : Allure de la courbe concentration-réponse obtenue avec l'indice mitotique chez *Vicia* (à gauche) et *Allium* (à droite). Cas du lixiviat du sol SI.

I.2.4.2. Résultats obtenus avec les lixiviats de sols

L'indice mitotique a été déterminé dans les racines de *Vicia* et d'*Allium* exposées aux lixiviats des sols contaminés dans deux séries d'expériences différentes (Tableaux XXXI et XXXII). Les sols artificiellement contaminés (SI et SII) ont été fraîchement préparés pour chaque série d'expériences, alors que les sols pollués réels (SIII et SIV) ont été conservés à 4°C après leur prélèvement sur site.

Le lixiviat du sol SI présente une cytotoxicité pour *Vicia faba* puisque l'indice mitotique est significativement diminué à partir de 90% et 25% respectivement pour les deux séries d'expériences, ce qui montre une fois de plus la plus forte toxicité de ce sol lors de la seconde série. Ceci est encore mis en évidence à l'aide d'*Allium*, car aucun effet significatif de l'indice mitotique n'est constaté en 1996, alors qu'un effet toxique apparaît deux ans après.

Pour ce qui est du sol SII, aucune différence significative de l'indice mitotique n'est observée dans les cellules racinaires de *Vicia*, contrairement à *Allium* lors de la première série d'expériences.

Il en est de même pour le lixiviat du sol SIII qui n'induit de diminution significative de l'indice mitotique que dans le cas d'*Allium* et lors des premières expérimentations. Sa toxicité a donc tendance à diminuer avec le temps.

Enfin, aucun effet significatif n'est à noter pour ce qui est de l'indice mitotique des racines exposées au lixiviat du sol SIV.

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)									
	0,2	0,4	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 96)										
SI (Mai 98)										
SII (Juil 96)										
SII (Juil 98)										
SIII (Dec 96)										
SIII (Mars 98)										
SIV (Fev 97)										
SIV (Nov 97)										

Tableau XXXI : Résultats de l'indice mitotique de *Vicia*

 concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)									
	0,2	0,4	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 96)										
SI (Mai 98)										
SII (Juil 96)										
SII (Juil 98)										
SIII (Dec 96)										
SIII (Mars 98)										
SIV (Fev 97)										
SIV (Nov 97)										

Tableau XXXII : Résultats de l'indice mitotique d'*Allium*

 concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)

I.3. Comparaison des différents critères utilisés

La comparaison est délicate du fait de l'hétérogénéité des protocoles opératoires, des interprétations statistiques, et de la difficulté à réaliser tous les essais en même temps. Pour autant, nous pouvons déjà **comparer les tests *Tradescantia* mutations (Trad-SH) et micronoyaux (Trad-MCN)** : nous constatons dans le tableau XXXIII que le test Trad-MCN est toujours au moins aussi sensible que le test Trad-SH (bien que le test statistique utilisé pour ce dernier soit considéré comme plus puissant). Ceci est en accord avec d'autres études qui ont montré que le test Trad-MCN était 36 fois plus sensible au 1,2-dibromoéthane que le test Trad-SH, ce qui serait dû au fait que de nombreux sites dans les 12 chromosomes sont sujets à des dommages de l'ADN qui peuvent conduire à des micronoyaux. Par contre, seulement un locus dans un chromosome pourrait porter la mutation et induire un changement de couleur des poils staminaux (Ma et al., 1978)

lixiviat des sols	Trad-SH	Trad-MCN
SI	90	25
SII	NG	25
SIII	50	25
SIV	90	90

Tableau XXXIII : LOEC (en %) des tests sur *Tradescantia* appliqués au lixiviat des quatre sols. NG = non génotoxique aux concentrations testées

En ce qui concerne **la comparaison des tests des micronoyaux appliqués à *Tradescantia*, *Vicia* (*Vicia*-MCN) et *Allium* (*Allium*-MCN)**, il faut signaler qu'il y a deux séries d'expériences pour ces deux dernières plantes, qui ne donnent pas toujours les mêmes résultats (cf. § I.2.1.2.). Nous ne prendrons en compte que les données de la deuxième série d'expériences avec *Vicia* et *Allium* obtenues à peu près à la même époque que les résultats sur *Tradescantia*. Le tableau XXXIV présente les différentes LOEC obtenues.

lixiviat des sols	Trad-MCN	Vicia-MCN	Allium-MCN
SI	25	0,8	3
SII	25	25	50
SIII	25	3	3
SIV	90	90	90

Tableau XXXIV : LOEC (en %) des différents tests appliqués au lixiviat des quatre sols

Le test Vicia-MCN apparaît comme le plus sensible des trois tests. Ces résultats sont en désaccord avec ceux de Steinkellner et al. (1998) qui avaient trouvé que le test Trad-MCN était le plus sensible des trois à des solutions de métaux et des sols contaminés. Cependant les auteurs avaient sélectionné une autre variété de *Vicia faba* (minor) avec des racines beaucoup plus petites. D'autres études ont fait apparaître une sensibilité plus forte dans le cas du test Vicia-MCN comparé au test Trad-MCN. C'est ainsi que De Marco et al (1988) et Radetski (1996) ont déterminé respectivement des LOEC de 400 et 500 μM pour le chlorure de cadmium dans le cas de *Vicia* alors que Steinkellner et al (1998) trouvent une LOEC de 11 mM pour *Tradescantia*. Ce simple fait pourrait donc expliquer les données relatives au sol SI et à un moindre degré au sol SIII (où la présence de cadmium a été détectée).

La comparaison des LOEC du test des comètes et du test des micronoyaux réalisés à la fois sur *Vicia* et *Allium* à partir des mêmes matrices est synthétisée dans les tableaux XXXV et XXXVI.

Dans les trois cas où l'analyse statistique des données relatives au test des comètes a mis en évidence des différences entre les lots expérimentaux, le test des comètes apparaît dans deux cas plus sensible et dans un cas aussi sensible. Si nous considérons les résultats présentés dans la littérature, il apparaît que les deux critères sont souvent corrélés. C'est ainsi que deux agents mutagènes directs, le méthyl méthanesulfonate et la N-nitroso-N-méthylurée sont caractérisés par la même sensibilité dans les lymphocytes de souris (Vrzoc et Petras, 1997). Par contre, les mêmes auteurs ont trouvé que le test des micronoyaux était plus sensible que le test des comètes pour détecter des agents mutagènes indirects tels que la cyclophosphamide, le 9,10-diméthyl-1,2-benzanthracène et la mitomycine C. Mais par ailleurs, l'éthyl méthanesulfonate est positif avec le test des comètes appliqué à des érythrocytes de truite fario, alors qu'il est négatif dans le test des micronoyaux (Belpaeme et al., 1996a). Enfin, le test des comètes ne nécessite pas de division cellulaire, ce qui explique en partie la plus grande rapidité de ce test puisqu'il n'est pas nécessaire

d'attendre que le cycle cellulaire soit fini pour observer les résultats (Belpaeme *et al.*, 1996a). En l'état actuel des connaissances et compte tenu de nos résultats, il est encore trop tôt pour conclure quant à la qualité de la corrélation entre les deux tests.

Les mécanismes impliqués dans la formation des comètes ne sont pas encore complètement élucidés. Il existe différentes théories : l'ADN qui est observé dans la queue des comètes est constitué soit de fragments simple et double brin bien séparés du noyau (Singh *et al.*, 1988), soit de brins d'ADN encore attachés au noyau qui formeraient des boucles (McKelvey-Martin *et al.*, 1993). Toujours est-il que le test des comètes détecte les dommages à l'ADN et peut mettre en évidence le phénomène d'apoptose ainsi que l'efficacité des systèmes de réparation de l'ADN après seulement quelques heures de traitement, alors que le test des micronoyaux ne détecte que les lésions chromosomiques exprimées qui ont survécu à au moins un cycle mitotique (Van Goethem *et al.*, 1997).

Lixiviat des sols	test des micronoyaux	test des comètes
SI	0,8	NG
SII	25	NG
SIII	3	1,6
SIV	90	50

Tableau XXXV : LOEC (en %) des différents tests réalisés sur *Vicia* et appliqués au lixiviat des quatre sols. NG = non génotoxique aux concentrations testées

Lixiviat des sols	test des micronoyaux	test des comètes
SI	3	3
SII	50	NG
SIII	3	NG
SIV	90	NG

Tableau XXXVI : LOEC (en %) des différents tests réalisés sur *Allium* et appliqués au lixiviat des quatre sols. NG = non génotoxique aux concentrations testées

Enfin, les critères phytotoxiques et génotoxiques mesurés sur *Vicia* et *Allium* en même temps (Tableaux XXXVII et XXXVIII) montrent que :

- a) il est difficile de dire qu'une plante est plus sensible qu'une autre si nous considérons l'élongation racinaire ou l'indice mitotique : il faut remarquer que l'écart entre les LOEC pour l'élongation racinaire est au maximum de 2. Par contre, *Vicia* apparaît aussi ou plus sensible qu'*Allium* pour le critère « micronoyaux ». C'est la raison pour laquelle nous avons déposé un projet de norme à l'AFNOR relatif au test *Vicia*-micronoyaux (AFNOR, 1998).
- b) les critères phytotoxiques détectent des effets à des concentrations bien supérieures que les critères génotoxiques et aident quelquefois à la compréhension et à l'interprétation des données. C'est ainsi que, pour *Vicia* et dans le cas du sol SI, la LOEC (élongation racinaire) est passée de 50 à 12% entre 96 et 98, alors que la LOEC (micronoyaux) est passée de 25 à 0,8%. En revanche, toujours pour *Vicia* mais dans le cas cette fois-ci du sol SIII, la LOEC (élongation racinaire) est passée de 6 à 50%, alors que la LOEC (micronoyaux) passait de 0,4 à 3%. L'aspect génotoxicité et l'aspect toxicité évoluent dans le même sens. Cependant, il est étonnant que l'élongation racinaire et l'indice mitotique ne soient pas davantage corrélés puisque ces deux paramètres devraient en toute logique être étroitement liés. Or, il apparaît plusieurs fois que l'élongation racinaire est inhibée, alors que l'indice mitotique ne l'est pas pour une même concentration de lixiviat.

Lixiviat des sols	test des micronoyaux	élongation racinaire	indice mitotique
SI (Mai 96)	25	50	90
SI (Mai 98)	0,8	12	25
SII (Juil 96)	12	50	NT
SII (Juil 98)	25	50	NT
SIII (Dec 96)	0,4	6	NT
SIII (Mars 98)	3	50	NT
SIV (Fev 97)	50	NT	NT
SIV (Nov 97)	90	NT	NT

Tableau XXXVII : LOEC (en %) des différents tests réalisés sur *Vicia* et appliqués au lixiviat des quatre sols. NT = non toxique aux concentrations testées

Lixiviat des sols	test des micronoyaux	élongation racinaire	indice mitotique
SI (Mai 96)	50	NT	NT
SI (Mai 98)	3	12	90
SII (Juil 96)	50	50	50
SII (Juil 98)	50	90	NT
SIII (Dec 96)	3	3	25
SIII (Mars 98)	3	50	NT
SIV (Fev 97)	50	NT	NT
SIV (Nov 97)	90	NT	NT

Tableau XXXVIII : LOEC (en %) des différents tests réalisés sur *Allium* et appliqués au lixiviat des quatre sols. NT = non toxique aux concentrations testées

II. Autres modes d'exposition de *Vicia* et d'*Allium*

Parallèlement au traitement des organismes végétaux avec les lixiviats des sols contaminés, il nous a semblé intéressant d'envisager deux autres modes d'exposition afin de mettre en contact les racines des plantes avec la phase solide, et donc avec les particules des sols. Pour mémoire, nous rappelons ici le principe de ces deux modes d'exposition alternatifs à la lixiviation :

a) immersion des racines dans une suspension de sol :

Les racines de *Vicia* et d'*Allium* ont été immergées dans un mélange constitué de sol et de milieu de Hoagland (MH). Les différentes concentrations ont été préparées en mélangeant chacun des sols SI, SII, SIII et SIV dans le milieu de Hoagland (ex.: 5% = 5 g de sol qsp. 100 g de milieu de Hoagland). La durée d'exposition est la même que celle choisie pour les lixiviats, à savoir 30 heures.

b) germination des plantes dans les sols :

Les organismes végétaux sont directement mis à germer dans les sols. Dans ce cas, nous avons préparé les concentrations en mélangeant chaque sol à du sable de Fontainebleau (e.g.: 5% = 5 g de sol qsp. 100 g de sable). La durée d'exposition, dans ce cas, a dû être prolongée car la phase de germination doit se dérouler dans le sol : nous avons donc laissé les oignons pendant 3 jours et les fèves pendant 5 jours dans les sols afin de permettre la croissance racinaire.

Cette étude a été effectuée sur *Vicia* et *Allium* et a permis de déterminer, en plus du critère génotoxique (la formation de micronoyaux), deux critères de toxicité : l'élongation racinaire et l'indice mitotique.

Les deux plantes ainsi que les trois modes d'exposition (lixiviat, sol + MH et sol + sable) ont été testés simultanément et dans les mêmes conditions expérimentales pour les quatre sols. Nous rappellerons les résultats concernant les tests sur lixiviats réalisés lors de la deuxième série d'expériences (présentés dans § I.2.1.) pour faciliter la comparaison des résultats.

II.1. Le test des micronoyaux

Le tableau XXXIX présente les résultats du test des micronoyaux appliqué à *Vicia faba* exposé selon les deux modes d'exposition. Les résultats relatifs aux tests sur lixiviats sont rappelés dans le tableau XL.

sols	Concentration de sol (%)											
	0,8	0,16	0,3	0,6	1,2	2,5	5	9	25	50	75	100
SI (sol + MH)												
SI (sol + sable)												
SII (sol + MH)												
SII (sol + sable)												
SIII (sol + MH)												
SIII (sol + sable)												
SIV (sol + MH)												
SIV (sol + sable)												

Tableau XXXIX : Résultats du test *Vicia*-micronoyaux réalisé sur les sols contaminés selon deux modes d'exposition différents (MH = milieu de Hoagland)

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)							
	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 98)								
SII (Juil 98)								
SIII (Mars 98)								
SIV (Nov 97)								

Tableau XL : Rappels des résultats des tests *Vicia*-micronoyaux réalisés sur le lixiviat des sols contaminés à deux temps différents

	concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)
+	concentration d'effet maximal

Il en est de même pour *Allium cepa* (Tableaux XLI et XLII) :

sols	Concentration de sol (%)										
	0,1	0,3	0,6	1,2	2,5	5	9	25	50	75	100
SI (sol + MH)											
SI (sol + sable)											
SII (sol + MH)											
SII (sol + sable)											
SIII (sol + MH)											
SIII (sol + sable)											
SIV (sol + MH)											
SIV (sol + sable)											

Tableau XLI : Résultats du test *Allium*-micronoyaux réalisé sur les sols contaminés selon deux modes d'exposition différents (MH = milieu de Hoagland)

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)						
	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 98)							
SII (Juil 98)							
SIII (Mars 98)							
SIV (Nov 97)							

Tableau XLII : Résultats des tests *Allium*-micronoyaux réalisés sur le lixiviat des sols contaminés

	concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)
+	concentration d'effet maximal

Il faut noter que la lixiviation est effectuée avec un facteur de dilution de 10 et donc que la comparaison n'est pas directe. Par exemple, la colonne 9% (sol + MH) ou (sol + sable) est comparable à la colonne 90% lixiviat (ce qui explique la disposition des tableaux).

Les résultats des tests des micronoyaux laissent entrevoir que les sols présentent un potentiel génotoxique certain dans la mesure où de faibles concentrations de ces sols (qu'ils soient mélangés à du sable ou à du milieu de Hoagland) induisent un nombre significatif de micronoyaux dans les cellules racinaires de *Vicia* dans tous les cas et dans 6 cas sur 8 pour *Allium*. Il faut noter cependant que ce taux est généralement plus faible et qu'il est significatif dans un domaine de concentrations plus restreint que dans le cas des lixiviats. Il faut aussi remarquer que la sensibilité de *Vicia* aux deux protocoles est quasiment identique, ce qui n'est pas le cas d'*Allium* pour SI et SIII : la fréquence de micronoyaux est significativement augmentée seulement lorsque les plantes sont mises à germer dans les sols mélangés à du sable.

Détaillons maintenant les résultats de chacun des sols : le sol SI induit un nombre significatif de micronoyaux dans les racines de fève aux concentrations de 0,6 et 0,3% quand il est respectivement mélangé à du MH et à du sable. Par contre, seul un effet significatif (à 0,3%) est mis en évidence dans les racines d'oignon lorsqu'elles sont exposées au sol mélangé à du sable.

En ce qui concerne le sol SII, il induit un effet génotoxique à des concentrations de 5% dans le cas du MH, et de 2,5% dans le cas du sable pour *Vicia*, alors que la LOEC est de 2,5% dans les deux cas pour *Allium*.

Un effet génotoxique substantiel du sol SIII est mis en évidence par ces expérimentations, puisqu'un taux significatif de micronoyaux est observé dans les racines de *Vicia* à des concentrations de 0,6% quand le MH sert de matrice de dilution et de 0,3% quand c'est du sable. En revanche, seul le sable permet au sol SIII d'exprimer son potentiel génotoxique dans les racines d'*Allium* à la concentration de 0,3%.

Enfin, le sol SIV apparaît le moins génotoxique car il faut 100% de sol pour observer un effet génotoxique significatif, et ce, quelles que soient la matrice de dilution utilisée ou l'espèce végétale considérée.

D'un point de vue général, nous pouvons constater une assez bonne corrélation entre les deux modes d'exposition présentés ici. Toutefois, le sable semble être une matrice de dilution plus appropriée pour détecter le potentiel génotoxique des sols contaminés. En effet, des résultats positifs ont été trouvés dans tous les cas à des concentrations égales ou inférieures à celles examinées pour le milieu de Hoagland. De plus, aucun effet significatif n'a pu être observé dans 2 cas sur 8 pour ce dernier milieu de dilution.

Cette différence de sensibilité peut être expliquée par deux hypothèses : d'une part, la durée d'exposition des plantes aux sols est plus importante dans le cas du sable (3 jours pour les oignons et 5 jours pour les fèves) que dans le cas du milieu de Hoagland (30 heures pour les deux comme pour les lixiviats) ; d'autre part, la microflore des sols pourrait jouer son rôle de transformation métabolique plus efficacement en phase solide qu'en phase liquide, du fait de son adaptation à ce même milieu solide. C'est ainsi qu'il a été montré, dans une étude avec *Tradescantia*, que la fréquence de micronoyaux dans des plantes exposées à un sol artificiellement contaminé avec du trioxyde d'arsenic, du tétraacétate de plomb ou de la dieldrine était dans tous les cas supérieure à celle observée dans les inflorescences traitées avec les solutions aqueuses contenant les mêmes produits à des concentrations équivalentes (Gill et Sandhu, 1992).

Il faut noter aussi que le sable est un matériau inerte contenant peu ou pas de substances humiques qui peuvent adsorber les micropolluants. L'importance de la constitution du sol dans l'induction d'effets génotoxiques a été montrée avec l'alachlor (De Marco et al., 1990) et avec l'atrazine (De Simone et al., 1992) qui ont été mélangés à des sols de nature différente et testés avec le test Vicia-MCN. Les auteurs avaient expliqué la différence des résultats des tests selon la nature des sols par un probable mécanisme d'interaction entre l'atrazine donneur d'électrons et les substances humiques acceptrices d'électrons, ce qui rend les toxiques moins disponibles pour les plantes.

Enfin, pour ce qui concerne la comparaison des protocoles sol + MH et lixiviat, il convient de noter que dans 3 cas sur 8, le protocole lixiviat est plus sensible que le protocole sol + MH, alors que dans 5 cas sur 8, les LOEC sont du même ordre de grandeur (c'est-à-dire à un pas de concentration près). En l'absence d'autres facteurs, nous ne pouvons expliquer cette différence que par le fait que le lixiviat est agité pendant 24 heures, alors que le mélange sol + MH ne l'est pas.

II.2. L'élongation racinaire

Les résultats de l'élongation racinaire de *Vicia* exposé aux quatre sols selon les deux modes d'exposition différents sont présentés dans le tableau XLIII. Les résultats obtenus sur les lixiviats (avec un facteur de dilution de 10) sont rappelés dans le tableau XLIV. Les tableaux XLV et XLVI concernent *Allium*.

sols	Concentration de sol (%)											
	0,8	0,16	0,3	0,6	1,2	2,5	5	9	25	50	75	100
SI (sol + MH)												
SI (sol + sable)												
SII (sol + MH)												
SII (sol + sable)												
SIII (sol + MH)												
SIII (sol + sable)												
SIV (sol + MH)												
SIV (sol + sable)												(1)

Tableau XLIII : Résultats de l'élongation racinaire de *Vicia* exposé aux sols contaminés selon deux modes d'exposition différents (MH = milieu de Hoagland)

(1) augmentation de l'élongation racinaire

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)							
	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 98)								
SII (Juil 98)								
SIII (Mars 98)								
SIV (Nov 97)								

Tableau XLIV : Rappels des résultats de l'élongation racinaire de *Vicia* exposé au lixiviat des sols contaminés à deux temps différents

L'ensemble de ces résultats montre que les sols SI, SII et SIII sont phytotoxiques dans la mesure où de faibles concentrations de ces sols (qu'ils soient mélangés à du sable ou à du milieu de Hoagland) induisent une diminution significative, dans 6 cas sur 8, de l'élongation racinaire de *Vicia* et d'*Allium*. Il faut aussi remarquer que *Vicia* et *Allium* ont les mêmes profils de réponse pour ce critère.

Le sol SI induit une diminution significative de l'élongation des racines de fève aux concentrations de 1,2 et 0,6% quand il est respectivement mélangé à du MH et à du sable. De même, un effet significatif est mis en évidence dans les racines d'oignon, mais à des dilutions plus fortes (2,5 et 1,2%). En ce qui concerne le sol SII, il induit un effet phytotoxique à des concentrations de 50 ou 75%.

sols	Concentration de sol (%)											
	0,8	0,16	0,3	0,6	1,2	2,5	5	9	25	50	75	100
SI (sol + MH)												
SI (sol + sable)												
SII (sol + MH)												
SII (sol + sable)												
SIII (sol + MH)												
SIII (sol + sable)												
SIV (sol + MH)												
SIV (sol + sable)												

Tableau XLV : Résultats de l'élongation racinaire d' *Allium* exposé aux sols contaminés selon deux modes d'exposition différents (MH = milieu de Hoagland)

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)							
	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 98)								
SII (Juil 98)								
SIII (Mars 98)								
SIV (Nov 97)								

Tableau XLVI : Rappels des résultats de l'élongation racinaire de *Allium* exposé au lixiviat des sols contaminés à deux temps différents

 concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)

Un effet phytotoxique intermédiaire du lixiviat du sol SIII est mis en évidence puisque la LOEC est de 5% dans le mélange sol + MH et de 9 ou 25% dans le protocole sol + sable.

