



## 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](mailto: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.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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



Université Paul Verlaine – Metz  
Laboratoire des Interactions Écotoxicologie,  
Biodiversité, Écosystèmes  
LIEBE UMR CNRS 7146



École Doctorale Sciences et Ingénieries  
Ressources Procédés Produits Environnement  
RP2E ED 410

Thèse de doctorat présentée par  
**Anne-Sophie FOLTETE**  
en vue de *l'obtention du grade de Docteur ès sciences*  
**mention Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes**

# Effets génotoxiques et systèmes de détoxification chez *Vicia faba* (Fabaceae) dans le cadre de l'évaluation des sols pollués

Soutenue publiquement le **5 novembre 2010** devant le jury composé de :

- **Mme Maritxu GUIRESSE**, Professeur, ENSAT, Université de Toulouse, Rapporteur
- **M. Claudemir RADETSKI**, Professeur, Universidade do Vale do Itajaí, Brésil, Rapporteur
- **Mme Marie CARRIERE**, Chercheur au CEA de Saclay, Examineur
- **Mme Cécile GRAND**, Ingénieur ADEME, Examineur
- **Mme Sylvie COTELLE**, Maître de Conférences, Université de Metz, Co-directrice de thèse
- **M. Jean-François FERARD**, Professeur, Université de Metz, Directeur de thèse

**ADEME**



Agence de l'Environnement  
et de la Maîtrise de l'Energie



# Remerciements

Arrivée au terme de cette thèse, je tiens à remercier toutes les personnes, et elles sont nombreuses, sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Pour commencer, je tiens à remercier le Professeur Paule VASSEUR, directrice du laboratoire LIEBE au moment où j'y suis arrivée, pour m'avoir accueillie dans son établissement, et acceptée comme étudiante dans le Master II Ecotoxicologie et Biodiversité qu'elle dirigeait.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, et « accessoirement » directeur actuel du LIEBE, le Professeur Jean-François FERARD, pour son aide et son soutien, et surtout pour le temps précieux qu'il m'a toujours consacré malgré ses obligations.

Mes plus grands remerciements vont à ma co-directrice de thèse, le Docteur Sylvie COTELLE, qui a su me soutenir et me guider en toute circonstance tout en me laissant une relative liberté, et qui a partagé ses compétences (et ses boîtes de chocolats...) avec générosité, patience, énergie et une (presque) indéfectible bonne humeur.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ma thèse avec la neutralité d'un regard extérieur. Merci aux rapporteurs, les professeurs Maritxu GUIRESSE et Claudemir RADETSKI d'avoir accepté de juger mon travail. Merci également aux examinateurs, le Docteur Marie CARRIERE et madame Cécile GRAND, ingénieur ADEME, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

L'argent étant le nerf de la guerre et de la recherche également, je voudrais remercier l'Agence pour le Développement et la Maîtrise de l'Energie (ADEME) pour avoir financé mon doctorat pendant deux ans.

Merci également à tout le personnel du LIEBE, techniciens, enseignants-chercheurs, documentalistes, secrétaires ou agent techniques, pour avoir fait en sorte que ma thèse se passe dans les meilleures conditions possibles.

Merci donc à Mireille OLLIVIER pour avoir toujours réussi à me dénicher dans les plus brefs délais les publis que je cherchais, et pour son fidèle Infodoc attendu avec impatience tous les vendredis.

Merci à Daniel SOUBROUILLARD, notre Maître des Clés à nous, pour ses coutumiers « bonswooooooooor » et ses conversations surréalistes, mais également pour son réel dévouement et ses qualités humaines.

Le métier de secrétaire étant à mes yeux particulièrement ingrat, j'ai une d'autant plus profonde reconnaissance pour toutes celles et tous ceux exerçant ce métier au sein de l'université de Metz et qui ont pris en charge mes commandes et mes ordres de mission, et en particulier pour mes interlocutrices privilégiées, Catherine DRUI et Maryline GOERGEN.

Merci à la technicienne Chantal FOUQUE pour sa bonne humeur, son indulgence et ses histoires toujours inattendues. Merci à la technicienne Anne-Marie VEBER pour sa sympathie, son sens de l'ordre et ses conseils avisés. Je lui souhaite une agréable retraite bien méritée. Merci également à l'ingénieur de recherche Claudine RAST pour sa collaboration mais aussi pour son dévouement et sa disponibilité. Son franc-parler et sa fermeté un peu « brutes de décoffrage » nous ont sans doute évité bien des catastrophes. Je lui souhaite également une agréable retraite, bien méritée également. Un merci tout particulier à notre « petite main » omniprésente, Rosy TODA, toujours prête à rendre service avec une grande générosité.

Merci à notre informaticien préféré, Yann WALTHERTHUM, d'avoir résolu nos problèmes d'ordinateur, de réseaux ou d'imprimantes avec une éternelle bonne humeur.

Merci à Philippe ROUSSELLE d'avoir effectué pour moi quelques dosages de métaux.

Merci aux docteurs Pascal POUPIN et Françoise IMMEL de m'avoir aidée dans ma tentative infructueuse de synthèse de phytochélatines.