Enfin, le sol SIV n'apparaît pas phytotoxique pour aucune des deux espèces et pour aucun des modes d'exposition. Nous observons même une augmentation significative de la croissance des racines qui ont poussé dans le sol SIV, ce qui peut être attribué à une richesse de ce sol en nutriments.

Il faut noter que les deux modes d'exposition (sol + MH) et (sol + sable) donnent des résultats étroitement corrélés. Il y a également une assez bonne corrélation entre les LOEC du mélange sol + MH et les LOEC obtenues avec les lixiviats si l'on tient compte du facteur de dilution pour les lixiviats.

II.3. L'indice mitotique

L'indice mitotique des cellules des racines exposées aux quatre sols selon les deux modes d'exposition différents est présenté dans le tableau XLVII pour *Vicia*. Nous pourrions comparer les résultats avec ceux obtenus sur les lixiviats (Tableau XLVIII).

sols	Concentration de sol (%)											
	0,08	0,16	0,3	0,6	1,2	2,5	5	9	25	50	75	100
SI (sol + MH)												
SI (sol + sable)												
SII (sol + MH)												
SII (sol + sable)												
SIII (sol + MH)												
SIII (sol + sable)												
SIV (sol + MH)												
SIV (sol + sable)												

Tableau XLVII: Résultats de l'indice mitotique de *Vicia* exposé aux sols contaminés selon deux modes d'exposition différents (MH = milieu de Hoagland)

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)							
	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 98)								
SII (Juil 98)								
SIII (Mars 98)								
SIV (Nov 97)								

Tableau XLVIII: Rappels des résultats de l'indice mitotique de *Vicia* exposé au lixiviat des sols contaminés à deux temps différents

De la même façon que pour l'élongation racinaire, tous les sols présentent des effets phytotoxiques pour les deux plantes à l'exception du sol SIV. Les résultats sont relativement homogènes, que ce soit pour la matrice de dilution ou la plante testée. Il est important de noter que les deux modes d'exposition donnent des résultats très proches.

Le sol SI induit une diminution significative de l'indice mitotique des cellules racinaires à partir des concentrations de 1,2 et 2,5% pour respectivement *Vicia* et *Allium*. Les LOEC sont identiques pour les deux protocoles.

Nous pouvons constater une fois de plus que le sol SII est beaucoup moins toxique que le sol SI puisque 50% de sol sont nécessaires pour diminuer l'indice mitotique de *Vicia* lors des deux modes d'exposition. La LOEC pour *Allium* est de 50% quand le sol SII est mélangé à du MH et de 25% à du sable.

Quant au sol SIII, il provoque une diminution de l'indice mitotique des cellules racinaires de *Vicia* à partir de 50% du mélange sol + MH et dès 25% du mélange sol + sable. Dans le cas des cellules d'*Allium*, la LOEC est de 2,5% pour le mélange sol + MH et de 9% pour le mélange sol + sable.

Enfin, le sol SIV n'apparaît pas phytotoxique pour aucune des deux espèces et pour aucun des modes d'exposition.

Les tableaux XLIX et L synthétisent les résultats d'*Allium* :

sols	Concentration de sol (%)											
	0,08	0,16	0,3	0,6	1,2	2,5	5	9	25	50	75	100
SI (sol + MH)												
SI (sol + sable)												
SII (sol + MH)												
SII (sol + sable)												
SIII (sol + MH)												
SIII (sol + sable)												
SIV (sol + MH)												
SIV (sol + sable)												

Tableau XLIX : Résultats de l'indice mitotique d' *Allium* exposé aux sols contaminés selon deux modes d'exposition différents (MH = milieu de Hoagland)

lixiviat des sols	Concentration de lixiviat (%)							
	0,8	1,6	3	6	12	25	50	90
SI (Mai 98)								
SII (Juil 98)								
SIII (Mars 98)								
SIV (Nov 97)								

Tableau L : Rappels des résultats de l'indice mitotique d' *Allium* exposé au lixiviat des sols contaminés à deux temps différents

■ concentration(s) où l'effet est significativement différent de celui du témoin ($p < 0,05$)

III. Récapitulatif des résultats

Ce paragraphe sera consacré à un récapitulatif des données obtenues pour chaque matrice, à l'aide de chacun des tests (y compris le test Mutatox utilisé comme contrôle interne) et avec les trois modes d'exposition envisagés. La seule valeur qui permet des comparaisons aisées est la LOEC (concentration la plus faible où il y a un effet significatif). Cette valeur ne nous satisfait pas pleinement car elle est critiquée, à juste titre, en raison notamment de sa dépendance vis-à-vis des concentrations testées. Malheureusement, nous n'avons pas trouvé mieux pour résumer des résultats de phytotoxicité et de génotoxicité. Le test Mutatox dont les données ont été ajoutées aux données de génotoxicité montre que dans deux cas sur quatre, ce test est capable de détecter une génotoxicité au même niveau que le test *Vicia* (sols SII et SIV). Dans le cas des sols SI et SIII, ce test est peu ou pas sensible par rapport aux tests *Vicia* et *Allium*. Il faut noter que tous les résultats bruts relatifs aux sols SI, SII, SIII et SIV sont respectivement regroupés dans les annexes C, D, E et F.

III.1. Résultats des tests réalisés sur le sol SI

Le tableau LI résume les différents résultats obtenus sur le sol SI et selon les modes d'exposition.

tests de génotoxicité	modes d'exposition des plantes		
	lixiviat (% de phase liquide)	sol + MH (% de phase solide)	sol + sable (% de phase solide)
<i>Tradescantia</i> -mutations (Mai 98)	90		
<i>Tradescantia</i> -micronoyaux (Dec 97)	25		
<i>Vicia</i> -micronoyaux (Mai 96)	25		
<i>Vicia</i> -micronoyaux (Mai 98)	0,8	0,6	0,3
<i>Allium</i> -micronoyaux (Mai 96)	50		
<i>Allium</i> -micronoyaux (Mai 98)	3	NG	0,3
<i>Vicia</i> -comètes (Juil 98)	NG		
<i>Allium</i> -comètes (Juil 98)	3		
Mutatox (Juil 98) - S9	NG		
Mutatox (Juil 98) +S9	NG		
tests de phytotoxicité			
<i>Vicia</i> -élongation racinaire (Mai 96)	50		
<i>Vicia</i> -élongation racinaire (Mai 98)	12	1,2	0,6
<i>Allium</i> -élongation racinaire (Mai 96)	NT		
<i>Allium</i> -élongation racinaire (Mai 98)	12	2,5	1,2
<i>Vicia</i> -indice mitotique (Mai 96)	90		
<i>Vicia</i> -indice mitotique (Mai 98)	25	1,2	1,2
<i>Allium</i> -indice mitotique (Mai 96)	NT		
<i>Allium</i> -indice mitotique (Mai 98)	90	2,5	2,5

Tableau LI: LOEC (en %) des différents tests réalisés sur le sol SI selon divers modes d'exposition (MH = milieu de Hoagland)

NG = non génotoxique aux concentrations testées

NT = non toxique aux concentrations testées

Le sol SI est un sol artificiellement contaminé par des métaux (Cd, Cr, Pb et Zn). Il s'est avéré génotoxique et phytotoxique pour *Vicia* et *Allium*, surtout lors de la deuxième série d'expériences. Le test Trad-MCN a répondu positivement (LOEC = 25%), alors que le test Trad-SH n'a détecté un potentiel mutagène qu'à 90% de lixiviat. Seul *Allium* a détecté le potentiel génotoxique de ce sol avec le test des comètes. Enfin, le test Mutatox est négatif. Les autres modes d'exposition (sol + MH) et (sol + sable) ont donné des réponses très similaires entre eux et avec le mode « lixiviat ».

Les métaux du sol SI peuvent interagir avec les "phénomènes redox" cellulaires et provoquer une augmentation des enzymes du stress oxydant, tel que l'ont montré Ferrari et al. (1999). Ces auteurs ont exposé différentes plantes (la laitue, l'avoine et le chou chinois) à un mâchefer d'incinération d'ordures ménagères principalement contaminé par des métaux (fer, plomb et cuivre). Les enzymes du stress oxydant, à savoir superoxyde dismutase, peroxydase, catalase et glutathion réductase, ont toutes été significativement augmentées dans les trois plantes testées. Cela ne préjuge en rien du fait que les métaux peuvent aussi agir directement (Dryanovska, 1987 ; Liu et al., 1994c).

III.2. Résultats des tests réalisés sur le sol SII

Les différents résultats obtenus sur le sol SII sont synthétisés dans le tableau LII.

tests de génotoxicité	modes d'exposition des plantes		
	lixiviat (% de phase liquide)	sol + MH (% de phase solide)	sol + sable (% de phase solide)
<i>Tradescantia</i> -mutations (Juil 98)	NG		
<i>Tradescantia</i> -micronoyaux (Dec 97)	25		
<i>Vicia</i> -micronoyaux (Juil 96)	12		
<i>Vicia</i> -micronoyaux (Juil 98)	25	5	2,5
<i>Allium</i> -micronoyaux (Juil 96)	50		
<i>Allium</i> -micronoyaux (Juil 98)	50	2,5	2,5
<i>Vicia</i> -comètes (Juil 98)	NG		
<i>Allium</i> -comètes (Juil 98)	NG		
Mutatox (Juil 98) - S9	25		
Mutatox (Juil 98) + S9	12		
tests de phytotoxicité			
<i>Vicia</i> -élongation racinaire (Juil 96)	50		
<i>Vicia</i> -élongation racinaire (Juil 98)	50	50	50
<i>Allium</i> -élongation racinaire (Juil 96)	50		
<i>Allium</i> -élongation racinaire (Juil 98)	90	50	75
<i>Vicia</i> -indice mitotique (Juil 96)	NT		
<i>Vicia</i> -indice mitotique (Juil 98)	NT	50	50
<i>Allium</i> -indice mitotique (Juil 96)	50		
<i>Allium</i> -indice mitotique (Juil 98)	NT	50	25

Tableau LII: LOEC (en %) des différents tests réalisés sur le sol SII selon divers modes d'exposition (MH = milieu de Hoagland)

NG = non génotoxique aux concentrations testées

NT = non toxique aux concentrations testées

Le sol SII est un sol artificiellement contaminé par des polluants organiques (trichlorophénol, pentachlorophénol et phénanthrène). Il est génotoxique avec les tests des micronoyaux dans toutes les plantes et avec le test Mutatox, mais pas avec le test des comètes, ni avec le test Trad-SH. En outre, il est toxique pour l'élongation racinaire mais pas pour l'indice mitotique. Très peu de différences sont à signaler entre les résultats des deux séries d'expériences. Enfin, les deux modes d'exposition envisagés ont donné des réponses très similaires à celles des lixiviats pour la génotoxicité (si l'on tient compte du facteur de dilution de 10 des lixiviats). En revanche, pour l'élongation racinaire, le mode « lixiviat » est le mode le plus sensible.

III.3. Résultats des tests réalisés sur le sol SIII

Considérons maintenant les différents résultats obtenus sur le sol SIII (Tableau LIII).

tests de génotoxicité	modes d'exposition des plantes		
	lixiviât (% de phase liquide)	sol + MH (% de phase solide)	sol + sable (% de phase solide)
<i>Tradescantia</i> -mutations (Mars 98)	50		
<i>Tradescantia</i> -micronoyaux (Dec 97)	25		
<i>Vicia</i> -micronoyaux (Dec 96)	0,4		
<i>Vicia</i> -micronoyaux (Mars 98)	3	0,6	0,3
<i>Allium</i> -micronoyaux (Dec 96)	3		
<i>Allium</i> -micronoyaux (Mars 98)	3	NG	0,3
<i>Vicia</i> -comètes (Juil 98)	1,6		
<i>Allium</i> -comètes (Juil 98)	NG		
Mutatox (Juil 98) - S9	100		
Mutatox (Juil 98) + S9	100		
tests de phytotoxicité			
<i>Vicia</i> -élongation racinaire (Dec 96)	6		
<i>Vicia</i> -élongation racinaire (Mars 98)	50	5	9
<i>Allium</i> -élongation racinaire (Dec 96)	3		
<i>Allium</i> -élongation racinaire (Mars 98)	50	5	25
<i>Vicia</i> -indice mitotique (Dec 96)	NT		
<i>Vicia</i> -indice mitotique (Mars 98)	NT	50	25
<i>Allium</i> -indice mitotique (Dec 96)	25		
<i>Allium</i> -indice mitotique (Mars 98)	NT	2,5	9

Tableau LIII: LOEC (en %) des différents tests réalisés sur le sol SIII selon divers modes d'exposition (MH = milieu de Hoagland)

NG = non génotoxique aux concentrations testées

NT = non toxique aux concentrations testées

Le sol SIII, prélevé sur un site pollué réel, contient de fortes teneurs en métaux et en PCBs. Tous les tests, à l'exception du test *Allium*-comètes, ont révélé ses propriétés génotoxiques, et l'élongation racinaire sa toxicité. Il a été trouvé légèrement moins génotoxique et moins toxique en 1998 par rapport à 1996. Là encore, les données relevées lors des expériences sur les sols mélangés à du MH ou à du sable sont très similaires entre elles et assez bien corrélées avec les résultats sur lixiviats.

III.4. Résultats des tests réalisés sur le sol SIV

Le lixiviat du sol SIV (Tableau LIV) qui est un sol pollué par des métaux et par des HAPs a donné des réponses positives dans tous les tests de génotoxicité, à l'exception du test *Allium-comètes*. En revanche, aucun effet phytotoxique n'a été décelé, et un effet stimulateur de la croissance racinaire a même été constaté. Les résultats des deux autres modes d'exposition sont tout à fait similaires entre eux. Enfin, cette matrice a été trouvée légèrement moins génotoxique lors de la deuxième série d'expériences.

tests de génotoxicité	modes d'exposition des plantes		
	lixiviat (% de phase liquide)	sol + MH (% de phase solide)	sol + sable (% de phase solide)
<i>Tradescantia</i> -mutations (Nov 97)	90		
<i>Tradescantia</i> -micronoyaux (Dec 97)	90		
<i>Vicia</i> -micronoyaux (Fev 97)	50		
<i>Vicia</i> -micronoyaux (Nov 97)	90	100	100
<i>Allium</i> -micronoyaux (Fev 97)	50		
<i>Allium</i> -micronoyaux (Nov 97)	90	100	100
<i>Vicia</i> -comètes (Juil 98)	50		
<i>Allium</i> -comètes (Juil 98)	NG		
Mutatox (Juil 98) - S9	100		
Mutatox (Juil 98) + S9	100		
tests de phytotoxicité			
<i>Vicia</i> -élongation racinaire (Fev 97)	NT		
<i>Vicia</i> -élongation racinaire (Nov 97)	NT	NT	NT +
<i>Allium</i> -élongation racinaire (Fev 97)	NT +		
<i>Allium</i> -élongation racinaire (Nov 97)	NT	NT	NT
<i>Vicia</i> -indice mitotique (Fev 97)	NT		
<i>Vicia</i> -indice mitotique (Nov 97)	NT	NT	NT
<i>Allium</i> -indice mitotique (Fev 97)	NT		
<i>Allium</i> -indice mitotique (Nov 97)	NT	NT	NT

Tableau LIV : LOEC (en %) des différents tests réalisés sur le sol SIV selon divers modes d'exposition (MH = milieu de Hoagland)

NT = non génotoxique aux concentrations testées

NT = non toxique aux concentrations testées

+ = augmentation significative de l'élongation racinaire

Le sol SIV, même s'il a donné des réponses positives dans la quasi totalité des tests de génotoxicité, présente néanmoins des LOEC élevées, et par conséquent s'est avéré peu génotoxique. Il contient pourtant des métaux et des HAPs connus pour induire des effets génotoxiques chez de nombreux organismes. Pour expliquer cette faible génotoxicité et l'absence de toxicité, nous pouvons émettre l'hypothèse d'une biodégradabilité par les microorganismes et/ou d'une adsorption des HAPs par les particules du sol, les rendant moins biodisponibles pour les plantes. En effet, des auteurs ont montré que dans certains sols, les HAPs étaient fortement adsorbés par les particules du sol, ce qui résultait en une très faible concentration de ces composés dans les extraits aqueux

(Weissenfels et al., 1992). Simao-Beaunoir et al (1999) ont mis en évidence que cette adsorption des HAPs par les particules du sol dépendait étroitement de la teneur en matières organiques.

III.5. Commentaires généraux

L'interprétation d'un tel ensemble de données est délicate. Nous nous contenterons ici d'établir un classement des sols en fonction de leur génotoxicité et de leur phytotoxicité :

Pour les essais réalisés en phase liquide (lixiviat), nous avons tenu compte de la valeur la plus faible des LOEC pour déterminer les séquences suivantes :

la séquence de génotoxicité est : SIII > SI > SII > SIV

la séquence de phytotoxicité est : SIII > SI > SII > SIV

Pour les essais en phase liquide (sol + Milieu de Hoagland), nous avons utilisé toutes les valeurs disponibles pour la séquence de phytotoxicité et nous avons choisi d'utiliser la valeur la plus faible pour la séquence de génotoxicité :

la séquence de génotoxicité est : SI = SIII > SII > SIV

la séquence de phytotoxicité est : SI > SIII > SII > SIV

Quant aux essais en phase solide, nous avons choisi de comparer toutes les valeurs disponibles car dans chaque cas, les LOEC permettent de définir les mêmes séquences :

la séquence de génotoxicité est : SI = SIII > SII > SIV

la séquence de phytotoxicité est : SI > SIII > SII > SIV

Nous observons donc que les résultats obtenus avec les deux protocoles "alternatifs" à la lixiviation fournissent des séquences identiques, alors que si l'on compare ce qui est comparable, à savoir le protocole sol + MH et le lixiviat, il y a inversion de l'ordre de toxicité pour les sols SI et SIII. De ces observations, nous pouvons donc en déduire que le protocole sol + MH est plus proche du protocole phase solide que du protocole « lixiviation » et que le protocole « lixiviation » est un bon procédé dans l'évaluation de la toxicité et de la génotoxicité des sols contaminés. Nous pouvons classer les modes d'exposition selon leur efficacité à détecter le potentiel génotoxique et toxique des sols de la façon suivante (en tenant compte du facteur de dilution de 10) :

lixiviat > sol + sable > sol + MH

2^{ème} partie : Les boues de station d'épuration

Nous ne détaillerons pas les résultats obtenus avec les deux matrices B1 (boue de STEP) et B3 (boue B1 compostée), mais présenterons simplement la synthèse des résultats. Les résultats bruts sont présentés dans les annexes G et H.

I. La boue de station d'épuration B1

Les résultats des tests réalisés sur le lixiviat de la boue B1 sont résumés dans le tableau LV.

	1 ^{ère} campagne (Avril 97)				2 ^{ème} campagne (Sept 97)
	<i>Vicia faba</i>		<i>Allium cepa</i>		<i>Vicia faba</i>
Conservation de la boue B1	7 jours	21 jours	7 jours	21 jours	7 jours
Micronoyaux	75	75	100	75	100
Elongation racinaire	NT	NT	NT	NT effet positif à 100%	NT
Indice mitotique	NT	NT	NT	NT	NT

Tableau LV : LOEC (en %) des différents tests réalisés sur le lixiviat de la boue B1

NT = Non Toxique pour les concentrations testées

Concernant le critère d'effet génotoxique, lors de la première campagne, très peu de micronoyaux sont formés dans les cellules racinaires de *Vicia* et d'*Allium* pour les concentrations de lixiviat les plus fortes (75 et 100%). Ce léger effet génotoxique ne se retrouve plus que pour 100% de lixiviat lors de la deuxième campagne.

Le lixiviat de la boue B1 n'induit aucun effet négatif sur l'élongation racinaire des deux plantes utilisées, mais provoque même une légère augmentation de la croissance des racines d'*Allium cepa* pour 100% de lixiviat lorsque la boue est conservée 21 jours lors de la première

campagne. Pour ce qui est de l'indice mitotique, aucun effet significatif n'apparaît dans aucun des cas étudiés.

La conservation de la boue pendant 14 jours supplémentaires ne provoque pas de changement important au niveau de la génotoxicité du lixiviat (pas d'effet "conservation"). Toutefois, il est possible de noter un effet positif sur l'élongation racinaire d'*Allium*.

Par ailleurs, il semble qu'il y ait une légère diminution des effets génotoxiques d'une campagne à une autre.

II. La boue de station d'épuration B3

Pour le critère d'effet génotoxique, seul le lixiviat de la boue conservée 7 jours lors de la première campagne induit un léger effet génotoxique à 75% chez *Vicia faba* (Tableau LVI).

	1ère campagne (Avril 97)				2ème campagne (Sept 97)
	<i>Vicia faba</i>		<i>Allium cepa</i>		<i>Vicia faba</i>
Conservation de la boue B3	7 jours	70 jours	7jours	70 jours	7 jours
Micronoyaux	75	NG	NG	NG	NG
Elongation racinaire	NT	NT	NT	NT	NT
Indice mitotique	NT	NT	NT	NT	NT

Tableau LVI : LOEC (en %) des différents tests réalisés sur le lixiviat de la boue B1

NT = Non Toxique et NG = Non Génotoxique pour les concentrations testées

Le lixiviat de la boue B3 n'induit aucun effet, ni négatif, ni positif, que ce soit sur l'élongation racinaire ou l'indice mitotique des deux espèces végétales.

La conservation des échantillons pendant 63 jours supplémentaires montre qu'il y a une diminution de la génotoxicité dans un cas sur deux. De même, il semble qu'il y ait là aussi un léger effet "campagne" (diminution de la génotoxicité entre la 1^{ère} et la 2^{ème} campagne).

III. Récapitulatif des résultats

La boue B1 n'est pas toxique pour les plantes testées et semble même produire un effet stimulant de la croissance racinaire de l'oignon, après une conservation de 21 jours lors de la première campagne. Cet effet stimulant de la croissance racinaire peut être expliqué par l'apport de matières fertilisantes contenues dans la boue. Par contre, un léger effet génotoxique apparaît aux concentrations les plus fortes dans les deux cas de conservation étudiés. Malheureusement, les données physico-chimiques des boues ne sont pas disponibles.

Lorsque cette boue est compostée (B3), nous n'observons plus aucun effet, ni négatif, ni positif, au niveau de la croissance racinaire de la fève et de l'oignon, et seulement un très faible effet génotoxique chez *Vicia faba* qui disparaît lorsque la boue a été conservée 70 jours ou lors de la deuxième campagne. Le compostage a donc eu un effet bénéfique.

Enfin, notons que les informations données par *Vicia faba* et *Allium cepa* sont relativement cohérentes et il apparaît une fois de plus que *Vicia faba* est **aussi ou plus sensible** qu'*Allium cepa* (ce qui a d'ailleurs justifié sa seule utilisation au cours de la deuxième campagne) et peut ainsi être sélectionnée pour l'évaluation du potentiel génotoxique des milieux contaminés.

3ème partie : Discussion générale et conclusions

Ce travail avait pour objectif d'implanter et de valider au laboratoire différents essais de phytogénotoxicité : tests *Tradescantia*-mutations et micronoyaux, *Vicia/Allium*-micronoyaux et comètes dont les résultats publiés dans la littérature nous avaient paru dignes d'intérêt, ce qui d'ailleurs avait été en grande partie corroboré par une enquête internationale (cf. analyse bibliographique § I).

Parmi l'ensemble des tests de phytogénotoxicité réalisés avec des substances de référence et des matrices complexes (4 sols et 2 boues de STEP), il convient de rappeler les **principales caractéristiques** de chacun d'entre eux (Tableau LVII).

	Trad-SH	Trad-MCN	Vicia-MCN	Allium-MCN	Comètes
sensibilité	+	++	++++	+++	++*
facilité de mise en œuvre (contraintes)	+	+	+++	+++	+++
matériel nécessaire	chambre de culture + loupe binoculaire	chambre de culture + microscope	microscope	microscope	microscope à fluorescence (+ logiciel)
durée totale de l'essai (lecture comprise)	2 semaines	1 semaine	2 semaines	2 semaines	1 jour
durée de lecture de l'essai	30 min pendant 1 semaine	6 jours	10 jours	10 jours	3 heures
protocole défini	++	++	++	++	+
base de données dans la littérature	+++	++++	++	++	+

Tableau LVII : Caractéristiques des tests de phytogénotoxicité

* classification certainement améliorabile

Les résultats de ce travail ont mis en évidence une très grande sensibilité du test *Vicia*-micronoyaux par rapport aux autres tests de génotoxicité sur plantes. L'ordre de sensibilité des autres tests est dans le cas présent :

Vicia-MCN > Allium-MCN > Trad-MCN > Trad-SH

Le test Trad-MCN s'est révélé être efficace pour détecter le potentiel génotoxique de matrices contaminées par des métaux, comme c'est le cas des sols SI et SIII. Ceci avait été mis en exergue dans l'analyse bibliographique (Monarca et al., 1997a ; Knasmüller et al., 1998 ; Steinkellner et al., 1998). Cependant, il faut revenir sur la très faible sensibilité du test *Tradescantia*-micronoyaux, en contradiction avec certains résultats de la bibliographie (Knasmüller et al., 1998 ; Steinkellner et al., 1998). Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les inflorescences de *Tradescantia* ont été traitées dans notre étude avec des lixiviats de sols contaminés qui contenaient beaucoup de matières en suspension malgré l'étape de décantation. Dans ce cas précis, il est clair que des organismes tels que les fèves ou les oignons sont bien plus adaptés que les inflorescences de *Tradescantia* dont les vaisseaux ont pu être obstrués. Ceci expliquerait également le manque de sensibilité du test Trad-SH qui est reconnu pour détecter les effets génotoxiques de substances organiques (mais pas des métaux) telles que des solvants, et même des substances nécessitant une activation métabolique comme le benzo[a]pyrène (Schairer, 1979) qui se retrouve dans les sols SIII et SIV.

En outre, il faut noter que la localisation des organes végétaux étudiés est différente selon les plantes : les racines de *Vicia* et d'*Allium* sont directement en contact avec les micropolluants, alors que pour *Tradescantia*, les produits doivent être véhiculés par les vaisseaux de la tige pour atteindre les cellules cibles, à savoir les cellules de pollen.

En définitive, le test des micronoyaux appliqué à *Vicia faba* et à *Allium cepa* permet de détecter efficacement le potentiel génotoxique des lixiviats des sols contaminés. Ceci avait déjà été mentionné dans l'analyse bibliographique (De Marco et al., 1990 ; Monarca et al., 1997a).

En ce qui concerne le test des comètes appliqué à *Vicia* et *Allium*, il est délicat d'estimer sa sensibilité pour les raisons que nous avons déjà évoquées, à savoir le manque de fiabilité des résultats présentés ci-dessus (puisque nous n'avons pas eu le temps de les répéter) et la nécessité d'améliorer encore le protocole et l'interprétation des résultats. Nous avons par conséquent qualifié ce test comme étant un test "moyennement" sensible.

Intéressons nous maintenant à des caractéristiques plus techniques. Les tests *Vicia/Allium*-micronoyaux présentent le grand avantage d'être faciles à mettre en œuvre puisque ces végétaux sont disponibles dans le commerce pendant toute l'année et dans un très grand nombre de pays.

C'est également le cas du test des comètes puisqu'il se pratique sur les mêmes organismes. Enfin, nous avons placé les tests sur *Tradescantia* en dernière position dans ce classement en raison de la nécessité de mettre en place des cultures et de les entretenir ensuite très régulièrement de manière à disposer d'un assez grand nombre d'inflorescences.

En ce qui concerne le matériel nécessaire, les tests *Vicia/Allium*-micronoyaux sont là encore les plus avantageux car il suffit d'un microscope pour pouvoir réaliser ces tests. En revanche, le test des comètes nécessite un microscope à fluorescence et facultativement (mais c'est préférable) un système d'analyse d'images. Pour ce qui est des tests *Tradescantia*, comme nous l'avons déjà évoqué, les plantes doivent être cultivées dans des conditions précises, ce qui implique que des chambres de culture à température et luminosité contrôlées sont indispensables.

Les tests *Vicia/Allium*-micronoyaux sont plus longs que leur équivalent *Tradescantia* car il s'agit d'observer 9 lames au lieu de 5 et donc 9000 cellules au lieu de 1500 tétrades. En outre, tous ces tests présentent un inconvénient majeur : ils nécessitent une longue et fastidieuse période d'observation et de comptage des cellules. Le test *Tradescantia*-mutations nécessite moins de temps puisque l'observation des cellules est très rapide mais la période d'éclosion des fleurs est assez longue (environ 2 semaines), ce qui revient à peu près à la même durée globale de l'essai (correspondant au temps entre le début de l'exposition et la fin de la lecture des lames) que dans le cas des micronoyaux. Le test des comètes, en revanche, peut être réalisé en une journée en prenant en compte la durée d'exposition et la période d'acquisition des données si l'on possède un système d'analyse d'images.

Le protocole du test des comètes est cependant assez délicat et nécessite d'être adapté à chaque organisme et type cellulaire. Etant donné le faible nombre de publications relatives à ce test dans le cas des végétaux, il est évident que le protocole doit être encore amélioré avant de pouvoir être clairement défini. En revanche, le protocole des autres tests est validé et des publications décrivent en détail le protocole à suivre. Il faut d'ailleurs noter que le test *Vicia*-micronoyaux a récemment fait l'objet d'une proposition de norme à l'AFNOR (AFNOR, 1998).

Enfin, le test des comètes étant très récent, puisque la première publication date de 1988, il ne bénéficie pas encore d'un grand nombre de publications dans le domaine de l'écotoxicologie, et en particulier dans le cas des espèces végétales. Par contre, le test des micronoyaux est de plus en

davantage utilisé sur *Vicia* et *Allium* aux dépens du test des aberrations chromosomiques plus difficile et plus long. Quant aux tests sur *Tradescantia*, ils ont fait leur preuve depuis de nombreuses années dans tous les domaines d'application (cf. analyse bibliographique).

Outre les difficultés déjà évoquées ci-dessus, il convient de signaler un certain nombre de difficultés pratiques ou techniques :

a) nous avons constaté que les réponses pour les tests *Vicia/Allium*-MCN se manifestaient sur un domaine de concentrations relativement étroit, ce qui nécessite donc de faire une gamme d'essais relativement resserrée pour pouvoir détecter des effets génotoxiques.

b) les facteurs d'induction (rapport entre le nombre maximal de micronoyaux et le nombre de micronoyaux du témoin) sont pour les matrices testées généralement faibles, de l'ordre de 3 à 4, alors que pour les substances pures, ces facteurs d'induction peuvent atteindre 300 (cf. hydrazide maléique). Il convient donc d'être particulièrement rigoureux dans la lecture des lames mais aussi dans l'interprétation statistique.

d) l'indice mitotique n'explique pas toujours la diminution de la génotoxicité pour les plus fortes concentrations testées, alors que ce critère aurait dû être un indicateur de la cytotoxicité et aurait dû diminuer en même temps que le nombre de micronoyaux observables dans les cellules, ce qui n'a pas toujours été le cas. D'autres expérimentations doivent être menées pour mieux comprendre le lien entre l'aspect génotoxique et l'aspect toxique (élongation racinaire et indice mitotique).

c) l'exploitation statistique des données n'a été en partie résolue que très récemment, ce qui explique que nous n'avons pas pu exploiter complètement les données faute de logiciel adéquat ou de temps. Il faut toutefois signaler que des essais de modélisation ont été tentés, mais que ces résultats n'ont pas été présentés dans ce travail.

En définitive, ce travail a montré qu'en terme de phytogénotoxicité, il semblait suffisant d'utiliser *Vicia* pour ce qui concerne les micronoyaux, sachant que pour le test des comètes, l'utilisation de *Vicia* ou d'*Allium* semble là nécessaire.

Pour la phytotoxicité, aucune des deux espèces ne paraît plus sensible.

Enfin, nous pouvons **comparer nos résultats à ceux obtenus par d'autres équipes** dans le cadre des deux programmes ADEME auxquels nous avons participé.

a) Tout d'abord, d'autres essais de génotoxicité ont été réalisés à l'INERIS par Mademoiselle Chrystille Guérin avec l'orge (*Hordeum vulgare* L.), mais uniquement en phase solide avec du sable de Fontainebleau comme matrice de dilution. Nous pouvons donc comparer ces résultats (Tableau LVIII) avec le mode d'exposition (sol + sable).

Sols	Vicia-MCN	Allium-MCN	Hordeum-MCN
SI	0,3	0,3	35
SII	2,5	2,5	3,9
SIII	0,3	0,3	1,8
SIV	100	100	29

Tableau LVIII : LOEC (en %) des résultats des tests réalisés sur les quatre sols en phase solide

Nous constatons dans 3 cas sur 4, les tests *Vicia/Allium* apparaissent plus sensibles que le test *Hordeum*, alors que pour le sol SIV, ce n'est pas le cas. Cela démontre l'intérêt de cette approche intégrant diverses espèces végétales.

Les différences interspécifiques observées peuvent être dues à des différences de pénétration dont certaines ont déjà été évoquées (obstruction des canaux dans le cas des tiges de *Tradescantia*) mais aussi à des différences de composition en subérines, en groupements époxydes et hydroxyles. Divers facteurs physiologiques sont également susceptibles d'agir : enzymes intervenant dans les différentes étapes de métabolisation et de réparation, agents anti-oxydants, présence de métaux endogènes (Vangronsveld et al., 1997). Enfin, de nombreux facteurs physiques peuvent influencer sur l'absorption des micropolluants par les plantes et leur rôle peut varier selon par les espèces, il s'agit par exemple du pH des matrices, des conditions expérimentales (température, humidité, etc...) (Morel, 1997).

b) D'autres essais de génotoxicité ont été réalisés soit par l'équipe de Paule Vasseur (Ames et Mutatox), soit par Corinne Békaert à Toulouse (xénope-micronoyaux) sur les sols SIII et SIV ainsi que sur les boues B1 et B3.

Il faut remarquer que les essais Mutatox que nous avons effectués fournissent des résultats positifs mais différents de ceux réalisés par l'équipe de Paule Vasseur : 100% au lieu de 12% pour le sol SIII ; 100% au lieu de 3 - 37% pour le sol SIV. Cette différence est vraisemblablement due au fait que dans notre cas les lixiviats ont été réalisés non pas avec de l'eau déminéralisée mais avec du milieu de Hoagland. Il faut aussi invoquer l'effet du temps puisque les analyses n'ont pas été réalisées au même moment.

Nous constatons que dans le cas du sol SIII, les tests sur plantes sont de loin les outils les plus sensibles, alors que ce n'est pas le cas pour SIV, ni pour les boues B1 et B3. Ces constatations confirment une fois de plus l'intérêt d'une approche impliquant différents tests de toxicité et de génotoxicité dans l'évaluation des effets des matrices complexes.

En ce qui concerne le mode d'exposition des plantes aux matrices complexes, nous avons globalement mis en évidence une bonne corrélation entre les résultats obtenus avec le mode direct (sol + sable) et ceux obtenus avec le mode intermédiaire (sol + milieu de Hoagland). Cependant, le mode direct permet de détecter un effet génotoxique dans tous les cas, alors que le mode intermédiaire ne permet de le détecter que dans 6 cas sur 8. Nous pouvons en conclure que le mode direct peut être utilisé pour caractériser efficacement la génotoxicité de matrices complexes. Toutefois, même si ce mode d'exposition présente l'avantage d'être « réaliste », c'est-à-dire représentatif de la façon dont les plantes supérieures sont exposées aux sols potentiellement contaminés *in situ*, le mode indirect (lixiviation) n'en demeure pas moins un mode d'exposition qui est plus rapide et très sensible si l'on tient compte du facteur de dilution de 10.

Les perspectives de ce travail sont nombreuses :

Le protocole du test des comètes nécessite encore des améliorations, notamment pour tenter d'isoler des cellules et non pas des noyaux (techniques d'obtention de protoplastes), pour améliorer le traitement statistique des données de façon à mieux corrélérer les résultats de ces essais à ceux des tests des micronoyaux sur plantes. Les expérimentations réalisées sur les sols SI et SII ne nous ont pas permis d'étudier les effets relatifs de chacune des substances des matrices testées, ni les interactions susceptibles de se produire, ce qui est envisageable avec des tests rapides et précoces comme le test des comètes (voire le test Mutatox). La recherche systématique dans la littérature d'informations pertinentes sur les corrélations qui peuvent exister entre le test des comètes et le test des micronoyaux dans le domaine plus général de la toxicologie génétique sur organismes animaux devrait nous y aider (études de sensibilité et de spécificité).

Il serait également intéressant d'étudier la sensibilité du test des comètes appliqué aux cellules de pollen de *Tradescantia* afin de la comparer à celle des cellules racinaires des espèces végétales utilisées. En outre, des cellules germinales présentent davantage d'intérêts que des cellules somatiques dans l'évaluation des risques génotoxiques au niveau de la population.

Le test Vicia-micronoyaux semble extrêmement intéressant pour l'évaluation de la qualité des sols, il serait pertinent de poursuivre la normalisation au niveau national par l'AFNOR, puis au niveau international par l'ISO. Dans un second temps, nous tenterons de le valider par des expérimentations *in situ*.

Enfin, l'étude des activités de certaines enzymes du stress oxydant ou d'autres mécanismes de défense mériterait d'être réalisée afin de mieux comprendre le mode d'action des composés génotoxiques.

Références Bibliographiques

- AFNOR (1998) Projet de norme « Test *Vicia*-micronoyaux », T 95 E doc 71.
- Ahmed M, Grant WF (1972a) Cytological effects of the pesticides phosdrin and bladex on *Tradescantia* and *Vicia faba*. *Can.J.Genet.Cytol.* **14**:157-165
- Ahmed M, Grant WF (1972b) Cytological effects of the mercurial fungicide panogen 15 on *Tradescantia* and *Vicia faba* root tips. *Mutation Research* **14** : 391-396
- Al-Sabti K (1989) *Allium* test for air and water borne pollution control. *Cytobios* **58**:71-78
- Asada K. (1992) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts, dans « Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems », Scandalios,J.G. (Ed.), CSHL Press.
- Altamiranolozano M, Alvarezbarrera L, Basurtoalcantara F, Valverde M, Rojas E (1996) Reprotoxic and genotoxic studies of vanadium pentoxide in male mice. *Teratogenesis Carcinog.Mutagen.* **16**:7-17
- Amer SH, Ali EM (1974) Cytological effects of pesticides V. Effects of some herbicides on *Vicia faba*. *Cytologia* **39**:633-643
- Anderson D, Plewa MJ (1998) The International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* **13**:67-73
- Arora OP, Shah VC, Rao SRV (1969) Studies on micronuclei induced by mitomycin-C in the root cells of *Vicia faba*. *Experimental Cell Research* **56**:443-448
- Asada K. (1992) Production and scavenging of active oxygen in chloroplasts, dans « Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems », Scandalios,J.G. (Ed.), CSHL Press.
- A.S.T.M. (1994) Standard practice for conducting early seedling growth tests, E 1598 - 94
- Baranczewski P, Nehls P, Rieger R, Pich U, Rajewsky MF, Schubert I (1997) Formation and repair of O-6-methylguanine in recombination hot spots of plant chromosomes. *Environ.Mol.Mutagen.* **29**:394-399
- Baud-Grasset S, Baud-Grasset F, Bifulco JM, Meier JR, Ma TH (1993) Reduction of genotoxicity of a creosote-contaminated soil after fungal treatment determined by the *Tradescantia*-micronucleus test. *Mutation Research* **303**:77-82
- Békaert C., Marty J., Pfohl-Leszkowicz,A., Gauthier L., Ferrier V. (1998) Study of a contaminated site using EROD, DNA adducts and micronuclei in *Xenopus laevis*, communication orale « 8th Annual Meeting of SETAC-Europe », 14-18 Avril 1998, Bordeaux, France.
- Belpaeme K, Cooreman K, Kirsch-Volders M (1998) Development and validation of the in vivo alkaline comet assay for detecting genomic damage in marine flatfish. *Mutat.Res.-Genet.Toxicol.E.M.* **415**:167-184
- Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, Kirsch-Volders M (1996a) Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis* **11**:485-492

- Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, Kirsch-Volders M (1996b) PCBs do not induce DNA breakage *in vitro* in human lymphocytes. *Mutagenesis* **11**:383-389
- Betti C, Nigro M (1996) The Comet assay for the evaluation of the genetic hazard of pollutants in cetaceans: preliminary results on the genotoxic effects of methyl-mercury on the bottle-nosed dolphin (*Tursiops truncatus*) lymphocytes *in vitro*. *Mar.Pollut.Bull.* **32**:545-548
- Bispo A (1998) Contribution à l'élaboration d'une méthodologie pour évaluer les dangers liés aux matériaux solides contaminés. Rapport de thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Borboa L, Delatorre C (1996) The genotoxicity of Zn(II) and Cd(II) in *Allium cepa* root meristematic cells. *New Phytol.* **134**:481-486
- Butt SK, Vahidy AA (1994) Cytotoxic effects of herbicide Ronstar on meristematic cells of *Allium cepa* L. *Pakistan.J.Bot.* **26**:69-74
- Byl TD, Sutton HD, Klaine SJ (1994) Evaluation of peroxidase as a biochemical indicator of toxic chemical exposure in the aquatic plant *Hydrilla verticillata*, Royle. *Environ.Toxicol.Chem.* **13**:509-515
- Cabrera G, Rodriguez G, Perez A (1997a) Genotoxicity of soil irrigated with wastewater using three bioassays « 7th International Conference on Environmental Mutagens », 7-12 Sept 97, Toulouse.
- Cabrera G, Rodriguez G, Guerrero G, Maruri B (1997b) Genotoxicity of compost prepared from organic and domestic garbage using three bioassays « 7th International Conference on Environmental Mutagens », 7-12 Sept 97, Toulouse.
- Cabrera G, Rodriguez G, Guerrero G, Perez A (1997c) Genotoxicity of leachates from a landfill using three bioassays « 7th International Conference on Environmental Mutagens », 7-12 Sept 97, Toulouse.
- Calabrese EJ, Baldwin LA (1997) A quantitatively-based methodology for the evaluation of chemical hormesis. *Hum.Ecol.Risk.Assessment.* **3**:545-554
- Cebulska-Wasilewska A (1992) *Tradescantia* stamen-hair mutation bioassay on the mutagenicity of radioisotope-contaminated air following the Chernobyl nuclear accident and one year later. *Mutation Research* **270**:23-29
- Cerda H, Hofsten BV, Johanson KJ (1993) Identification of irradiated food by microelectrophoresis of DNA from single cells. In: Recent advances of new methods of detection of irradiated food. Proceedings of the workshop, Ancona, 24-26 September 1991. Luxembourg: Commission of the European Communities, EUR-14315, edited by Leonardi M, Belliardo JJ, Raffi JJ. pp 401-405
- Chen YM, Lucas PW, Wellburn AR (1991) Relationship between foliar injury and changes in antioxidant levels in red and Norway spruce exposed to acidic mists. *Environmental Pollution* **69**:1-15
- Chetia M, Mahanta J, Sharma SK (1996) Toxic effect of tender and fermented ripe betel nuts on root growth and root tip cells of *Allium cepa*. *J.Environ.Biol.* **17**:251-256