Merci à tous les participants au projet Nanoalter, à commencer par le responsable du projet, le docteur Jérôme LABILLE, du CEREGE d'Aix-En-Provence, ainsi qu'à tous les membres du CEREGE qui y ont collaboré. Merci également au professeur Jaïro FALLA et au docteur

Laurent FOUCAUD de l'IUT de Thionville/Yutz pour nous avoir accueillis dans leurs locaux pendant quelques jours et mis leur boîte à gants à notre disposition. Je suis également très reconnaissante au docteur Johanne NAHMANI, porteuse du projet pour le LIEBE, pour sa grande disponibilité et la pertinence de ses remarques et conseils. Un immense merci au docteur Jean-François MASFARAUD pour sa collaboration au projet Nanoalter et son aide précieuse au cours d'autres expérimentations, mais également pour sa sympathie, sa disponibilité, sa patience et ses précieux conseils.

Merci au président du programme GISFI le professeur Jean-Louis MOREL, à son ingénieur de projet Noële RAOULT et à tous ses participants.

Merci au docteur Simon DEVIN pour m'avoir éclairée sur quelques problèmes de statistiques.

Je tiens à adresser mes plus vifs remerciements aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, Maël DELEMOTTE, Adrien DHYEVRE et Quentin LEPINEY, et qui ont fait de l'excellent travail. Adrien, je suis heureuse de t'avoir transmis l'envie de continuer dans la voie de la recherche et j'espère t'avoir mis correctement « sur les rails ». J'espère, enfin plutôt je sais, que si tu décides de faire une thèse, elle sera excellente.

Un grand merci également à tous mes collègues doctorants, passés, présents ou futurs, qui ont vécu, vivent ou vivront la grande aventure de la thèse. Une thèse ne se fait jamais seul, et la mienne n'aurait sans doute pas le même visage et surtout pas la même saveur sans votre présence, votre soutien et l'entraide et la solidarité qui existent entre nous.

Je voudrais souhaiter bonne chance à tous les « anciens » doctorants qui ont aujourd'hui pour la plupart quitté le laboratoire une fois leur thèse en poche. Ma thèse n'est pas partie de rien, et je remercie mon prédécesseur Eric B. de m'avoir « passé le flambeau » ainsi que Marc D. pour ses conseils éclairés. Merci à tous les autres « grands frères » qui ont soutenu avant moi : d'abord Jean-Marc qui a eu droit à une fontaine artificielle en salle L, puis Vincent M. (grand cru de l'année 2008), Renaud mon défouloir favori, Manu l'homme en noir, Vincent J. l'amateur de spécialités turques (bisous à Céline et au petit Guillaume), Aurélie (mini-Aurélie ?), Marc B. et ses comètes sans queue ni tête, Sophie qui détient la clé de l'énigme, et enfin, la veille de ma soutenance, Anatole (ma référence en matière d'alimentation

équilibrée), que je remercie pour son soutien et tout particulièrement pour avoir pu trouver le temps de m'aider pour la mise en page de ma thèse.

Je n'oublie pas non plus ceux qui ont fait le choix d'abandonner la thèse pour des raisons qui leur appartiennent. Je pense à Amine, parti recommencer une thèse sous d'autres cieux. Je lui souhaite le meilleur pour la suite, Inch Allah. Je pense également à Pierre, qui a enfin trouvé sa voie et à qui je souhaite de tout cœur de s'épanouir dans sa passion.

Je souhaite bon courage à tous les actuels doctorants qui m'ont accompagnée dans cette aventure. Apolline et Dali le chien mâle, Tragic Audrey et ses pommes de pin, Aurore la Vosgienne délocalisée, Cédric (Vosgien kayakiste amoureux des chats tricolores) que je voudrais remercier particulièrement pour son aide lors de la mise en page de ma thèse, Céline et sa joie de vivre qui fait plaisir à voir, Claudia notre Colombienne thionilloise, Didier (courage c'est la dernière ligne droite), Elham (à tout bientôt à Caen), Emilie et nos longues conversations philosophiques, Eric G. (la rhodamine ça fait voir la vie en rose), Fanny, Hela (j'attends les gâteaux tunisiens), Hugues et sa blague du jour, Julio, Karen et ses polaires multicouches (muchas gracias pour tout et le reste), Laëtitia (l'énergie parisienne et la générosité espagnole), virtuose de l'appareil photo et du bricolage improbable, muchas merci, Nelly et sa petite Clara, Olivier le champion de l'HPLC monobromobimanienne, Pascal et Nathalie Charrette Arrangée, Stéphane le ptit jeune, Tiphaine l'Internationale et Yann le bricoleur.

Merci à tous pour tous les bons moments passés et tous les souvenirs que je pourrai raconter à mes petits-enfants le soir au coin du feu... Les souvenirs de colloques, de voyages, de vacances, mais aussi de galères partagées et d'une solidarité sans faille.

Enfin, j'ai une pensée toute particulière pour ma famille qui n'a pas forcément toujours compris mes choix mais les a toujours acceptés et a toujours été présente pour me soutenir.