- Chroust K, Kuglik P, Relichova J, Holoubek I, Caslavsky J, Veselska R, Ryskova M, Benedik J (1997) *Drosophila melanogaster*, *Vicia faba* and *Arabidopsis thaliana* short-term bioassays in genotoxicity evaluation of air and soil samples from sites surrounding two industrial factories in the Czech Republic. *Folia Biologica* **43**:71-78
- Clements C, Ralph S, Petras M (1997) Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (comet) assay. *Environ.Mol.Mutagen.* **29**:277-288
- Clive D, Spector JFS (1978) Comparative chemical mutagenesis: an overview. In : Proceedings of comparative chemical mutagenesis workshop, De Serres F.J. (Eds.), National Institute for Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
- Conger AD, Fairchild LM (1953) A quick-freeze method for making smear slides permanent. *Stain Technology* **28**(6):281-283
- Constantin MJ, Nilan RA (1982) Chromosome aberration assays in barley (*Hordeum vulgare*) - A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* **99**:13-36
- Constantin MJ, Owens ET (1982) Introduction and perspectives of plant genetic and cytogenetic assays. *Mutation Research* **99**:1-12
- Cortés F, Andersson HC (1987) Analysis of SCEs in *Vicia faba* chromosomes by a simple fluorescent plus Giemsa technique. *Hereditas* **107**:7-13
- Cortés F, Rodriguez-Higueras JM, Escalza P (1985) Different cytotoxic effects induced by maleic hydrazide in root meristem cells. *Environ.Exp.Bot.* **25**:183-188
- Cossu C, Doyotte A, Jacquin MC, Vasseur P (1997) Mécanismes de formation et effets des espèces réactives de l'oxygène, dans « Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux », Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (Eds), Masson, Paris.
- Cotelle S, Radetski C, Féraud JF, Babut M (1995) Revue bibliographique sur les tests de phytotoxicité, dans les actes du colloque « Ecotoxicology of Air Compartment », 13-15 Sept. 95, Rouen, France, pp. 157-163.
- Cotelle S, Masfaraud JF, Féraud JF (1996) Sensitive techniques for detecting genotoxic effects in plants, «4th European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety», 25-28 Août 96, Metz, France
- Cotelle S, Masfaraud JF, Féraud JF (1999) Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutation Research* **426**:167-171.
- Darlington CD, McLEISH J, (1951) Action of maleic hydrazide on the cell. *Nature* **167**:407-408
- Dash S, Panda KK, Panda BB (1988) Biomonitoring of low levels of mercurial derivatives in water and soil by *Allium* micronucleus assay. *Mutation Research* **203**:11-21
- De Boeck M, Kirsch-Volders M (1997) *Nereis virens* (Annelida: Polychaeta) is not an adequate sentinel species to assess the genotoxic risk (Comet assay) of PAH exposure to the environment. *Environ.Mol.Mutagen.* **30**:82-90

- De Flora S, Vigano L, D'Agostini F, Camoirano A, Bagnasco M, Bennicelli C, Melodia F, Arillo A (1993) Multiple genotoxicity biomarkers in fish exposed in situ to polluted river water. *Mutation Research* **319**:167-177
- De Kergommeaux DJ, Grant WF, Sandhu SS (1983) Clastogenic and physiological response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba* in vivo root tip assay system. *Mutation Research* **124**:69-84
- De Marco A, Boccardi P, De Simone C, Piccolo A, Raglione M, Testa A, Trinca S (1990) Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated in different soils with the herbicide alachlor. *Mutation Research* **241**:1-6
- De Marco A, De Simone C (1994) The influence of humic substances in seeding soil on the genotoxic effects induced in *Vicia faba* by the herbicide maleic hydrazide. *Fresen. Environ. Bull.* **3**:6-11
- De Marco A, De Simone C, Raglione M, Lorenzoni P (1995) Influence of soil characteristics on the clastogenic activity of maleic hydrazide in root tips of *Vicia faba*. *Mutat. Res-Genetic Toxicology* **344**:5-12
- De Marco A, Paglialunga S, Rizzoni M, Testa A, Trinca S (1988) Induction of micronuclei in *Vicia faba* root tips treated with heavy metals (cadmium and chromium) in the presence of NTA. *Mutation Research* **206**:311-315
- De Marco A, Romanelli M, Stazi MA, Vitagliano E (1986) Induction of micronucleated cells in *Vicia faba* and *Allium cepa* root tips treated with nitrilotriacetic acid (NTA). *Mutation Research* **171**:145-148
- De Simone C, Piccolo A, De Marco A (1992) Genotoxic effect induced by herbicides atrazine glyphosate in plants of *Vicia faba* grown in different soils. *Sci. Total Envir.* **123/124**:233-240
- De Simone C, Piccolo A, De Marco A (1994) Evaluation of genotoxic effects induced by herbicide maleic hydrazide in *Vicia faba* root tips, regarding the different organic matter content of the sowing soils. In: Humic substances in the global environment and implications on human health, edited by Senesi N, Miano TM, Elsevier Science Publishers, pp 1113-1118
- De Simone C, Piccolo A, De Marco A, Rinaldi C (1995) Antimutagenic activity of soil humic extracts on *Vicia faba*. *Fresen. Environ. Bull.* **4**:725-730
- Degrassi F, Rizzoni M (1982) Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in freshwater pollution. *Mutation Research* **97**:19-33
- Devaux A, Flammarion P, Bernardon V, Garric J, Monod G (1998) Monitoring of the chemical pollution of the river Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*). *Mar. Environ. Res* **46**:257-262
- Devaux A, Pesonen M, Monod G (1997) Alkaline comet assay in rainbow trout hepatocytes. *Toxicol. In Vitro* **11**:71-71
- Deventer K (1996) Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**:911-918

- Dryanovska OA (1987) *Tradescantia paludosa* as a plant test system for mutagenicity of lead ions. *Comptes Rendus de l'Académie bulgare des Sciences* **40**:113-116
- Duc G (1997) Faba bean (*Vicia faba* L). *Field.Crop Res.* **53**:99-109
- Durst F. (1991) Métabolisation des herbicides. In « Les herbicides », Scalla R. Ed. Edition INRA.
- Ennever FK, Andreano G, Rosenkranz HS (1988) The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. *Mutation Research* **205**:99-105
- Erbes M, Wessler A, Obst U, Wild A (1997) Detection of primary DNA damage in *Chlamydomonas reinhardtii* by means of modified microgel electrophoresis. *Environ.Mol.Mutagen.* **30**:448-458
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research-Reviews in Genetic Toxicology* **339**:37-59
- Falisticco E, Monarca S, Zanardini A, Zerbini I (1997) Enhancement of micronuclei frequency in the *Tradescantia*/micronuclei test using a long recovery time. « 7th International Conference on Environmental Mutagens », 7-12 Sept 97, Toulouse.
- Fenech M (1997) The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutation Research* **392**:11-18
- Ferrari B (1999) Étude de divers critères écotoxiques permettant de définir l'écocompatibilité de déchets (MIOM, REFIOM et scories) dans l'environnement. Rapport de thèse de l'Université de Metz.
- Ferrari B, Féraud JF (1999) Ecotoxicologie des déchets : comment tester l'homogénéité ou l'hétérogénéité d'un prélèvement de déchet à l'aide de 2 tests d'écotoxicité ? Communication affichée, Waste Stabilization and Environment 99, 13-16 avril, Lyon Villeurbanne, France
- Ferrari B, Radetski CM, Veber AM, Féraud JF (1999) Ecotoxicological assessment of solid wastes : a combined liquid- and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**:1195-1202.
- Fiskesjö G (1985) *Allium* test on river water from Braan and Saxan before and after closure of a chemical factory. *AMBIO* **14**:99-103
- Fiskesjö G (1988) The *Allium* test - an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutation Research* **197**:243-260
- Fiskesjö G (1993a) *Allium* test I: A 2-3 day plant test for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.). *Environmental Toxicology and Water Quality* **8**:461-470
- Fiskesjö G (1993b) The *Allium* test. A potential standard for the assessment of environmental toxicity. In: *Environmental Toxicology and Risk Assessment*, edited by Gorsuch JW, Dwyer FJ, Ingersoll CG, La Point TW. ASTM STP 1216, Philadelphia, pp 331-345
- Fiskesjö G (1993c) The *Allium* test in wastewater monitoring. *Environmental Toxicology and Water Quality* **8**:291-298

- Fiskesjö G (1994) *Allium* test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicology and Water Quality* **9**:235-241
- Fiskesjö G (1995) *Allium* Test. In: *In vitro* toxicity testing protocols, edited by O'Hare S, Atterwill CK. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp 119-127
- Fiskesjö G (1997) *Allium* test for screening chemicals; evaluation of cytological parameters. Dans « *Plants for Environmental Studies* », édité par Wang W, Gorsuch JW, Hughes JS. Lewis Publishers, New York, pp 307-333
- Gerster JL, Grant WF (1989) A cytogenetic study of factors affecting sister chromatid differentiation in *Vicia faba* and *Hordeum vulgare*. *Cytologia* **54**:523-537
- Gichner T, Badayev SA, Demchenko SI, Relichova J, Sandhu SS, Usmanov PD, Usmanova O, Veleminsky J (1994) *Arabidopsis* assay for mutagenicity. *Mutation Research* **310**:249-256
- Gichner T, Plewa MJ (1998) Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutat.Res.-Fundam.Mol.Mech.Mut.* **401**:143-152
- Gichner T, Veleminsky J, Pokorny V (1982) Somatic mutations induced by maleic hydrazide and its potassium and diethanolamine salts in the *Tradescantia* mutation assay. *Mutation Research* **103**:289-293
- Gill BS, Sandhu SS (1992) Application of the *Tradescantia* micronucleus assay for the genetic evaluation of chemical mixtures in soil and aqueous media. *Mutation Research* **270**:65-69
- Gill BS, Sandhu SS, Backer LC, Casto BC (1991) Application of a plant test system in the identification of potential genetic hazards at chemical waste sites. Dans « *Plants for Toxicity Assessment. 2nd volume* » édité par Gorsuch JW, Lower WR, Lewis MA, Wang W. ASTM STP 1115, Philadelphia, pp 309-317
- Godet F, Vasseur P, Babut M (1993) Essais de génotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'environnement hydrique, *Revue des Sciences de l'Eau*, **6**:285-314.
- Gomez-Arroyo S, Armienta MA, Cortes-Eslava J, Villalobos-Pietrini R (1997) Sister chromatid exchanges in *Vicia faba* induced by arsenic- contaminated drinking water from Zimapan, Hidalgo, Mexico. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **394**:1-7
- Grant WF (1982a) Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox program. *Mutation Research* **99**:273-291
- Grant WF (1982b) Cytogenetic studies of agricultural chemicals in plants. In: *Genetic toxicology: An agricultural perspective*, edited by Fleck RA, Hollaender A. Plenum Press, New York, pp 353-378
- Grant WF (1993) Plants as detectors of atmospheric mutagens. In: *Handbook of hazardous materials*, Anonymous Academic Press, pp 591-609

- Grant WF (1994) The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research* **310**:175-185
- Grant WF, Goldstein LD (1983) Sister chromatid exchange in *Tradescantia* - A first report. *Genetics Society of Canada Bull.* **14**:51-51
- Grant WF, Harney PM (1960) Cytogenetic effects of maleic hydrazide treatment of tomato seed. *Can.J.Genet.Cytol.* **2**:162-174
- Grant WF, Lee HG, Logan DM, Salamone MF (1992) The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutation Research* **270**:53-64
- Grant WF, Salamone MF (1994) Comparative mutagenicity of chemicals selected for test in the International Program on Chemical Safety's collaborative study on plant systems for the detection of environmental mutagens. *Mutation Research* **310**:187-209
- Grant WF, Zinov'eva-Stahevitch AE, Zura KD (1981) Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens. In: Short-term tests for chemical carcinogens, edited by Stich HF, San RHC. Springer-Verlag, New York, pp 200-216
- Green BT, Wiberg CT, Woodruff JL, Miller EW, Poage VL, Childress DM, Feulner JA, Prosch SA, Runkel JA, Wanderscheid RL, Wierma MD, Yang XM, Choe HT, Mercurio SD (1996) Phytotoxicity observed in *Tradescantia* correlates with diesel fuel contamination in soil. *Environ.Exp.Bot.* **36**:313-321
- Grover IS, Malhi PK (1988) Genotoxic effects of some organophosphorus pesticides III. *In vivo* chromosomal aberration bioassay in root meristems of *Allium* and *Hordeum*. *Cytologia* **53**:181-191
- Guangrong C, Bo J, Ming L, Xingguo W (1990) The *Vicia* leaf tip cell-micronucleus bioassay and air pollution monitoring Dans « Plants for Toxicity Assessment » édité par Gorsuch JW, Lower WR, Lewis MA, Wang W. ASTM STP 1115, Philadelphia, pp 170-174
- Guérin C (1999) Essai micronoyau sur cellules méristématiques de pousses et racines d'orge (*Hordeum vulgare* L.) adapté à l'évaluation directe du potentiel génotoxique de sols pollués : mise au point et validation, rapport de thèse de l'Université de Paris 7.
- Gupta RS, Kumar HD (1970) The effect of maleic hydrazide on growth and mutation of a blue-green alga. *Arch.Mikrobiol.* **70**:330-339
- Gustavino B, Vitagliano E, Sottili A, Rizzoni M (1987) A comparison between short-term evolution of micronuclei induced by X-rays and colchicine in root tips of *Vicia faba*. *Mutation Research* **192**:109-119
- Haider T, Knasmüller S, Kundi M, Haider M (1994) Clastogenic effects of radiofrequency radiations on chromosomes of *Tradescantia*. *Mutation Research* **324**:65-68
- He Y, Wetzstein HY, Palevitz BA (1995) The effects of a triazole fungicide, propiconazole, on pollen germination, tube growth and cytoskeletal distribution in *Tradescantia virginiana*. *Sex Plant Reprod.* **8**:210-216

- Heddle JA, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, MacGregor JT, Newell GW, Salamone MF (1983) The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity - A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* **61**:118
- Heindorff K, Rieger R, Veleminsky J, Gichner T (1984) A comparative study of the clastogenicity of maleic hydrazide and some of its putative degradation products. *Mutation Research* **140**:123-126
- Helma C, Kronberg L, Ma TH, Knasmüller S (1995) Genotoxic effects of the chlorinated hydroxyfuranones 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone and 3,4-dichloro-5-hydroxy-2[5H]-furanone in *Tradescantia* micronucleus assays. *Mutat.Res.Lett.* **346**:181-186
- Helma C, Sommer R, Schulte-Hermann R, Knasmüller S (1994) Enhanced clastogenicity of contaminated groundwater following UV irradiation detected by the *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutation Research* **323**:93-98
- Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner G, Windebank S (1998) The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis* **13**:89-94
- Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil, Univ.Calif.Agric.Exp.Stn., Berkeley, CA, Circular No. 347, pp 1-39.
- Hooda PS, McNulty D, Alloway BJ, Aitken MN (1997) Plant availability of heavy metals in soils previously amended with heavy applications of sewage sludge. *J.Sci.Food Agr.* **73**:446-454
- Hopke PK, Plewa MJ, Johnston JB, Weaver D, Wood SG, Larson RA, Hinesly T (1982) Multitechnique screening of Chicago municipal sewage sludge for mutagenic activity. *Environ.Sci.Technol.* **16**:140-147
- Ichikawa S (1992) *Tradescantia* stamen-hair system as an excellent botanical tester of mutagenicity: its responses to ionizing radiations and chemical mutagens, and some synergistic effects found. *Mutation Research* **270**:3-22
- Ichikawa S (1994) Sectoring patterns of spontaneous and radiation-induced somatic pink mutations in the stamen hairs of a temperature-sensitive mutable clone of *Tradescantia*. *Jpn.J.Genet.* **69**:577-591
- Ichikawa S, Ishii C (1991b) Somatic mutation frequencies in the stamen hairs of *Tradescantia* grown in soil samples from the Bikini Island. *Jpn.J.Genet.* **66**:27-40
- Ichikawa S, Ishii C (1991a) Validity of simplified scoring methods of somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs. *Environ.Exp.Bot.* **31**:247-252
- Ichikawa S, Nakano A, Kenmochi M, Yamamoto I, Murai M, Takahashi E, Yamaguchi A, Watanabe K, Tomiyama M, Sugiyama K, Yogo A, Yazaki T, Okumura M, Shima N, Satoh M, Yoshimoto M, Xiao LZ (1996b) Yearly variation of spontaneous somatic mutation frequency in the stamen hairs of *Tradescantia* clone KU 9 grown outdoors, which showed a significant increase after the Chernobyl accident. *Mutat.Res-Fundam.Mol.Mech.Mut.* **349**:249-259
- Ichikawa S, Shima N, Ishii C, Kanai H, Sandakamigawara M, Matsuuraendo C (1996a) Variation of spontaneous somatic mutation frequency in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 02. *Genes Genet.Syst.* **71**:159-165

- Ichikawa S, Shima N, Xiao LZ, Matsuuraendo C, Harada H, Yogo A, Okumura M (1995) Flower production, stamen-hair growth, and spontaneous and induced somatic mutation frequencies in *Tradescantia* cuttings and shoots with roots cultivated with nutrient solutions. *Jpn.J.Genet.* **70**:585-600
- Ichikawa S, Takahashi CS (1978) Somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs exposed to ethyl methanesulfonate. *Environmental and Experimental Botany* **18**:19-25
- Ichikawa S, Yamaguchi A, Okumura M (1993) Synergistic effects of methyl methanesulfonate and X rays in inducing somatic mutations in the stamen hairs of *Tradescantia* clones, KU 27 and BNL 4430. *Jpn.J.Genet.* **68**:277-292
- Ichikawa S, Yamamoto I, Murai M, Watanabe K (1996) Fallout decay simulation experiments with the stamen hairs of stable and mutable *Tradescantia* clones. *Environ.Exp.Bot.* **36**:173-184
- I.S.O. (1994) Qualité du sol - Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - Partie 2 : Effets des substances chimiques sur l'émergence et la croissance des végétaux supérieurs, Projet de norme internationale ISO/DIS 11269 - 2
- Jha AM, Rab SF, Singh AC (1996) Cytotoxic activities of three herbicides in root tip cells of *Vicia faba* L. *J.Environ.Biol.* **17**:211-216
- Jha AM, Singh AC (1994) Clastogenicity of lanthanides - induction of micronuclei in root tips of *Vicia faba*. *Mutation Research* **322**:169-172
- Ji Q, Chen YF (1996) *Vicia faba* root tip micronucleus test on the mutagenicity of water-soluble contents of cigarette smoke. *Mutat.Res-Environ.Mutagen.R.S.* **359**:1-6
- Judy BM, Lower WR, Miles CD, Thomas MW, Krause GF (1990) Chlorophyll fluorescence of a higher plant as an assay for toxicity assessment of soil and water. Dans « Plants for Toxicity Assessment » édité par Wang W, Gorsuch JW, Lower WR, ASTM STP 1091, Philadelphia, pp 308-318
- Kanaya N, Gill BS, Grover IS, Murin A, Osiecka R, Sandhu SS, Andersson HC (1994) *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutation Research* **310**:231-247
- Kaushik GC, Yadav S, Sharma HC (1997) Cytological effect of sugar mill effluent on meristematic cells of *Allium cepa*. *J.Environ.Biol.* **18**:305-311
- Khora SS, Panda KK, Panda BB (1997) Genotoxicity of tetrodotoxin from puffer fish tested in root meristem cells of *Allium cepa* L. *Mutagenesis* **12**:265-269
- Kihlman BA (1975) Root tips of *Vicia faba* for the study of the induction of chromosomal aberrations. *Mutation Research* **31**:401-412
- Kihlman BA, Sturelid S (1978) Effects of caffeine on the frequencies of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges induced by chemical mutagens in root tips of *Vicia faba* . *Hereditas* **88**:35-41
- Kirsch-Volders M. (1997) Towards a validation of the micronucleus test, *Mutation Research*, **392**:1-4.

- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnström G (1996) The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mutat.Res-DNA.Repair* **363**:89-96
- Knasmüller S, Gottmann E, Steinkellner H, Fomin A, Pickl C, Paschke A, Göd R, Kundi M (1998) Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation Research* **420**:37-48
- Knasmüller S, Kim TW, Ma TH (1992) Synergistic effect between tannic acid and X-rays detected by the *Tradescantia*-micronucleus assay. *Mutation Research* **270**:31-37
- Koppen G, Verschaeve L (1996) The alkaline comet test on plant cells: A new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutat.Res-Environ.Mutagen.R.S.* **360**:193-200
- Kovalchuk O, Kovalchuk I, Arkhipov A, Telyuk P, Hohn B, Kovalchuk L (1998) The *Allium cepa* chromosome aberration test reliably measures genotoxicity of soils of inhabited areas in the Ukraine contaminated by the Chernobyl accident. *Mutat.Res.-Genet.Toxicol.E.M.* **415**:47-57
- Kuglik P, Veselska R (1994) The use of a micronucleus test to characterize adaptation of *Vicia faba* root tip cells to gamma-radiation. *Biol.Plant* **36**:215-220
- Kumari TS, Vaidyanath K (1989) Testing of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) using multiple genetic assay systems of plants. *Mutation Research* **226**:235-238
- Kwan K.K., Dutka B.J., Rao S.S., Liu D. (1990) Mutatox test : A new test for monitoring environmental genotoxic agents, *Environmental Pollution*, **65**:323-332.
- Lambolez L, Vasseur P, Féraud JF, Gisbert T (1994) The environmental risks of industrial waste disposal: An experimental approach including acute and chronic toxicity studies, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **28**:317-328.
- Larson RA (1995) Plant defenses against oxidative stress. *Arch.Insect Biochem.Physiol* **29**:175-186
- Laouedj A (1994) La culture cellulaire végétale en écotoxicologie : conception d'un modèle expérimental ; application à la phytotoxicité et la génotoxicité potentielles de xénobiotiques, rapport de thèse de l'Université de Strasbourg.
- Levan A (1938) The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. *Hereditas* **24**:471-486.
- Liu D, Jiang W, Guo L, Hao Y, Lu C, Zhao F (1994a) Effects of nickel sulfate on root growth and nucleoli in root tip cells of *Allium cepa*. *Israel Journal of Plant Sciences* **42**:143-148.
- Liu D, Jiang W, Tong S, Zhai L (1994b) Effects of Mg²⁺ and Co²⁺ on cell division and nucleolar cycle during mitosis in root tip cells of *Allium cepa*. *Israel Journal of Plant Sciences* **42**:235-243.
- Liu D, Jiang W, Wang W, Zhao F, Lu C (1994c) Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. *Environmental Pollution* **86**:1-4
- Liu D, Zhai L, Jiang W, Wang W (1995) Effects of Mg²⁺, Co²⁺, and Hg²⁺ on the nucleus and nucleolus in root tip cells of *Allium cepa*. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* **55**:779-787

- Lower WR, Drobney VK, Aholt BJ, Politte R (1983) Mutagenicity of the environments in the vicinity of an oil refinery and a petrochemical complex. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis* **3**:65-73
- Lower WR, Yanders AF, Marrero TR, Underbrink AG, Drobney VK, Collins MD (1985) Mutagenicity of bottom sediment from a water reservoir. *Environ.Toxicol.Chem.* **4**:13-19
- Ma TH (1967) Thin-layer lactose agar for pollen-tube culture of *Tradescantia* to enhance planar distribution of chromosomes. *Stain Technology* **42**:285-291
- Ma TH (1979a) *Tradescantia* micronuclei (Trad-MCN) test for environmental clastogens. In: *In vitro* toxicity testing of environmental agents, Current and future possibilities. Part A : Survey of test systems, edited by Kolber AR, Wong TK, Grant LD, DeWoskin RS, Hughes TJ. Plenum Press, New-York, pp 191-214
- Ma TH (1979b) Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia* - A promising mutagen test system. *Mutation Research* **64**:307-313
- Ma TH (1981) *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. *Environ.Health Perspect.* **37**:85-90
- Ma TH (1982a) *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis). A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* **99**:293-302
- Ma TH (1982b) *Vicia* cytogenetic tests for environmental mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* **99**:257-271
- Ma TH (1990a) *In situ* monitoring of environmental clastogens using *Tradescantia*-micronucleus bioassay. In: edited by Sandhu SS, et al. Plenum Press, New-York, pp 183-190
- Ma TH (1990b) *Tradescantia*-micronucleus test on clastogens and *in situ* monitoring. *Mutation and the Environment Part E*:83-90
- Ma T.H. (1995) Application of simple and efficient plant bioassays for detection of ecotoxicity, dans les actes du colloque « Ecotoxicology of Air Compartment », 13-15 Sept. 95, Rouen, France, pp. 157-163.
- Ma TH, Anderson VA, Ahmed I (1982b) Environmental clastogens detected by meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. *Environmental Science Research* **25**:141-157
- Ma TH, Anderson VA, Harris MM, Bare JL (1983) *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) test on the genotoxicity of malathion. *Environmental Mutagenesis* **5**:127-137
- Ma TH, Anderson VA, Harris MM, Neas RE, Lee TS (1985) Mutagenicity of drinking water detected by the *Tradescantia* micronucleus test. *Can.J.Genet.Cytol.* **27**:143-150
- Ma TH, Anderson VA, Sandhu SS (1982a) A preliminary study of the clastogenic effects of diesel exhaust fumes using the *Tradescantia* micronucleus bioassay. In: *Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures II*, edited by Waters, Sandhu, Huisingh, Claxton, Nesnow. Plenum Publishing Corporation, pp 351-358

- Ma TH, Cabrera GL, Cebulka-Wasilewska A, Chen R, Loarca F, Vandenberg AL, Salamone MF (1994b) *Tradescantia* stamen hair mutation bioassay. *Mutation Research* **310**:211-220
- Ma TH, Cabrera GL, Chen R, Gill BS, Sandhu SS, Vandenberg AL, Salamone MF (1994a) *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutation Research* **310**:221-230
- Ma TH, Fang T, Ho J, Chen D, Zhou R, Lin G, Dai J, Li J (1982) Extraordinary high micronucleus frequency induced by X-rays in a special clone of *Tradescantia reflexa*. *Mutation Research* **104**:101-103
- Ma TH, Grant WF (1982) The *Tradescantias*. Adventurous plants. *The Herbarist* **48**:36-44
- Ma TH, Harris MM, Anderson VA, Ahmed I, Mohammad K, Bare JL, Lin G (1984) *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutation Research* **138**:157-167
- Ma TH, Isbandi D, Khan H, Tseng YS (1973) Low level of SO₂ enhanced chromatid aberrations in *Tradescantia* pollen tubes and seasonal variation of the aberration rates. *Mutation Research* **21**:93-100
- Ma TH, Khan SH (1976) Pollen mitosis and pollen tube growth inhibition by SO₂ in cultured pollen tubes of *Tradescantia*. *Environmental Research* **12**:144-149
- Ma TH, Kontos GJ, Jr., Anderson VA (1980) Stage sensitivity and dose response of meiotic chromosomes of pollen mother cells of *Tradescantia* to X-rays. *Environ.Exp.Bot.* **20**:169-174
- Ma TH, Sandhu SS, Peng Y, Chen TD, Kim T (1992) Synergistic and antagonistic effects on genotoxicity of chemicals commonly found in hazardous waste sites. *Mutation Research* **270**:71-77
- Ma TH, Snope AJ, Chang TY (1971) Far-red light effect on ultraviolet light induced chromatid aberrations in pollen tubes of *Tradescantia*. *Radiation Botany* **11**:39-43
- Ma TH, Sparrow AH, Schairer LA, Nauman AF (1978) Effect of 1,2-dibromoethane (DBE) on meiotic chromosomes of *Tradescantia*. *Mutation Research* **58**:251-258
- Ma TH, Wolff S (1965) Far-red-induced mitotic delay and the apparent increase of X-ray induced chromatid aberrations in *Tradescantia* microspores. *Radiation Botany* **5**:293-298
- Ma TH, Xu C, Liao S, Mcconnell H, Jeong BS, Won CD (1996) In situ monitoring with the *Tradescantia* bioassays on the genotoxicity of gaseous emissions from a closed landfill site and an incinerator. *Mutat.Res-Environ.Mutagen.R.S.* **359**:39-52
- Ma TH, Xu J, Xia W, Jong X, Sun W, Lin G (1992) Proficiency of the *Tradescantia*-micronucleus image analysis system for scoring micronucleus frequencies and data analysis. *Mutation Research* **270**:39-44
- Ma TH, Xu ZD, Xu CG, Mcconnell H, Rabago EV, Arreola GA, Zhang HG (1995) The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutation Research* **334**:185-195

- Malallah G, Afzal M, Gulshan S, Abraham D, Kurian M, Dharni MSI (1996) *Vicia faba* as a bioindicator of oil pollution. *Environ.Pollut.* **92**:213-217
- Marshall I, Bianchi M (1983) Micronucleus induction in *Vicia faba* roots. *Int.J.Radiat.Biol.* **44**:151-162
- Marshak A (1937) The effects of X-rays on chromosomes in mitosis. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **23**:362-369
- Marzin D (1998) Méthodologie, interprétation et stratégie des tests de mutagénèse «Les essais d'écotoxicité et de cancérogénicité des molécules chimiques», 18-22 Mars 98, Metz, France.
- Masfarau JF, Beaunoir V, Féraud JF, Thybaud E, Pandard P, Perrodin Y (1998) Approche intégrée pour l'évaluation de l'écotoxicité des sols pollués : couplage de tests de comportement à l'eau, de test de biodégradabilité et d'une batterie optimisée de bioessais, Rapport ADEME, 17p.
- Maul A, Féraud JF (1998) Etude comparative des différentes méthodes de traitement des données issues des essais de génotoxicité ayant pour critère d'effets le nombre de micronoyaux (plantes, xénope), rapport ADEME, Université de Metz.
- McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De Méo M, Collins A (1993) The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutation Research* **288**:47-63
- McManus MA (1960) Certain mitotic effects of kinetin, gibberellic acid, indoleacetic acid, and maleic hydrazide on the root of *Allium cepa*. *Nature* **185**:44-45
- Meier JR, Chang LW, Jacobs S, Torsella J, Meckes MC, Smith K (1997) Use of plant and earthworm bioassays to evaluate remediation of soil from a site contaminated with polychlorinated biphenyls. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**:928-938
- Mericle LW, Hazard RM (1980) Stamen hair initiation and development in *Tradescantia*, clone 02. *Environ.Exp.Bot.* **20**:233-241
- Mersch J., Beauvais MN (1997) The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to in situ monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutat.Res.* **393** :141-149
- Minissi S, Lombi E (1997) Heavy metal content and mutagenic activity, evaluated by *Vicia faba* micronucleus test, of Tiber river sediments. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **393**:17-21
- Misra J, Pandey V, Singh N (1994) Effects of some heavy metals on root growth of germinating seeds of *Vicia faba*. *J.Environ.Sci.Health* **A29**:2229-2234
- Mitchelmore CL, Chipman JK (1998) DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat.Res.-Fundam.Mol.Mech.Mut.* **399**:135-147
- Miyamae Y, Iwasaki K, Kinae N, Tsuda S, Murakami M, Tanaka M, Sasaki YF (1997b) Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **393**:107-113

- Miyamae Y, Zaizen K, Ohara K, Mine Y, Sasaki YF (1997a) Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell gel electrophoresis (Comet) assay .1. Relationship between the onset of DNA damage and the characteristics of mutagens. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **393**:99-106
- Moller P, Wallin H, Grunnet N, Risom L, Knudsen LE (1998) DNA damage in isolated rat hepatocytes exposed to C.I. pigment orange 5 and C.I.pigment yellow 12 by the alkaline comet assay. *Teratogenesis Carcinog.Mutagen.* **18**:9-16
- Monarca S, Zanardini A, Feretti D, Resola S, Marchetti R, Manfredi S, Nardi G (1997a) Evaluation of mutagens in contaminated soils using bacterial and plant assays. « 7th International Conference on Environmental Mutagens », 7-12 Sept 97, Toulouse.
- Monarca S, Zanardini A, Biscardi D, Feretti D, De Fusco R, Zerbini I, Nardi G (1997b) Genotoxicity in mineral water stored in polyethylene terephthalate bottles evaluated using plant bioassays. « 7th International Conference on Environmental Mutagens », 7-12 Sept 97, Toulouse.
- Morel JL (1997) Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. In: *Soil Ecotoxicology*, edited by Tarradellas J, Bitton G, Rossel D. CRC Press, New York, pp 141-176
- Musatov SA, Anisimov VN, Andre V, Vigreux C, Godard T, Gauduchon P, Sichel F (1998) Modulatory effects of melatonin on genotoxic response of reference mutagens in the Ames test and the comet assay. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **417**:75-84
- Nacci DE, Cayula S, Jackim E (1996) Detection of DNA damage in individual cells from marine organisms using the single cell gel assay. *Aquatic Toxicology* **35**:197-210
- Nauman CH, Grant WF (1982) Mutagenicity of ethyl methanesulfonate, mitomycin C, and vinyl chloride in the *Tradescantia* test systems. In: *Comparative chemical mutagenesis*, edited by De Serres FJ, Shelby MD. Plenum Publishing Corporation, pp 329-338
- Navarrete MH, Carrera P, Demiguel M, Delatorre C (1997) A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **389**:271-277
- Nielsen MH, Rank J (1994) Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium* test. *Hereditas* **121**:249-254
- Nilan RA (1978) Potential of plant genetic systems for monitoring and screening mutagens. *Environmental Health Perspectives* **27**:181-196
- O.C.D.E. (1984) *Terrestrial plants, growth test, Ligne directrice* 208
- Odeigah PG, Ijimakinwa J, Lawal B, Oyeniyi R (1997a) Genotoxicity screening of leachates from solid industrial wastes evaluated with the *Allium* test. *ATLA-Altern.Lab.Anim.* **25**:311-321
- Odeigah PGC, Nurudeen O, Amund OO (1997b) Genotoxicity of oil field wastewater in Nigeria. *Hereditas.* **126**:161-167
- Östling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and biophysical research communications* **123**:291-298

- Panda BB, Subhadra AV, Panda KK (1995) Prophylaxis of antioxidants against the genotoxicity of methyl mercuric chloride and maleic hydrazide in *Allium micronucleus* assay. *Mutation Research* **343**:75-84
- Panda KK, Lenka M, Panda BB (1989) *Allium*-micronucleus (MNC) assay to assess bioavailability, bioconcentration and genotoxicity of mercury from solid waste deposits of a chloralkali plant, and antagonism of L-cysteine. *Sci.Total Envir.* **79**:25-36
- Panda KK, Lenka M, Panda BB (1990) Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. I. Distribution, availability and genotoxicity of sediment mercury in the Rushikulya estuary, India. *Sci.Total Envir.* **96**:281-296
- Panda KK, Lenka M, Panda BB (1992) Monitoring and assessment of mercury pollution in the vicinity of a chloralkali plant. III. Concentration and genotoxicity of mercury in the industrial effluent and contaminated water of Rushikulya estuary, India. *Mutation Research* **280**:149-160
- Panda KK, Patra J, Panda BB (1996) Induction of sister chromatid exchanges by heavy metal salts in root meristem cells of *Allium cepa* L. *Biol.Plant* **38**:555-561
- Pandrangi R, Petras M, Ralph S, Vrzoc M (1995) Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ.Mol.Mutagen.* **26**:345-356
- Peng Y, Ma TH (1990) *Tradescantia* sister-chromatid-exchange (SCE) bioassay for environmental mutagens. Dans « Plants for Toxicity Assessment » édité par Gorsuch JW, Lower WR, Lewis MA, Wang W. ASTM STP 1115, Philadelphia, pp 319-323
- Plewa MJ (1982) Specific-locus mutation assays in *Zea mays*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* **99**:317-337
- Plewa MJ (1984) Plant genetic assays to evaluate complex environmental mixtures. In: Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures IV, edited by Waters MD, Sandhu SS, Lewtas J, Claxton L, Strauss G, Nesnow S. Plenum Press, New-York, pp 45-64
- Plewa MJ, Wagner ED (1993) Activation of promutagens by green plants. *Annu.Rev.Genet.* **27**:93-113
- Ponnampalam R, Mondy NI, Babish JG (1983) A review of environmental and health risks of maleic hydrazide. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **3**:38-47
- Pool-Zobel BL, Guigas C, Klein R, Neudecker Ch, Renner HW, Schmezer P (1993) Assessment of genotoxic effects by lindane. *Fd Chem.Toxic.* **31**:271-283
- Radetski C (1996) Intérêt de l'utilisation de quelques enzymes du stress oxydant chez les végétaux : relations avec les tests de phytotoxicité et de phytogénotoxicité. Rapport de thèse de l'Université de Metz.
- Ralph S, Petras M (1997) Genotoxicity monitoring of small bodies of water using two species of tadpoles and the alkaline single cell gel (comet) assay. *Environ.Mol.Mutagen.* **29**:418-430
- Ralph S, Petras M, Pandrangi P, Vrzoc M (1996) Alkaline single-cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using two species of tadpoles. *Environ.Mol.Mutagen.* **28**:112-120

- Rank J, Nielsen MH (1997) *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **390**:121-127
- Read J (1959) *Radiation biology of Vicia faba* in relation to the general problem, Blackwell, Oxford.
- Read J, Kihlman BA (1956) Comparison of the effects of 8-ethoxycaffeine and X-rays on the cytology and growth of roots of *Vicia faba*. *Hereditas* **42**:487-507
- Reddy NM, Panda KK, Subhadra AV, Panda BB (1995) The *Allium* micronucleus (MNC) assay may be used to distinguish clastogens from aneugens. *Biol.Zbl.* **114**:358-368
- Rédei GP (1982) Mutagen assay with *Arabidopsis* - A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research* **99**:243-255
- Rether B., Masfaraud J.F., Keith G., Devaux A., Monod G. (1997) Biomarqueurs de génotoxicité chez les végétaux et les animaux, dans « Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux », Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (Eds), Masson, Paris.
- Rieger R., Michaelis A. et Green M; (1968) A glossary of genetics and cytogenetics, 3rd ED., Allen and Unwin, London, pp. 507.
- Rizzoni M, Gustavino B, Ferrari C, Gatti LG, Fano EA (1995) An integrated approach to the assessment of the environmental quality of the Tiber river in the urban area of Rome: A mutagenesis assay (micronucleus test) and an analysis of macrobenthic community structure. *Sci.Total Envir.* **162**:127-137
- Rizzoni M, Vitagliano E, Marconi MC, Sottili A, Gustavino B (1987) Micronucleus induction by low doses of X-rays in *Vicia faba* root tips. *Mutation Research* **176**:205-209
- Rodrigues GS, Ma TH, Pimentel D, Weinstein LH (1997) *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: A review. *Crit.Rev.Plant Sci.* **16**:325-359
- Rodrigues GS, Madkour SA, Weinstein LH (1996) Genotoxic activity of ozone in *Tradescantia*. *Environ.Exp.Bot.* **36**:45-50
- Rodrigues G S, Pimentel D, Weinstein LH (1998) *In situ* assessment of pesticide genotoxicity in an integrated pest management program I - *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **412** :235-244
- Ruiz EF, Rabago VME, Lecona SU, Perez AB, Ma TH (1992) *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. *Mutation Research* **270**:45-51
- Rydberg B, Johanson KJ (1978) Estimation of DNA strand breaks in single mammalian cells. In: DNA repair mechanisms, edited by Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF. Academic Press, New York, pp 465-468

- Sadowska A, Pluygers E, Narkiewicz M, Pawelczak A, Lata B (1994) Environmental genotoxicity and cancer risk in humans: a combined evaluation correlating the results of the *Tradescantia* micronucleus assay in the field and human biomarker assessments in serum. I. The TRAD-MCN assay. *European Journal of Cancer Prevention* **3**:69-78
- Salagovic J, Gilles J, Verschaeve L, Kalina I (1996) The Comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms : a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biologica* **42**:17-21
- Sanda-Kamigawara M, Ichikawa S (1993) Identity of normal and mutant flower-color pigments in four different *Tradescantia* clones confirmed by means of microspectrophotometry. *Jpn.J.Genet.* **68**:137-145
- Sanda-Kamigawara M, Ichikawa S, Watanabe K (1991) Spontaneous, radiation- and EMS-induced somatic pink mutation frequencies in the stamen hairs and petals of a diploid clone of *Tradescantia*, KU 27. *Environmental and Experimental Botany* **31**:413-421
- Sanda-Kamigawara M, Tomiyama M, Ichikawa S (1995) Sectoring patterns of spontaneous and induced somatic pink mutations in the stamen hairs and petals of mutable and stable clones of *Tradescantia*. *Jpn.J.Genet.* **70**:339-353
- Sandermann H, Jr. (1994) Higher plant metabolism of xenobiotics: the "green liver" concept. *Pharmacogenetics* **4**:225-241
- Sandhu SS, Acedo GN (1988) Detection of chemically induced aneuploidy by the *Vicia faba* root tip assay. *Toxicology and Industrial Health* **4**:257-267
- Sandhu SS, De Serres FJ, Gopalan HNB, Grant WF, Svendsgaard D, Veleminsky J, Becking GC (1994) Results and recommendations. *Mutation Research* **310**:257-263
- Sandhu SS, De Serres FJ, Gopalan HNB, Grant WF, Veleminsky J, Becking GC (1991) Status report of the International Programme on Chemical Safety's Collaborative Study on plant test systems. *Mutation Research* **257**:19-25
- Sandhu SS, De Serres FJ, Gopalan HNB, Grant WF, Veleminsky J, Becking GC (1994) An introduction and study design. *Mutation Research* **310**:169-173
- Sandhu SS, Gill BS, Casto BC, Rice JW (1991) Application of *Tradescantia* micronucleus assay for *in situ* evaluation of potential genetic hazards from exposure to chemicals at a wood-preserving site. *Hazardous Waste & Hazardous Materials* **8(3)**:257-262
- Sandhu SS, Ma TH, Peng Y, Zhou X (1989) Clastogenicity evaluation of seven chemicals commonly found at hazardous industrial waste sites. *Mutation Research* **224**:437-445
- Sasaki YF, Tsuda S, Izumiyama F, Nishidate E (1997a) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple- mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **388**:33-44

- Sasaki YF, Izumiyama F, Nishidate E, Ishibashi S, Tsuda S, Matsusaka N, Asano N, Saotome K, Sofuni T, Hayashi M (1997b) Detection of genotoxicity of polluted sea water using shellfish and the alkaline single-cell gel electrophoresis (SCE) assay: a preliminary study. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **393**:133-139
- Savanne (1996) French research programme on methods for investigating the ecotoxicity of contaminated soils and wastes, « 4th European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety », 25-28 Août 1996, Metz, France.
- Sax K (1938) Chromosome aberrations induced by X-rays. *Genetics* **23**:494-516
- Scassellati-Sforzolini G, Pasquini R, Moretti M, Villarini M, Fatigoni C, Dolara P, Monarca S, Caderni G, Kuchenmeister F, Schmezer P, Pool-Zobel BL (1997) In vivo studies on genotoxicity of pure and commercial linuron. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **390**:207-221
- Schaeffer DJ, Novak EW, Lower WR, Yanders A, Kapila S, Wang R (1987) Effects of chemical smokes on flora and fauna under field and laboratory exposures. *Ecotoxicol.Environ.Safety* **13**:301-315
- Schairer LA (1979) Mutagenicity of ambient air at selected sites in the United States using *Tradescantia* as a monitor. In: In situ toxicity testing of environmental agents, Current and future possibilities. Part A : Survey of test systems, edited by Kolber AR, Wong TK, Grant LD, DeWoskin RS, Hughes TJ. Plenum Press, New-York, pp 167-190
- Schubert I, Heindorff K (1989) Are SCE frequencies indicative of adaptive response of plant cells ? *Mutation Research* **211**:301-306
- Scott D (1968) The additive effect of X-rays and maleic hydrazide in inducing chromosomal aberrations at different stages of the mitotic cycle in *Vicia faba*. *Mutation Research* **5**:65-92
- Segner H, Braunbeck T (1998) Cellular Response Profile to Chemical Stress, in "Ecotoxicology. Ecological fundamentals, chemical exposure and biological effects", chapitre 17, Schüürmann G. et Markert B. (Eds.), Wiley, New-York.
- Shima N, Ichikawa S (1995) Mutagenic synergism detected between dimethyl sulfate and X-rays but not found between N-methyl-N-nitrosourea and X-rays in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. *Mutat.Res-Fundam.Mol.Mech.Mut.* **331**:79-87
- Shima N, Ichikawa S (1997) Synergistic effects of N-ethyl-N-nitrosourea (an alkylating agent with a low Swain-Scott substrate constant) and X-rays in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. *Environ.Mol.Mutagen.* **29**:323-329
- Shima N, Xiao LZ, Sakuramoto F, Ichikawa S (1997) Young inflorescence-bearing shoots with roots of *Tradescantia* clone BNL 4430 cultivated in nutrient solution circulating systems: an alternative to potted plants and cuttings for mutagenicity tests. *Mutat.Res.-Genet.Toxicol.E.M.* **395**:199-208
- Simao-Beauvoir AM, Masfaraud JF, Féraud JF (1999) Formulated sediment conditioning for testing the influence of organic matter content on the ecotoxicity of HAP-spiked artificial sediment. 17th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds, October 25-29 1999, Bordeaux.

- Singh N, Yunus M, Singh SN, Ahmad KJ (1992) Performance of *Vicia faba* plants in relation to simulated acid rain and/or endosulphan treatment. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* **48**:243-248
- Singh NP, Lai H, Khan A (1995) Ethanol-induced single-strand DNA breaks in rat brain cells. *Mutation Research* **345**:191-196
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* **175**:184-191
- Singh P, Roy BK, Rai S (1996) Morphological and cytogenetic effect of 50 Hz Em-field-induced nutrient solution on *Vicia faba* L. *Electro.Magnetobiol.* **15**:109-118
- Smaka-Kincl V, Stegnar P, Lovka M, Toman MJ (1996) The evaluation of waste, surface and ground water quality using the *Allium* test procedure. *Mutat.Res-Genetic.Toxicology* **368**:171-179
- Smith SS, Lofty T.A. (1954) Comparative effects of certain chemicals on *Tradescantia* chromosomes as observed at pollen tube mitosis, *Amer. J. Bot.*, **41**:589-593.
- Sparrow AH, Schairer LA (1971) Mutational response in *Tradescantia* after accidental exposure to a chemical mutagen. *EMS Newsletter* **5**:16-19
- Sparrow AH, Schairer LA, Villalobos-Pietrini R (1974) Comparison of somatic mutation rates induced in *Tradescantia* by chemical and physical mutagens. *Mutation Research* **26** :265-276
- Sparrow AH, Underbrink AG, Rossi HH (1972) Mutations induced in *Tradescantia* by small doses of X-rays and neutrons: Analysis of dose-response curves. *Science* **176**:916-918
- Steffensen D (1955) Breakage of chromosomes in *Tradescantia* with a calcium deficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **41**:155-160
- Steinert SA (1996) Contribution of apoptosis to observed DNA damage in mussel cells. *Marine Environmental Research* **42**:253-259
- Steinert SA, Streibmontee R, Leather JM, Chadwick DB (1998) DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutat.Res.-Fundam.Mol.Mech.Mut.* **399**:65-85
- Steinitz LM (1944) The effect of lack of oxygen on meiosis in *Tradescantia*. *Amer.J.Bot.*, **31**:428-443.
- Steinkellner H, Mun-Sik K, Helma C, Ecker S, Ma TH, Horak O, Kundi M, Knasmüller S (1998) Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. *Environ.Mol.Mutagen.* **31**:183-191
- Subhadra AV, Panda BB (1992) Modulation of genotoxicity of methyl mercuric chloride through pre-exposure of root meristematic cells to low concentrations of methyl mercuric chloride, maleic hydrazide and hydrogen peroxide in *Allium* MNC assay. *Biol. Zent. bl.* **111**:120-129
- Subhadra AV, Panda KK, Panda BB (1993) Residual mercury in seed of barley (*Hordeum vulgare* L.) confers genotoxic adaptation to ethyl methanesulfonate, maleic hydrazide, methyl mercuric chloride and mercury-contaminated soil. *Mutation Research* **300**:141-149

- Swietlinska Z, Zuk J (1978) Cytotoxic effects of maleic hydrazide. *Mutation Research* **55**:15-30
- Taddei F, Matic I, Radman M (1997) Mutagénèse et adaptation. *Médecine/Sciences* **3**:1-6.
- Takahama U, Oniki T (1997) A peroxidase/phenolics/ascorbate system can scavenge hydrogen peroxide in plant cells. *Physiol.Plant* **101**:845-852
- Tempelaar MJ, de Both MTJ, Versteegh JEG (1982) Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen-staining procedure for *Vicia faba*. *Mutation Research* **103**:321-326
- Thangapandian V, Sophia M, Swaminathan K (1995) Cytological effect of tannery effluents on root meristems of *Allium cepa* Linn test system. *J.Environ.Biol.* **16**:67-70
- Tice RR (1995) The single cell gel /comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: *Environmental Mutagenesis*, edited by Phillipps DH, Venitt S. Bios Scientific Publishers, Oxford, pp 315-339
- Tice RR, Andrews PW, Hirai O, Singh NP (1991) The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **283**:157-164
- Tomkins DJ, Grant WF (1972) Comparative cytological effects of the pesticides menazon, metrobromuron and tetrachloroisophthalonitrile in *Hordeum* and *Tradescantia*. *Can.J.Genet.Cytol.* **14**:245-256
- Underbrink A.G., Schairer L.A., Sparrow A.H. (1973) *Tradescantia* stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. dans « *Chemical Mutagens - Principles and Methods for their Detection* » pp. 171-207. Hollaender A. (Ed.), Plenum Press, New York.
- Van Goethem F, Lison D, Kirsch-Volders M (1997) Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: Genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt tungsten carbide. *Mutat.Res-Genet.Toxicol.E.M.* **392**:31-43
- Vangronsveld J, Mocquot B, Mench M, Clijsters H. (1997) Biomarqueurs du stress oxydant chez les végétaux, dans « *Biomarqueurs en écotoxicologie. Aspects fondamentaux* », Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C. et Ramade F. (Eds), Masson, Paris.
- Van't Hof J., Schairer L.A. (1982) *Tradescantia* assay system for gaseous mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mut.Res.* **99**:303-315.
- Veleminsky J, Gichner T (1988) Mutagenic activity of promutagens in plants: indirect evidence of their activation. *Mutation Research* **197**:221-242
- Verschaeve L, Gilles J (1995) Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bull.Environ.Contam.Toxicol.* **54**:112-119
- Verschaeve L, Gilles J, Schoeters J, Van Cleuvenbergen R, De Fré R (1993) The single cell gel electrophoresis technique or comet test for monitoring dioxin pollution and effects. In: *Organohalogen compounds*, pp 213-216

- Vidal D, Martinez-Guijarro J, Simon E (1995) Chlorophyll fluorescence and photosynthetic O₂ evolution in *Vicia faba* plants treated with methabenzthiazuron. *Photosynthetica* 31:9-20
- Vig BK (1982) Soybean (*Glycine max* L. Merrill) as a short-term assay for study of environmental mutagens, A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, *Mut. Res.* **99**:339-347.
- Villalobos-Pietrini R, Gomez-Arroyo S, Flores-Marquez AR, Cisneros A (1986) *Tradescantia*-micronucleus test on potassium dichromate. *Contam.Ambient.* **2**:63-70
- Villani P, Andreoli C, Crebelli R, Pacchierotti F, Zijno A, Carere A (1998) Analysis of micronuclei and DNA single-strand breaks in mouse splenocytes and peripheral lymphocytes after oral administration of tetramethylthiuram disulfide (thiram). *Food Chem.Toxicol.* **36**:155-164
- Vrzoc M, Petras ML (1997) Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assays in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens. *Mutat.Res-Fundam.Mol.Mech.Mut.* **381**:31-40
- Wang W (1991) Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water,Air,and Soil Pollution* **59**:381-400
- Weissenfels WD, Klewer HJ, Langhoff J (1992) Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: influence on biodegradability and biotoxicity. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* **36**:689-696
- Willekens H, Inze D, Vanmontagu M, Vancamp W (1995) Catalases in plants. *Mol.Breeding* **1**:207-228
- Wilson JT, Pascoe PL, Parry JM, Dixon DR (1998) Evaluation of the comet assay as a method for the detection of DNA damage in the cells of a marine invertebrate, *Mytilus edulis* L. (Mollusca: Pelecypoda). *Mutat.Res.-Fundam.Mol.Mech.Mut.* **399**:87-95
- Wohmann I (1997) Mise au point du test des comètes sur cellules végétales et application à des matrices contaminées, rapport de DEA de l'Université de Metz.
- Xiao LZ, Ichikawa S (1995) Mutagenic interactions between maleic hydrazide and X rays in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. *Jpn.J.Genet.* **70**:473-485
- Xiao LZ, Ichikawa S (1997) Dicentric chromosome bridges in root tips and micronuclei in pollen tetrads induced by X rays and maleic hydrazide in *Tradescantia* clone BNL 4430. *Genes Genet.Syst.* **72**:187-195
- Xu J, Xia W, Jong X, Sun W, Lin G, Ma TH (1990) Image analysis system for rapid data processing in *Tradescantia*-micronucleus bioassay Dans « Plants for Toxicity Assessment » édité par Gorsuch JW, Lower WR, Lewis MA, Wang W. ASTM STP 1115, Philadelphia, pp 346-356
- Yendle JE, Tinwell H, Elliott BM, Ashby J (1997) The genetic toxicity of time: Importance of DNA-unwinding time to the outcome of single-cell gel electrophoresis assays. *Mutat.Res-Fundam.Mol.Mech.Mut.* **375**:125-136

Annexes

ANNEXE A1

REGLES D'ELABORATION DE LA FICHE SIGNALÉTIQUE

<u>ORGANISME</u>	<i>genre, espèce (nom commun) + variété, etc...</i>
Type de producteur primaire	algue macrophyte végétaux terrestres divers (protoplastes/cultures cellulaires/etc...)
Milieu naturel	<i>sont en outre spécifiés le sous-embranchement, la classe et la famille des espèces</i> absent/présent <i>d'après les flores</i> absent (Québec et France)/présent (Québec ou France)/ présent (Québec et France) distribution géographique distribution mésologique (ex.: milieu marin ou dulçaquicole, eaux chaudes ou froides, littoral ou non, milieu oligotrophe → eutrophe)
Contact avec sédiment Importance écologique	oui/non évaluée par l'abondance relative de l'espèce définie par les flores : rare (ou absente)/commune/très commune
Disponibilité Stade de développement	<i>ce paramètre est lié au paramètre "milieu naturel" ; la note la plus élevée est seule prise en compte (si une espèce est rare en France et très commune au Québec, la note correspondra à une espèce très commune)</i> approvisionnement commercial/culture/etc... pour les organismes pluricellulaires : adulte ou inconnu/1 stade immature ou présence de division cellulaire (ex.: graine, graine germée, bulbe, tubercule, jeune plante, bouture, cultures cellulaires)/2 stades (ex.: de la graine à la plante adulte)
Utilisation en agriculture	relatif au niveau d'utilisation de l'organisme en agriculture estimé par la superficie développée en France en 1993, d'après des documents de la Statistique Agricole Annuelle de 1994 : faible (< 3.000 ha = 0,01% de la superficie totale)/moyen (3.000 à 300.000 ha)/élevé (> 300.000 ha = 1% de la superficie totale)
Méthode de culture	relatif au maintien des organismes au laboratoire : graines/ensemencement périodique/bouturage/etc...
Facilité de la culture	relatif à la facilité à maintenir les organismes en culture : simple/moyen/complexe
Fiabilité de la culture Contraintes	problèmes documentés, problèmes appréhendés tout facteur contraignant pour la réalisation du biotest, mais uniquement lié au choix de l'espèce en rapport avec les étapes qui précèdent le test (ex.: nécessité d'une préculture)

MATRICE

matrice utilisée par le laboratoire (air, sédiments,...)

Quantité requise	quantité de sédiment (ou de matrice diverse) nécessaire pour appliquer le protocole
Conservation	conservation de l'échantillon avant le biotest : méthode de conservation, durée de conservation
Préparation	manipulations préalables à l'utilisation <i>de la matrice</i> dans le biotest (ex.: filtration, etc...)
Contraintes	tout facteur contraignant pour la réalisation du biotest, mais uniquement lié au choix de l'espèce en rapport avec la matrice utilisée.

PROTOCOLE

Durée du test	temps de contact entre l'échantillon et les organismes : représentation de la durée d'exposition par rapport au cycle de vie de l'organisme : <10% 10 à 75% >75% durée du recueil des données durée du traitement des données durée totale du test
Conditions physiques	température luminosité photopériode autres
Milieu de dilution	ex : synthétique/milieu récepteur/etc...
Nbre de dilutions	nombre minimal de dilutions
Nbre de réplicats/dilution	nombre de réplicats pour chacune des conditions : (témoin, dilutions,...)
Nbre d'organismes/dilution	nombre d'organismes pour chacune des conditions : (témoin, dilutions,...)
Renouvellement	ex : test statique/semi-statique/avec renouvellement/etc...
Enceintes expérimentales	volume des enceintes expérimentales (en litre)
Niveau d'uniformisation	niveau d'uniformisation du test permettant d'évaluer la fiabilité de la méthode : expérimental (pas de norme, ni de publication)/uniformisé (pas de norme, publication existante)/normalisé (norme d'une instance de normalisation ou de lignes directrices nationales ou internationales)
Manipulations	complexité des manipulations : ex. : simples/complexes
Niveau requis	niveau requis pour la réalisation du biotest
Prix du marché	coût moyen pour une analyse < 2.000F de 2.000 à 4.000F > 4.000F
Amortissement du matériel	amortissement de l'appareillage et du matériel < 20.000F de 20.000 à 100.000F > 100.000F
Coût des cultures	coût pour l'entretien des cultures ex.: < 10 h/mois 10 à 30 h/mois > 30 h/mois
Implantation	description et évaluation quantitative des coûts d'infrastructure surface nécessaire aux cultures et aux tests : ex.: <10 m ² 10 à 20 m ² >20 m ² coûts de location, de chauffage, etc...
Contraintes	tout facteur contraignant pour la réalisation du protocole

MANIFESTATION

Paramètre mesuré	type de réponse biologique mesurée : <i>a) critères de phytotoxicité aiguë : germination, émergence</i> <i>b) critères de phytotoxicité à moyen terme : croissance, élongation racinaire, effets cytotoxiques, activité prolifératrice, index mitotique, etc...</i> <i>c) paramètres biochimiques : cf. détail du système de cotation.</i> <i>d) génotoxicité : mutation, formation de micronoyaux, échange de chromatides sœurs, aberrations chromosomiques, anomalies de la division cellulaire, aneuploïdie, polyploïdie, degré de stérilité,..</i> <i>e) adduits à l'ADN, etc... : cf. détail du système de cotation.</i>
Expression des résultats	ex. : Clx ou 50/CLx ou 50/LOEC/etc...
Critères d'acceptabilité	nombre et nature des critères d'acceptabilité de la méthode permettant d'assurer un bon contrôle de qualité : 0, 1 ou ≥ 2 critères d'acceptabilité relatifs à un témoin négatif et 1 ou plus critères d'acceptabilité relatifs à un témoin positif
Méthode statistique	méthode utilisée pour le traitement des résultats
Variabilité de la réponse	reproductibilité intra-laboratoire : coefficient de variation < 15% 15 à 30% > 30%
Sensibilité reconnue	faible/moyenne/élevée
Toxiques de référence	limites de détection de polluants spécifiques toxiques de référence utilisés : type, nombre, concentration, etc...
Contraintes	tout facteur contraignant pour la réalisation du biotest, mais uniquement lié à la mesure des effets

APPLICATION

Niveau d'utilisation	relatif à son niveau d'utilisation <i>(rare s'il se limite à un laboratoire/</i> <i>occasionnelle dans le cas d'une utilisation dans un ou deux pays/fréquente dans le cas de plus de deux pays)</i>
Application <i>in situ</i>	complexité de l'utilisation du test <i>in situ</i> : contraintes éventuelles.

ANNEXE A2

GRILLE DE COTATION DES TESTS

Critères	Eléments	Cote/élément	Cote/critère				
1) <u>Représentativité</u>	Organisme : distribution Organisme : contact avec sédiment Organisme : importance écologique Organisme : utilisation en agriculture	<table border="1" style="width: 100px; height: 40px;"> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> </table>					23%
2) <u>Sensibilité</u>	Organisme : stade de développement Manifestation : critères de phytotoxicité Manifestation : critères de génotoxicité Protocole : durée de l'exposition	<table border="1" style="width: 100px; height: 40px;"> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> </table>					23%
3) <u>Fiabilité</u>	Protocole : niveau d'uniformisation Coefficient de variation Critères d'acceptabilité Application : niveau d'utilisation	<table border="1" style="width: 100px; height: 40px;"> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> </table>					23%
4) <u>Coûts</u>	Protocole : prix du marché Protocole : amortissement du matériel Protocole : espace de laboratoire Protocole : entretien des organismes	<table border="1" style="width: 100px; height: 40px;"> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> <tr><td> </td></tr> </table>					23%
5) <u>Contraintes</u>	Nombre total de contraintes	<table border="1" style="width: 100px; height: 20px;"> <tr><td> </td></tr> </table>		8%			
<u>Cote finale</u>			/100				

Remarque : dans le cas où il est impossible de coter n critères du fait de l'absence d'informations, on applique la formule suivante :

(Somme des cotes des éléments connus/(4-n)x3) x 23 (ou 8) = cote partielle

DETAIL DU SYSTEME DE COTATION

En caractères gras figurent les modifications réalisées par rapport au document émanant d'Environnement Québec (Dir. des lab.).

En italique figurent les modifications réalisées par rapport au document du 07/11/94

ELEMENT	CARACTERISTIQUE	COTATION
<u>1) Représentativité</u>		
Distribution	- absent (Québec et France)	1
	- présent (Québec ou France)	2
	- présent (Québec et France)	3
Contact sédiment	- non	2
	- oui	3
Importance écologique (biomasse/abondance)	- rare	1
	- commune	2
	- très commune	3
Utilisation en agriculture	- faible	1
	- moyenne	2
	- élevée	3
		Total (23%)
<u>2) Sensibilité</u>		
Stade de développement	- adulte ou inconnu	1
	- 1 stade immature ou présence de division cellulaire	2
	- 2 stades ou plus	3
Critères de phytotoxicité	- germination, émergence	1
	- croissance, élongation racinaire, etc...	2
	- paramètres biochimiques : si plus sensibles que les précédents <i>si pas de comparaison possible avec les autres critères</i>	+ 1 2
		2
Critères de génotoxicité	- mutation, formation de micronoyaux, etc...	2
	- adduits à l'ADN : si plus sensibles que les précédents <i>si pas de comparaison possible avec les autres critères</i>	+ 1 2
		2
		2
Durée de l'exposition	- < 10% du cycle de vie	1
	- 10 à 75% du cycle de vie	2
	- > 75% du cycle de vie	3
		Total (23%)

3) Fiabilité

Niveau d'uniformisation	- expérimental	1
	- uniformisé	2
	- normalisé	3
Coefficient de variation de la carte de contrôle	- > 30%	1
	- de 15 à 30%	2
	- < 15%	3
Critères d'acceptabilité	- aucun	1
	- 1 ou plus	2
	- substance de référence	3
Utilisation	- rare	1
	- occasionnelle	2
	- fréquente	3
		<hr/>
		Total (23%)

4) Coûts

Prix du marché	- > 4.000 F	1
	- 2.000 à 4.000 F	2
	- < 2.000 F	3
Amortissement du matériel	- > 100.000 F	1
	- 20.000 à 100.000 F	2
	- < 20.000 F	3
Espace de laboratoire	- > 20 m ²	1
	- 10 à 20 m ²	2
	- < 10 m ²	3
Cultures	- > 30 h/mois	1
	- 10 à 30 h/mois	2
	- < 10 h/mois	3
		<hr/>
		Total (23%)

5) Contraintes

Nombre total de contraintes	- ≥ 3	1
	- 1 ou 2	2
	- aucune	3
		<hr/>
		Total (8%)

ANNEXE B

Composition du milieu de Hoagland (Hoagland & Arnon, 1950)

produits	référence	solution mère	quantité de la solution mère pour 1 l de milieu	concentration finale
KNO_3	26 869.29, Prolabo	50,5 g/l	10 ml	5 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.02121, Merck	118,0 g/l	10 ml	5 mM
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	M-1880, Sigma	123,2 g/l	10 ml	5 mM
KH_2PO_4	P-5379, Sigma	13,6 g/l	10 ml	1 mM
Tartrate de Fer	F-1013, Sigma	500 mg/l	10 ml	5 mg/l

ANNEXE C

Résultats du sol SI

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm) Mai 96	Elongation racinaire (mm) Mai 98
0	34,3 ± 8,9	15,3 ± 2,6
S0	nd	10,2 ± 2,9 *
0,8	nd	15,1 ± 3,1
1,6	nd	13,8 ± 2,9
3,1	nd	14,1 ± 2,4
6,2	nd	14,7 ± 1,7
12,5	34,3 ± 11,5	7,0 ± 1,9 *
25	32,3 ± 1,9	4,8 ± 1,6 *
50	9,8 ± 2,2 *	3,0 ± 1,1 *
90	6,7 ± 1,5 *	1,0 ± 0,7 *

Tableau C1 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SI (durée d'exposition = 30h)

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm) Mai 96	Elongation racinaire (mm) Mai 98
0	8,7 ± 1,5	15,0 ± 2,6
S0	nd	6,7 ± 2,1 *
0,8	nd	13,7 ± 2,1
1,6	nd	11,7 ± 2,5
3,1	nd	14,0 ± 1,7
6,2	nd	15,0 ± 1,7
12,5	9,3 ± 4,6	10,0 ± 2,6 *
25	9,7 ± 3,0	8,7 ± 2,1 *
50	7,7 ± 3,5	4,3 ± 1,5 *
90	6,7 ± 1,5	0,0 ± 0,0 *

Tableau C2 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SI (durée d'exposition = 30h)

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules)	
	Mai 96	Mai 98
0	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
S0	nd	0,1 ± 0,3
0,4	nd	0,4 ± 0,7
0,8	nd	3,1 ± 1,6 *
1,6	nd	0,3 ± 0,7
3,1	nd	0,1 ± 0,3
6,2	nd	0,0 ± 0,0
12,5	1,0 ± 0,7	0,1 ± 0,3
25	1,1 ± 0,6 *	0,1 ± 0,3
50	2,8 ± 1,4 *	0,0 ± 0,0
90	0,3 ± 0,7	nd
Témoin +	30,4 ± 6,4 *	15,0 ± 4,3 *

Tableau C 3 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SI (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules)	
	Mai 96	Mai 98
0	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,3
S0	nd	0,1 ± 0,3
0,4	nd	0,1 ± 0,3
0,8	nd	0,2 ± 0,4
1,6	nd	0,2 ± 0,4
3,1	nd	2,7 ± 1,0 *
6,2	nd	0,2 ± 0,7
12,5	0,4 ± 0,5	0,1 ± 0,3
25	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
50	3,8 ± 2,0 *	0,0 ± 0,0
90	1,4 ± 1,1 *	nd
Témoin +	26,7 ± 8,3 *	20,5 ± 5,9 *

Tableau C 4 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SI (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Mai 96	Indice mitotique (/100 cellules) Mai 98
0	1,8 ± 0,5	2,9 ± 0,4
S0	nd	2,8 ± 0,4
0,4	nd	3,3 ± 0,4
0,8	nd	3,1 ± 0,4
1,6	nd	2,9 ± 0,5
3,1	nd	3,1 ± 0,3
6,2	nd	2,8 ± 0,4
12,5	3,1 ± 0,6	2,8 ± 0,3
25	3,1 ± 0,5	1,4 ± 0,3 *
50	2,0 ± 0,5	0,0 ± 0,0 *
90	0,1 ± 0,2 *	0,0 ± 0,0 *

Tableau C5 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SI (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Mai 96	Indice mitotique (/100 cellules) Mai 98
0	1,2 ± 0,4	2,9 ± 0,3
S0	nd	2,8 ± 0,4
0,4	nd	2,9 ± 0,4
0,8	nd	2,9 ± 0,3
1,6	nd	2,6 ± 0,6
3,1	nd	2,9 ± 0,3
6,2	nd	3,1 ± 0,6
12,5	0,9 ± 0,4	2,7 ± 0,4
25	2,0 ± 0,8	2,8 ± 0,4
50	0,7 ± 0,4	2,6 ± 0,4
90	1,1 ± 0,4	0,0 ± 0,0 *

Tableau C6 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SI (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Mai 98
0	15,3 ± 2,6
0,3	14,3 ± 2,4
0,6	13,3 ± 3,2
1,25	9,3 ± 3,4 *
2,5	4,4 ± 1,4 *
5	2,9 ± 1,0 *
9	2,2 ± 1,9 *
25	0,3 ± 0,5 *
50	0,0 ± 0,0 *
75	0,0 ± 0,0 *
100	0,0 ± 0,0 *

Tableau C7 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de sol SI mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g milieu de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Mai 98
0	33,3 ± 3,1
S0	12,6 ± 2,0 *
0,1	30,3 ± 2,4
0,3	29,1 ± 2,3
0,6	22,1 ± 0,7 *
1,2	15,5 ± 1,2 *
2,5	4,1 ± 2,5 *
5	0,0 ± 0,0 *
9	0,0 ± 0,0 *
25	0,0 ± 0,0 *

Tableau C8 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de sol SI mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Mai 98
0	15,0 ± 2,6
0,3	14,7 ± 1,5
0,6	15,0 ± 2,6
1,25	13,0 ± 2,6
2,5	7,3 ± 1,5 *
5	4,0 ± 0,0 *
9	1,3 ± 1,1 *
25	0,0 ± 0,0 *
50	0,0 ± 0,0 *
75	0,0 ± 0,0 *
100	0,0 ± 0,0 *

Tableau C9 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de sol SI mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex. : 5% = 5 g de sol qsp 100 g milieu de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Mai 98
0	26,0 ± 3,5
S0	16,0 ± 3,6 *
0,1	23,7 ± 2,3
0,3	20,7 ± 2,1
0,6	20,7 ± 3,5
1,2	16,3 ± 3,2 *
2,5	10,0 ± 1,7 *
5	3,0 ± 0,6 *
9	3,3 ± 0,6 *
25	1,3 ± 0,6 *

Tableau C10 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de sol SI mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Mai 98
0	0,0 ± 0,0
0,3	0,3 ± 0,5
0,6	1,2 ± 0,9 *
1,2	0,8 ± 0,9
2,5	0,2 ± 0,4
5	0,0 ± 0,0
9	0,0 ± 0,0

Tableau C 11 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SI mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)

ex. : 5% = 5 g de sol qsp 100 g milieu de Hoagland

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Mai 98
0	0,0 ± 0,0
S0	0,0 ± 0,0
0,1	0,2 ± 0,4
0,3	2,1 ± 1,0 *
0,6	0,4 ± 0,7
1,2	0,0 ± 0,0
2,5	0,0 ± 0,0

Tableau C 12 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SI mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)

ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Mai 98
0	0,1 ± 0,3
0,3	0,1 ± 0,3
0,6	0,0 ± 0,0
1,2	0,9 ± 1,1
2,5	0,1 ± 0,3
5	0,0 ± 0,0
9	0,0 ± 0,0

Tableau C13 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SI mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)

ex. : 5% = 5 g de sol QSP 100 g milieu de Hoagland

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Mai 98
0	0,0 ± 0,0
S0	0,1 ± 0,3
0,1	0,4 ± 0,7
0,3	1,5 ± 0,9 *
0,6	0,3 ± 0,7
1,2	0,1 ± 0,3
2,5	0,2 ± 0,4

Tableau C 14 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SI mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)

ex.: 5% = 5 g de sol QSP 100 g sable

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Mai 98
0	2,9 ± 0,4
0,3	3,0 ± 0,3
0,6	3,1 ± 0,3
1,2	2,1 ± 0,4 *
2,5	1,5 ± 0,3 *
5	0,0 ± 0,0 *
9	0,0 ± 0,0 *

Tableau C15 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SI mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g milieu de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Mai 98
0	3,4 ± 0,5
S0	3,0 ± 0,6
0,1	2,9 ± 0,3
0,3	3,1 ± 0,3
0,6	3,0 ± 0,3
1,2	2,1 ± 0,6 *
2,5	1,1 ± 0,3 *
5	0,0 ± 0,0 *

Tableau C 16 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SI mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Mai 98
0	2,9 ± 0,3
0,3	2,9 ± 0,3
0,6	3,0 ± 0,4
1,2	2,8 ± 0,3
2,5	1,8 ± 0,2 *
5	0,9 ± 0,3 *
9	0,0 ± 0,0 *

Tableau C17 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SI mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex. : 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil. de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Mai 98
0	2,9 ± 0,3
S0	3,0 ± 0,3
0,1	3,2 ± 0,3
0,3	3,0 ± 0,3
0,6	3,0 ± 0,4
1,2	3,2 ± 0,3
2,5	2,1 ± 0,4 *
5	0,0 ± 0,0 *

Tableau C 18 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SI mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre mutations (/1000 poils staminaux) Mai 98	Nbre poils staminaux observés
0	1,8 ± 0,6	6446
50	2,3 ± 0,3	7181
90	7,4 ± 2,2 *	7072

Tableau C19 :

Moyenne et écart-type du nombre de mutations /1000 poils staminaux dans les étamines de *Tradescantia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SI (durée d'exposition = 30h)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/100 tétrades) Dec 98	Nbre tétrades observées
0	5,1 ± 1,4	1546
6,2	5,0 ± 0,8	1547
12,5	10,6 ± 2,0	1666
25	21,2 ± 2,6 *	1558
50	20,0 ± 7,0 *	1617
90	17,7 ± 1,8 *	1628
Témoin +	19,2 ± 2,5 *	1676

Tableau C20 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /100 tétrades (n=5) dans les cellules de pollen de *Tradescantia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SI

(durée d'exposition = 6h + 24h de récupération)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Moment de la queue des comètes Juil 98
0	90 ± 65
0,2	153 ± 55
0,4	415 ± 173
0,8	525 ± 224
1,6	334 ± 112

Tableau C21 :

Moyenne et écart-type du moment de la queue des comètes dans les racines de *Vicia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SI (n = 50) (durée d'exposition = 4h)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Moment de la queue des comètes Juil 98
0	58 ± 44
0,8	112 ± 130
1,6	117 ± 138
3,1	428 ± 192 *
6,2	400 ± 204 *
12,5	434 ± 257 *

Tableau C22 :

Moyenne et écart-type du moment de la queue des comètes dans les racines d' *Allium* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SI (n = 50) (durée d'exposition = 4h)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

ANNEXE D : sol SII

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm)	
	Juil 96	Juil 98
0	12,0 ± 4,0	15,8 ± 1,8
6,2	8,8 ± 3,8	15,3 ± 2,6
12,5	7,8 ± 2,1	16,7 ± 2,4
25	8,5 ± 2,8	15,8 ± 2,2
50	2,8 ± 1,5 *	8,1 ± 2,3 *
90	3,2 ± 1,9 *	9,0 ± 2,5 *

Tableau D1 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SII (durée d'exposition = 30h).

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm)	
	Juil 96	Juil 98
0	5,0 ± 2,0	13,7 ± 2,1
6,2	3,7 ± 0,6	12,7 ± 3,2
12,5	5,0 ± 1,7	11,7 ± 2,1
25	2,3 ± 0,6	15,3 ± 2,1
50	0,3 ± 0,6 *	11,0 ± 1,0
90	0,7 ± 0,6 *	6,7 ± 1,5 *

Tableau D2 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SII (durée d'exposition = 30h).

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules)	
	Juil 96	Juil 98
0	0,9 ± 0,8	0,1 ± 0,3
6,2	1,1 ± 0,9	0,1 ± 0,3
12,5	3,9 ± 1,9 *	0,1 ± 0,3
25	2,8 ± 0,7 *	1,8 ± 0,9 *
50	1,0 ± 1,0	0,8 ± 0,7
90	0,3 ± 0,5	0,4 ± 0,7
Témoin +	24,0 ± 5,6 *	18,5 ± 5,6 *

Tableau D3 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SII (durée d'exposition = 30h).

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules)	
	Jul 96	Jul 98
0	0,3 ± 0,5	0,0 ± 0,0
6,2	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0,4
12,5	0,2 ± 0,4	0,0 ± 0,0
25	0,4 ± 0,7	0,3 ± 0,5
50	2,3 ± 1,2 *	1,9 ± 1,2 *
90	0,1 ± 0,3	1,3 ± 1,0 *
Témoin +	20,1 ± 6,7 *	15,7 ± 3,6 *

Tableau D4 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SII (durée d'exposition = 30h).

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique (/100 cellules)	
	Jul 96	Jul 98
0	2,9 ± 0,7	3,0 ± 0,4
6,2	2,5 ± 1,1	3,0 ± 0,3
12,5	2,8 ± 0,8	3,1 ± 0,3
25	2,6 ± 0,8	2,9 ± 0,5
50	3,2 ± 0,8	3,0 ± 0,4
90	2,9 ± 0,6	3,0 ± 0,3

Tableau D5 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SII (durée d'exposition = 30h).

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique (/100 cellules)	
	Jul 96	Jul 98
0	2,4 ± 0,7	2,8 ± 0,4
6,2	2,0 ± 0,5	3,0 ± 0,4
12,5	1,8 ± 0,5	2,9 ± 0,4
25	1,7 ± 0,5	3,2 ± 0,4
50	0,4 ± 0,2 *	3,0 ± 0,3
90	0,3 ± 0,3 *	3,0 ± 0,3

Tableau D6 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SII (durée d'exposition = 30h).

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Juil 98
0	12,1 ± 2,2
1,25	12,3 ± 2,6
2,5	12,3 ± 2,6
5	11,9 ± 3,5
9	13,0 ± 2,9
25	12,9 ± 3,1
50	7,4 ± 2,3 *

Tableau D 7 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de sol SII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)

ex. : 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Juil 98
0	22,2 ± 2,3
2,5	20,7 ± 2,0
5	19,8 ± 1,1
9	22,1 ± 0,1
25	21,5 ± 0,6
50	13,5 ± 1,2 *
75	10,3 ± 4,0 *
100	10,9 ± 2,7 *

Tableau D 8

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de sol SII mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)

ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Juil 98
0	11,0 ± 1,7
1,25	11,3 ± 2,5
2,5	11,0 ± 1,7
5	12,0 ± 3,6
9	10,7 ± 1,5
25	10,0 ± 3,5
50	0,7 ± 1,1 *

Tableau D 9 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de sol SII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)

ex. : 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Juil 98
0	10,7 ± 1,5
2,5	11,7 ± 3,8
5	10,3 ± 2,1
9	11,3 ± 2,1
25	7,0 ± 2,0
50	7,0 ± 2,6
75	0,0 ± 0,0 *
100	0,0 ± 0,0 *

Tableau D 10 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de sol SII mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)

ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Juil 98
0	0,1 ± 0,3
1,25	0,1 ± 0,3
2,5	0,2 ± 0,4
5	1,4 ± 0,7 *
9	0,7 ± 0,7
25	0,2 ± 0,4

Tableau D 11 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Juil 98
0	0,1 ± 0,3
1,25	0,2 ± 0,4
2,5	1,7 ± 0,7 *
5	0,4 ± 0,5
9	0,2 ± 0,4
25	0,1 ± 0,3

Tableau D 12 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SII mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Juil 98
0	0,1 ± 0,3
1,25	0,1 ± 0,3
2,5	1,7 ± 0,7 *
5	0,4 ± 0,5
9	0,1 ± 0,3
25	0,1 ± 0,3

Tableau D 13 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Juil 98
0	0,1 ± 0,3
1,25	0,2 ± 0,4
2,5	1,3 ± 0,5 *
5	0,3 ± 0,7
9	0,1 ± 0,3
25	0,1 ± 0,3

Tableau D 14 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SII mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Juil 98
0	3,0 ± 0,4
1,25	3,1 ± 0,3
2,5	3,0 ± 0,3
5	2,9 ± 0,3
9	3,0 ± 0,3
25	3,0 ± 0,4
50	0,0 ± 0,0 *
75	0,0 ± 0,0 *
100	0,0 ± 0,0 *

Tableau D 15 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Juil 98
0	3,0 ± 0,3
1,25	2,9 ± 0,4
2,5	2,9 ± 0,4
5	3,2 ± 0,4
9	3,0 ± 0,4
25	2,9 ± 0,3
50	1,4 ± 0,3 *
75	0,0 ± 0,0 *
100	0,0 ± 0,0 *

Tableau D 16 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SII mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Juil 98
0	2,8 ± 0,4
1,25	3,1 ± 0,3
2,5	3,0 ± 0,2
5	2,9 ± 0,4
9	3,0 ± 0,4
25	2,9 ± 0,4
50	0,0 ± 0,0 *
75	0,0 ± 0,0 *
100	0,0 ± 0,0 *

Tableau D 17 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Juil 98
0	2,7 ± 0,4
1,25	3,1 ± 0,3
2,5	3,0 ± 0,3
5	2,7 ± 0,5
9	2,5 ± 0,4
25	1,6 ± 0,3 *
50	1,6 ± 0,3 *
75	0,0 ± 0,0 *
100	0,0 ± 0,0 *

Tableau D 18 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SII mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre mutations (/1000 poils staminaux) Jul 98	Nbre poils staminaux observés
0	1,6 ± 0,9	6100
50	1,9 ± 0,8	5762
90	2,0 ± 0,6	6012

Tableau D19 :

Moyenne et écart-type du nombre de mutations /1000 poils staminaux dans les étamines de *Tradescantia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SII (durée d'exposition = 30h).

* Effet statistiquement significatif ($p < 0,05$)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/100 tétrades) Dec 98	Nbre tétrades observées
0	5,1 ± 1,4	1546
6,2	4,6 ± 1,3	1545
12,5	8,2 ± 3,0	1606
25	14,2 ± 3,8 *	1663
50	13,8 ± 1,7 *	1692
90	10,9 ± 1,9	1600
Témoin +	19,2 ± 2,5 *	1676

Tableau D20 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /100 tétrades (n=5) dans les cellules de pollen de *Tradescantia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SII (durée d'exposition = 6h + 24h de récupération).

* Effet statistiquement significatif ($p < 0,05$)

Concentration de lixiviat (%)	Moment de la queue des comètes Juil 98
0	67 ± 55
25	112 ± 120
50	58 ± 75
75	454 ± 156
90	451 ± 149

Tableau D21 :

Moyenne et écart-type du moment de la queue des comètes dans les racines de *Vicia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SII (n = 50) (durée d'exposition = 4h)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Moment de la queue des comètes Juil 98
0	100 ± 78
12	90 ± 78
25	382 ± 322
50	426 ± 282
75	458 ± 230
90	501 ± 126

Tableau D22 :

Moyenne et écart-type du moment de la queue des comètes dans les racines d'*Allium* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SII (n = 50) (durée d'exposition = 4h)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

ANNEXE E : sol SIII

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm) Dec 96	Elongation racinaire (mm) Mars 98
0	6,6 ± 2,4	15,7 ± 1,6
0,1	5,7 ± 2,4	nd
0,2	6,4 ± 2,1	nd
0,4	5,9 ± 1,4	nd
0,8	5,3 ± 2,4	15 ± 2,0
1,6	4,8 ± 2,4	16,8 ± 2,2
3,1	5,0 ± 2,6	15,7 ± 3,4
6,2	3,3 ± 2,1 *	15,8 ± 1,7
12,5	2,8 ± 1,3 *	17,1 ± 2,7
25	2,8 ± 1,7 *	15,9 ± 2,5
50	1,4 ± 0,9 *	10,8 ± 2,2 *
75	nd	9,3 ± 2,6 *
90	1,9 ± 1,3 *	6,1 ± 3,0 *

Tableau E1 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SIII (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm) Dec 96	Elongation racinaire (mm) Mars 98
0	14,0 ± 2,6	16,0 ± 2,6
0,1	15,0 ± 2,0	nd
0,2	13,0 ± 2,6	nd
0,4	13,3 ± 1,1	nd
0,8	11,3 ± 1,5	16 ± 1,0
1,6	12,3 ± 0,6	17,7 ± 1,5
3,1	9,0 ± 1,0 *	17,7 ± 0,6
6,2	9,7 ± 1,1 *	15,3 ± 2,5
12,5	7,0 ± 1,0 *	18,0 ± 1,0
25	7,3 ± 0,6 *	17,7 ± 1,5
50	4,3 ± 1,5 *	7,0 ± 2,6 *
75	nd	5,7 ± 1,5 *
90	4,0 ± 1,0 *	5,0 ± 2,0 *

Tableau E2 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SIII (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules)	
	Dec 96	Mars 98
0	0,1 ± 0,3	0,2 ± 0,4
0,2	0,1 ± 0,3	nd
0,4	2,3 ± 1,1 *	0,2 ± 0,4
0,8	7,7 ± 4,3 *	0,1 ± 0,3
1,6	1,6 ± 1,1	0,2 ± 0,4
3,1	0,2 ± 0,4	2,7 ± 1,5 *
6,2	0,1 ± 0,3	1,4 ± 0,9 *
12,5	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,4
25	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4
50	0,2 ± 0,4	0,3 ± 0,5
Témoin +	42,4 ± 5,1 *	27,2 ± 6,2 *

Tableau E3 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SIII (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules)	
	Dec 96	Mars 98
0	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3
0,2	0,1 ± 0,3	nd
0,4	0,2 ± 0,4	0,3 ± 0,5
0,8	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,3
1,6	0,2 ± 0,4	0,3 ± 0,5
3,1	2,1 ± 1,7 *	1,2 ± 0,7 *
6,2	6,2 ± 1,8 *	2,3 ± 1,1 *
12,5	2,4 ± 1,2 *	0,1 ± 0,3
25	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4
50	0,0 ± 0,0	0,3 ± 0,7
Témoin +	42,3 ± 9,1 *	21,8 ± 4,5 *

Tableau E4 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SIII (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Dec 96	Indice mitotique (/100 cellules) Mars 98
0	2,8 ± 0,6	3,1 ± 0,4
0,2	2,9 ± 0,4	nd
0,4	2,5 ± 0,6	3,2 ± 0,4
0,8	2,7 ± 0,6	3,1 ± 0,4
1,6	2,6 ± 0,5	3,3 ± 0,5
3,1	2,5 ± 0,4	3,3 ± 0,4
6,2	2,5 ± 0,8	3,4 ± 0,4
12,5	2,6 ± 0,5	3,4 ± 0,4
25	2,5 ± 0,5	3,4 ± 0,4
50	2,3 ± 0,5	3,6 ± 0,6

Tableau E5 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SIII (durée d'exposition = 30h)

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Dec 96	Indice mitotique (/100 cellules) Mars 98
0	2,3 ± 0,6	2,9 ± 0,6
0,2	2,8 ± 0,7	nd
0,4	2,6 ± 0,6	3,0 ± 0,4
0,8	2,6 ± 0,5	3,2 ± 0,4
1,6	2,5 ± 0,5	3,1 ± 0,3
3,1	2,4 ± 0,5	3,0 ± 0,4
6,2	2,6 ± 0,5	3,1 ± 0,4
12,5	2,6 ± 0,7	3,0 ± 0,4
25	1,5 ± 0,6 *	3,1 ± 0,5
50	0,0 ± 0,0 *	3,0 ± 0,5

Tableau E6 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SIII (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Mars 98
0	15,7 ± 1,6
0,6	14,8 ± 2,4
1,25	15,2 ± 2,9
2,5	15,8 ± 1,5
5	11,6 ± 2,9 *
9	10,7 ± 1,0 *
25	9,6 ± 1,5 *
50	5,3 ± 1,7 *
75	2,6 ± 1,3 *
100	0 ± 0,0 *

Tableau E7 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n=9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Mars 98
0	24,7 ± 2,9
2,5	24,9 ± 0,4
5	27,1 ± 0,7
9	17,0 ± 2,0 *
25	4,6 ± 1,8 *
50	2,4 ± 0,6 *
75	2,1 ± 0,4 *
100	1,7 ± 0,3 *

Tableau E8 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Mars 98
0	16,0 ± 2,6
0,6	15,3 ± 1,1
1,25	15,0 ± 2,0
2,5	15,0 ± 1,7
5	12,0 ± 2,6 *
9	9,0 ± 2,6 *
25	6,3 ± 1,1 *
50	0,3 ± 0,6 *
75	0,0 ± 0,0 *
100	0,0 ± 0,0 *

Tableau E9 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Mars 98
0	22,7 ± 3,5
2,5	22,0 ± 3,6
5	19,3 ± 2,3
9	17,3 ± 2,1
25	12,7 ± 3,5 *
50	8,3 ± 3,2 *
75	7,0 ± 1,7 *
100	1,7 ± 0,6 *

Tableau E10 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Mars 98
0	0,2 ± 0,4
0,1	0,1 ± 0,3
0,3	0,7 ± 0,7
0,6	1,3 ± 1,1 *
1,2	0,2 ± 0,4
2,5	0,1 ± 0,3
5	0,0 ± 0,0
9	0,2 ± 0,7
25	0,4 ± 0,7
50	0,2 ± 0,4

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Mars 98
0	0,1 ± 0,3
0,1	0,1 ± 0,3
0,3	1,4 ± 1,2 *
0,6	0,4 ± 0,7
1,2	0,4 ± 0,5
2,5	0,0 ± 0,0
5	0,1 ± 0,3
9	0,2 ± 0,4

Tableau E11 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g milieu de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Tableau E12 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Mars 98
0	0,1 ± 0,3
0,3	0,1 ± 0,3
0,6	0,1 ± 0,3
1,2	1,0 ± 1,1
2,5	0,1 ± 0,3
5	0,1 ± 0,3
9	0,2 ± 0,7

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Mars 98
0	0,1 ± 0,3
0,1	0,1 ± 0,3
0,3	1,2 ± 0,7 *
0,6	0,4 ± 0,7
1,2	0,7 ± 0,9
2,5	0,2 ± 0,4
5	0,4 ± 0,7
9	0,3 ± 0,5

Tableau E13 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex. : 5% = 5 g de sol qsp 100 g milieu de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Tableau E14 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Mars 98
0	3,1 ± 0,4
0,1	3,1 ± 0,3
0,3	3,1 ± 0,3
0,6	2,9 ± 0,3
1,2	3,0 ± 0,3
2,5	3,2 ± 0,7
5	3,1 ± 0,3
9	3,2 ± 0,4
25	3,0 ± 0,4
50	1,9 ± 0,3 *

Tableau E15 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h) ex.: 5% = 5g de sol qsp 100g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Mars 98
0	3,2 ± 0,4
0,1	3,2 ± 0,3
0,3	3,1 ± 0,4
0,6	3,0 ± 0,3
1,2	3,0 ± 0,3
2,5	3,3 ± 0,4
5	3,2 ± 0,4
9	3,2 ± 0,4
25	1,6 ± 0,5 *

Tableau E16 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours) ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Mars 98
0	2,9 ± 0,6
0,3	3,1 ± 0,4
0,6	3,3 ± 0,4
1,2	3,1 ± 0,5
2,5	1,9 ± 0,3 *
5	1,9 ± 0,3 *
9	1,8 ± 0,3 *

Tableau E17 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h) ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Mars 98
0	3,0 ± 0,3
0,1	3,0 ± 0,3
0,3	3,0 ± 0,4
0,6	3,1 ± 0,3
1,2	3,0 ± 0,3
2,5	2,5 ± 0,3
5	2,6 ± 0,5
9	1,9 ± 0,4 *
25	1,5 ± 0,3 *

Tableau E18 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SIII mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours) ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre mutations (/1000 poils staminaux) Mars 98	Nbre poils staminaux observés
0	3,0 ± 1,5	6082
25	1,7 ± 0,8	6298
50	11,2 ± 2,2 *	6355
90	11,4 ± 5,2 *	5636

Tableau E19 :

Moyenne et écart-type du nombre de mutations /1000 poils staminaux dans les étamines de *Tradescantia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SIII (durée d'exposition = 30h)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/100 tétrades) Dec 98	Nbre tétrades observées
0	5,1 ± 1,4	1546
3,1	3,1 ± 1,3	1529
6,2	4,4 ± 1,5	1544
12,5	5,0 ± 0,7	1548
25	11,2 ± 0,5 *	1602
50	8,2 ± 2,8 *	1590
Témoin +	19,2 ± 2,5 *	1676

Tableau E20 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /100 tétrades (n=5) dans les cellules de pollen de *Tradescantia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SIII (durée d'exposition = 6h + 24h de recuperation)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Moment de la queue des comètes Juil 98
0	53 ± 48
0,8	40 ± 43
1,6	196 ± 112 *
3,1	284 ± 132 *
6,2	251 ± 134 *
12	185 ± 191 *

Tableau E21 :

Moyenne et écart-type du moment de la queue des comètes dans les racines de *Vicia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SIII (n = 50) (durée d'exposition = 4h)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Moment de la queue des comètes Juil 98
0	25 ± 31
3,1	94 ± 88
6,2	64 ± 56
12	244 ± 78
25	266 ± 149

Tableau E22 :

Moyenne et écart-type du moment de la queue des comètes dans les racines d' *Allium* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SIII (n = 50) (durée d'exposition = 4h)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

ANNEXE F : sol SIV

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm) Fev 97	Elongation racinaire (mm) Nov 97
0	12,9 ± 3,1	11,6 ± 2,2
0,4	12,9 ± 4,0	nd
0,8	15,0 ± 3,5	nd
1,6	14,0 ± 4,3	nd
3,1	11,7 ± 3,0	nd
6,2	13,1 ± 3,3	nd
12,5	12,8 ± 3,9	11,3 ± 2,3
25	12,1 ± 2,3	10,1 ± 2,3
50	16,2 ± 3,3	11,0 ± 2,9
90	16,7 ± 3,4	9,2 ± 1,4

Tableau F1 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SIV (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm) Fev 97	Elongation racinaire (mm) Nov 97
0	15,7 ± 4,0	14,3 ± 2,5
0,4	16,0 ± 2,0	nd
0,8	16,3 ± 1,5	nd
1,6	16,7 ± 1,1	nd
3,1	16,3 ± 1,5	nd
6,2	17,3 ± 1,1	nd
12,5	13,0 ± 3,0	15,0 ± 1,0
25	11,3 ± 0,6	13,0 ± 3,6
50	11,7 ± 1,5	12,0 ± 2,6
90	21,3 ± 0,6 *	12,7 ± 1,5

Tableau F2 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SIV (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules)	
	Fev 97	Nov 97
0	0,2 ± 0,4	0,1 ± 0,3
6,2	1,1 ± 0,9	nd
12,5	0,2 ± 0,4	0,2 ± 0,4
25	0,4 ± 0,7	0,2 ± 0,4
50	3,9 ± 1,7 *	0,2 ± 0,4
90	1,8 ± 0,9 *	1,3 ± 1,2 *
Témoin +	32,9 ± 7,1 *	32,5 ± 8,1 *

Tableau F3 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SIV (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules)	
	Fev 97	Nov 97
0	0,1 ± 0,3	0,1 ± 0,3
6,2	0,3 ± 0,5	nd
12,5	0,4 ± 0,7	0,1 ± 0,3
25	0,6 ± 0,7	0,1 ± 0,3
50	2,7 ± 1,0 *	0,1 ± 0,3
90	1,7 ± 1,3 *	1,2 ± 0,7 *
Témoin +	31,2 ± 4,6 *	25,2 ± 5,6 *

Tableau F4 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SIV (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Fev 97	Indice mitotique (/100 cellules) Nov 97
0	3,7 ± 0,7	3,5 ± 0,8
6,2	3,1 ± 0,6	nd
12,5	3,4 ± 0,9	3,2 ± 0,4
25	3,4 ± 0,5	3,3 ± 0,6
50	3,8 ± 0,5	3,5 ± 0,5
90	4,0 ± 0,7	3,3 ± 0,5

Tableau F5 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SIV (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Fev 97	Indice mitotique (/100 cellules) Nov 97
0	3,4 ± 0,5	3 ± 0,5
6,2	2,9 ± 0,5	nd
12,5	2,9 ± 0,4	3,1 ± 0,5
25	3,0 ± 0,5	3,5 ± 0,5
50	2,9 ± 0,3	3,3 ± 0,4
90	3,2 ± 0,5	3,2 ± 0,5

Tableau F6 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de lixiviat du sol SIV (durée d'exposition = 30h).

nd = non déterminé

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Nov 97
0	11,6 ± 2,2
1,25	10,7 ± 1,7
2,5	9,7 ± 2,8
5	9,7 ± 2,0
9	10,4 ± 2,9
25	11,6 ± 2,2
50	9,7 ± 1,7
75	10,7 ± 2,0

Tableau F7 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Nov 97
0	24,3 ± 2,1
9	23,3 ± 3,1
25	25,5 ± 1,6
50	24,4 ± 1,8
75	24,4 ± 1,0
100	31,4 ± 5,9 *

Tableau F8 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 9) de *Vicia faba* exposé à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Nov 97
0	14,3 ± 2,5
1,25	13,0 ± 5,5
2,5	13,3 ± 1,5
5	13,7 ± 3,5
9	15,7 ± 2,5
25	12,7 ± 0,6
50	13,3 ± 0,6
75	12,3 ± 3,2

Tableau F9 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Elongation racinaire (mm) Nov 97
0	18,0 ± 3,6
2,5	19,7 ± 1,5
5	23,3 ± 2,5
9	21,7 ± 3,2
25	21,0 ± 3,0
50	23,3 ± 4,0
75	19,0 ± 1,7
100	21,7 ± 2,1

Tableau F10 :

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (n = 3) d' *Allium cepa* exposé à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Nov 97
0	0,2 ± 0,4
2,5	0,2 ± 0,4
5	0,3 ± 0,5
9	0,2 ± 0,4
25	0,1 ± 0,3
50	0,3 ± 0,5
75	0,4 ± 0,7
100	1,7 ± 0,9 *

Tableau F11 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Nov 97
0	0,4 ± 0,7
2,5	0,2 ± 0,4
5	0,2 ± 0,4
9	0,4 ± 0,7
25	0,1 ± 0,3
50	0,4 ± 0,5
75	0,3 ± 0,5
100	2,0 ± 0,9 *

Tableau F12 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Nov 97
0	0,1 ± 0,3
2,5	0,2 ± 0,4
5	0,2 ± 0,4
9	0,3 ± 0,5
25	0,2 ± 0,4
50	0,4 ± 0,7
75	0,7 ± 0,7
100	1,2 ± 0,7 *

Tableau F13 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Nbre micronoyaux (/1000 cellules) Nov 97
0	0,1 ± 0,3
2,5	0,5 ± 0,9
5	0,1 ± 0,3
9	0,4 ± 0,7
25	0,3 ± 0,7
50	0,1 ± 0,3
75	0,1 ± 0,3
100	1,2 ± 0,3

Tableau F14 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)
ex.: 5% = 5 g de sol QSP 100 g sable
* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Nov 97
0	3,5 ± 0,8
2,5	3,0 ± 0,5
5	3,0 ± 0,5
9	3,2 ± 0,4
25	3,1 ± 0,5
50	2,9 ± 0,3
75	3,2 ± 0,4
100	3,3 ± 0,5

Tableau F15 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
 ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
 * Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Nov 97
0	3,5 ± 0,6
2,5	3,5 ± 0,7
5	3,7 ± 0,4
9	3,6 ± 0,5
25	3,4 ± 0,4
50	3,5 ± 0,6
75	3,4 ± 0,5
100	3,3 ± 0,5

Tableau F16 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du sable (durée d'exposition = 5 jours)
 ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
 * Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Nov 97
0	3,1 ± 0,5
2,5	2,9 ± 0,3
5	2,8 ± 0,5
9	2,7 ± 0,6
25	2,6 ± 0,2
50	2,7 ± 0,7
75	2,5 ± 0,3
100	2,6 ± 0,3

Tableau F17 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du milieu de Hoagland (durée d'exposition = 30h)
 ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g mil de Hoagland
 * Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de sol (%)	Indice mitotique (/100 cellules) Nov 97
0	3,0 ± 0,6
2,5	3,1 ± 0,5
5	3,1 ± 0,5
9	2,9 ± 0,4
25	3,1 ± 0,3
50	3,2 ± 0,4
75	3,4 ± 0,6
100	2,6 ± 0,3

Tableau F18 :

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (n = 9) dans les racines d' *Allium cepa* exposées à différentes concentrations de sol SIV mélangé à du sable (durée d'exposition = 3 jours)
 ex.: 5% = 5 g de sol qsp 100 g sable
 * Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre mutations (/1000 poils staminaux) Nov 97	Nbre poils staminaux observés
0	2,0 ± 0,5	5002
25	1,9 ± 1,2	4670
50	2,0 ± 1,2	4708
90	4,0 ± 2,5 *	5458

Tableau F19 :

Moyenne et écart-type du nombre de mutations /1000 poils staminaux dans les étamines de *Tradescantia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SIV (durée d'exposition = 30h)

* Effet statistiquement significatif ($p < 0,05$)

Concentration de lixiviat (%)	Nbre micronoyaux (/100 tétrades) Dec 98	Nbre tétrades observées
0	5,1 ± 1,4	1546
12,5	4,2 ± 2,3	1539
25	4,4 ± 0,6	1549
50	5,2 ± 0,8	1564
90	7,5 ± 2,2 *	1580
Témoin +	19,2 ± 2,5 *	1676

Tableau F20 :

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /100 tétrades (n=5) dans les cellules de pollen de *Tradescantia* exposé à différentes concentrations de lixiviat du sol SIV (durée d'exposition = 6h + 24h de récupération).

* Effet statistiquement significatif ($p < 0,05$)

Concentration de lixiviat (%)	Moment de la queue des comètes Juil 98
0	37 ± 52
12	43 ± 75
25	85 ± 91
50	153 ± 143 *
75	415 ± 102 *
90	420 ± 124 *

Tableau F21 :

Moyenne et écart-type du moment de la queue des comètes dans les racines de *Vicia* exposé à différentes concentrations de lixiviats du sol SIV (n = 50) (durée d'exposition = 4h)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

Concentration de lixiviat (%)	Moment de la queue des comètes Juil 98
0	234 ± 65
12	260 ± 122
50	153 ± 106
75	355 ± 114
90	432 ± 159

Tableau F22 :

Moyenne et écart-type du moment de la queue des comètes dans les racines d'*Allium* exposé à différentes concentrations de lixiviats du sol SIV (n = 50) (durée d'exposition = 4h)

* Effet statistiquement significatif (p<0,05)

ANNEXE G : Boue B1

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm)
0	13,6 ± 2,5
3,12	13,7 ± 3,1
6,25	14,8 ± 1,7
12,5	14,9 ± 1,7
25	14,8 ± 2,4
50	14,7 ± 1,7
75	14,3 ± 2,1
100	14,2 ± 2,4

Tableau G1

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (nb racines = 9) de *Vicia faba* exposée à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 7 jours (durée d'exposition = 30h)

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm)
0	17,3 ± 3,2
3,12	16,3 ± 0,6
6,25	14,3 ± 1,1
12,5	15,0 ± 1,0
25	16,3 ± 1,5
50	13,3 ± 0,6
75	9,3 ± 1,1 *
100	14,3 ± 6,4

Tableau G2

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (nb bulbes = 3) d'*Allium cepa* exposée à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 7 jours (durée d'exposition = 30h)

Concentration de lixiviat (%)	Nombre de micronoyaux / 1000 cellules
0	0,3 ± 0,5
12,5	0,3 ± 0,5
25	0,3 ± 0,5
50	1,0 ± 1,0
75	1,8 ± 1,3 *
100	1,8 ± 0,7 *
Témoin +	49,6 ± 7,7 *

Tableau G3

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (nb lames = 9)

dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 7 jours (durée d'exposition = 30h)

et à une substance de référence :

Témoin + (durée d'exposition = 6h + période de récupération de 42h)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique / 100 cellules
0	3,0 ± 0,6
12,5	3,1 ± 0,4
25	3,1 ± 0,5
50	3,5 ± 0,6
75	3,2 ± 0,5
100	3,6 ± 0,6

Tableau G4

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (nb lames = 9)

dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 7 jours (durée d'exposition = 30h)

Concentration de lixiviat (%)	Nombre de micronoyaux / 1000 cellules
0	0,2 ± 0,4
25	0,2 ± 0,4
50	0,8 ± 0,7
75	0,6 ± 0,9
100	1,0 ± 1,0 *
Témoin +	39,2 ± 14,0 *

Tableau G5

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (nb lames = 9)

dans les racines de *Allium cepa* exposées à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 7 jours (durée d'exposition = 30h)

et à une substance de référence :

Témoin + (durée d'exposition = 6h + période de récupération de 42h)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique / 100 cellules
0	2,8 ± 0,4
25	3,1 ± 0,3
50	2,8 ± 0,4
75	3,0 ± 0,3
100	3,1 ± 0,5

Tableau G6

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (nb lames = 9)

dans les racines de *Allium cepa* exposées à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 7 jours (durée d'exposition = 30h)

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm)
0	17,7 ± 3,0
3,12	19,5 ± 2,9
6,25	18,8 ± 2,1
12,5	18,2 ± 3,0
25	19,8 ± 1,5
50	15,9 ± 1,8
75	17,7 ± 5,1
100	18,8 ± 3,1

Tableau G7

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (nb racines = 9) de *Vicia faba* exposée à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 21 jours (durée d'exposition = 30h)

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm)
0	9,0 ± 1,0
3,12	9,0 ± 1,7
6,25	8,3 ± 2,3
12,5	10,7 ± 2,9
25	12,7 ± 4,1
50	12,0 ± 2,0
75	16,3 ± 1,1 *
100	15,0 ± 2,0 *

Tableau G8

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (nb bulbes = 3) d'*Allium cepa* exposée à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 21 jours (durée d'exposition = 30h)

Concentration de lixiviat (%)	Nombre de micronoyaux / 1000 cellules
0	0,4 ± 0,7
12,5	0,2 ± 0,4
25	0,2 ± 0,4
50	0,6 ± 0,5
75	1,8 ± 1,3 *
100	1,7 ± 0,7 *
Témoin +	34,8 ± 7,7 *

Tableau G9

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (nb lames = 9)

dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 21 jours (durée d'exposition = 30h) et à une substance de référence :

Témoin + (durée d'exposition = 6h + période de récupération de 42h)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique / 100 cellules
0	3,2 ± 0,5
12,5	3,4 ± 0,5
25	3,7 ± 0,6
50	3,3 ± 0,5
75	3,0 ± 0,8
100	2,8 ± 0,6

Tableau G10

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (nb lames = 9)

dans les racines de *Vicia faba* exposées à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 21 jours (durée d'exposition = 30h)

Concentration de lixiviat (%)	Nombre de micronoyaux / 1000 cellules
0	0,3 ± 0,5
25	0,2 ± 0,4
50	0,1 ± 0,3
75	1,2 ± 1,0
100	0,6 ± 0,7
Témoin +	27,7 ± 4,2 *

Tableau G11

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux /1000 cellules (nb lames = 9)

dans les racines de *Allium cepa* exposées à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 21 jours (durée d'exposition = 30h)

et à une substance de référence :

Témoin + (durée d'exposition = 6h + période de récupération de 42h)

Concentration de lixiviat (%)	Indice mitotique / 100 cellules
0	3,3 ± 0,3
25	3,1 ± 0,6
50	3,0 ± 0,4
75	2,8 ± 0,3
100	3,7 ± 0,6

Tableau G12

Moyenne et écart-type de l'indice mitotique (nb lames = 9)

dans les racines de *Allium cepa* exposées à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 21 jours (durée d'exposition = 30h)

2e campagne du mois de sept 97

Concentration de lixiviat (%)	Elongation racinaire (mm)
0	16,4 ± 3,8
12,5	13,9 ± 3,3
25	18,1 ± 3,7
50	13,2 ± 4,6
75	17,1 ± 6,6
100	17,1 ± 5,5

Tableau G13

Moyenne et écart-type de l'élongation racinaire (nb racines = 9) de *Vicia faba* exposée à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 7 jours (durée d'exposition = 30h)

Concentration de lixiviat (%)	Nombre de micronoyaux /1000 cellules
0	0,3 ± 0,7
12,5	0,1 ± 0,3
25	0,1 ± 0,3
50	0,4 ± 0,7
75	0,7 ± 0,7
100	1,9 ± 1,7 *
Témoin +	25,9 ± 4,7 *

Tableau G14

Moyenne et écart-type du nombre de micronoyaux (nb racines = 9) de *Vicia faba* exposée à différentes quantités de lixiviats de boue B1 conservée 7 jours (durée d'exposition = 30h) et à une substance de référence :

ABSTRACT

Complex matrices were investigated for genotoxicity in a series of experiments with higher plants: 2 spiked soils, one with metals (SI) and the other one with organics (SII), 2 contaminated soils and 2 activated sludges. Three different plant species were chosen: an herbaceous plant (*Tradescantia*, commonly named spiderwort), the broad bean (*Vicia faba*) and the small and white onion (*Allium cepa*).

DNA strand breakages (detected with the micronucleus assay and with the comet assay) and somatic mutations were mainly studied. The genotoxicity tests with plants were carried out immersing the roots in the aqueous extract of each complex matrix (indirect procedure). Moreover, the results obtained with the *Vicia/Allium* assays were compared with those obtained with a direct procedure (in that case onion bulbs and broad bean seeds were directly put to germinate in each of the four soils) and an intermediate procedure (with root immersion in a mixture of soil and nutrient solution).

Results showed the feasibility and the rapidity of the comet assay, the higher sensitivity of *Vicia* when compared to other species. A good correlation was found between the intermediate and the direct procedures, but the indirect procedure (with aqueous extract of soil) remained the most efficient way of exposure to detect the genotoxic potential of contaminated soils.

Finally, the SI and SIII contaminated soils were shown to be highly genotoxic, while the SII and SIV soils appeared to be weakly genotoxic. The activated sludges were found to be very weakly genotoxic, specially when they are composted.

Keywords : Phytogenotoxicity / *Allium cepa* / *Vicia faba* / *Tradescantia* / Comet assay /
Micronucleus assay / Somatic mutations / Contaminated soils

RESUME

La présente étude concerne principalement les effets génotoxiques de différentes matrices complexes sur des plantes supérieures : 2 sols artificiellement contaminés, l'un avec des métaux (SI) et l'autre avec des polluants organiques (SII), 2 sols prélevés sur sites contaminés (SIII et SIV) et 2 boues : une boue digérée de station d'épuration urbaine (B1) et la même boue compostée (B3). Nous avons sélectionné 3 plantes supérieures : *Tradescantia* (une plante herbacée), *Vicia faba* (la fève) et *Allium cepa* (l'oignon blanc).

Le génome peut être altéré de diverses façons, mais nous nous sommes intéressés aux cassures de brins d'ADN (qui peuvent être détectées par le test des micronoyaux ou par le test des comètes) et aux mutations somatiques. Parallèlement à ces travaux, l'élongation racinaire et l'indice mitotique ont été déterminés sur *Vicia* et *Allium*. Tous ces critères ont été systématiquement réalisés sur les lixiviats (rapport solide/liquide = 1/10) des matrices testées. En outre, nous avons comparé 3 modes d'exposition en utilisant *Vicia* et *Allium* : un mode direct (phase solide), un mode indirect (lixiviat) et un mode intermédiaire où les plantes ont été mises en contact avec le sol mélangé à un milieu nutritif.

Les résultats ont permis de mettre clairement en évidence les avantages de certains tests : la rapidité du test des comètes dont l'applicabilité aux cellules végétales a été démontrée, la plus grande sensibilité de *Vicia* par rapport aux autres espèces. Une bonne corrélation a été démontrée entre les deux modes d'exposition « alternatifs » à la lixiviation, mais ce procédé demeure le plus efficace pour détecter le potentiel génotoxique des sols contaminés.

Enfin, nous avons mis en évidence une génotoxicité des sols SI et SIII et dans une moindre mesure, des sols SII et SIV. Quant à la boue de station d'épuration, elle a induit très peu d'effets génotoxiques sur les plantes étudiées. Ces effets sont d'ailleurs encore moins apparents après compostage.

Mots-clés : Phytogénotoxicité / *Allium cepa* / *Vicia faba* / *Tradescantia* / Test des comètes /
Test des micronoyaux / Mutations somatiques / Sols contaminés