## Liste des Abréviations

$\gamma$ GC : Gamma-Glutamyl-Cystéine  
ABD-F : 4-Fluoro-7-sulfamoylbenzofurazane  
ADN ou DNA : Acide DésoxyriboNucléique  
AFNOR : Agence Française de NORmalisation  
APX : Ascorbate Peroxydase  
BET : Bromure d'Ethidium  
BSO : Buthionine SulfOximine  
CAS : Chemical Abstracts Service  
CAT : CATalase  
CEC : Capacité d'Echange Cationique  
DMF : DiMethylFormamide  
DMSO : DiMethylSulfOxyde  
DTPA : Acide DiethylèneTriaminePentaacétique  
EMS : Ethyl MethaneSulfonate  
ENU : N-Ethyl-N-NitrosoUrée  
GISFI : Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles  
GPX : Glutathion Peroxydase  
GR : Glutathion Réductase  
GSH : Glutathion réduit  
GSSG : Glutation oxydé  
HAP : Hydrocarbure Aromatique Polycyclique  
HM : Hydrazide Maléique  
HPLC : Chromatographie Liquide Haute Performance  
IM : Indice Mitotique  
ISO : International Standardisation Organism  
LMPA : Low Melting Point Agarose  
MDA : MaloneDiAldéhyde  
MNU : N-Méthyl-N-NitrosoUrée  
Na<sub>2</sub>EDTA : Acide EthylèneDiamineTetraacétique  
NMPA : Normal Melting Point Agarose  
PBS : Phosphate Balanced Salt Solution pH = 7,4  
PC : PhytoChélatine  
PDMS : PolyDiMéthylSiloxane  
pH : potentiel Hydrogène  
PM : Poids Moléculaire  
ROS : Reactive Oxygen Species ou espèces réactives de l'oxygène  
SOD : SuperOxyde Dismutase  
SPA : Sous-Produits d'Altération  
SSA : Acide 5-SulfoSalicylique  
TBA : Acide ThioBarbiturique  
TBP : Tri-Butyl-Phosphine  
TCB : 1,2,4-TriChloroBenzène  
TFA : Acide TriFluoroacétique  
TR : Temps de Réention  
Tris : Tris(hydroxyméthyl)-aminoéthane  
Triton : T-octylphénoxyéthoxyéthanol  
XRF : X-Ray Fluorescence micro-spectroscopy





# Table des Matières

## INTRODUCTION

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>1</b>	<b>Intérêt et historique des tests sur plantes en écotoxicologie.....</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Le modèle biologique <i>Vicia faba</i>.....</b>	<b>7</b>
2.1	La plante.....	7
2.1.1	Classification.....	7
2.1.2	Aspect et particularités.....	8
2.1.3	Culture.....	10
2.1.4	Caryotype et cycle cellulaire.....	10
2.2	Intérêt en écotoxicologie.....	11
<b>3</b>	<b>Toxiques étudiés.....</b>	<b>12</b>
3.1	L'hydrazide maléique.....	12
3.1.1	Structure et dénominations.....	12
3.1.2	Propriétés physicochimiques.....	13
3.1.3	Utilisation et spécialités commerciales.....	13
3.1.4	Comportement dans les sols.....	16
3.1.5	Absorption, distribution, métabolisme dans la plante.....	16
3.1.6	Toxicité sur la cellule végétale et mode d'action.....	17
3.1.7	Facteurs susceptibles de modifier sa toxicité.....	19
3.2	Le cadmium.....	20
3.2.1	Généralités.....	20
3.2.2	Comportement dans les sols et biodisponibilité.....	21
3.2.3	Absorption et distribution dans la plante.....	21
3.2.4	Effets sur la cellule végétale.....	22
3.2.5	Effets génotoxiques.....	23
3.3	Le cuivre.....	25
3.3.1	Généralités.....	25
3.3.2	La bouillie bordelaise.....	26
3.3.3	Comportement dans les sols et biodisponibilité.....	26
3.3.4	Absorption et distribution dans la plante.....	27
3.3.5	Effets toxiques sur la cellule végétale.....	27
3.4	Les nanoparticules.....	29
3.4.1	Définition et propriétés physico-chimiques.....	29
3.4.2	Ecotoxicologie.....	29
3.4.3	Les nanoparticules de dioxyde de titane TiO <sub>2</sub> .....	31
<b>4</b>	<b>Tests de génotoxicité.....</b>	<b>32</b>
4.1	Le test des micronoyaux.....	32
4.1.1	Principe.....	32
4.1.2	Applications.....	35
4.1.3	Devenir d'une cellule micronucléée.....	36
4.1.4	Protocoles.....	37

4.1.5	Statistiques .....	38
4.2	Le test des comètes.....	38
4.2.1	Généralités.....	38
4.2.2	Types de lésions génotoxiques mises en évidence par le test des comètes.....	39
4.2.3	Les différentes étapes du protocole.....	40
4.2.4	Les différents protocoles de la bibliographie .....	42
<b>5</b>	<b>Les phytochélatines .....</b>	<b>43</b>
5.1	Généralités.....	43
5.2	Biosynthèse .....	43
5.3	Rôles.....	45

## MATERIEL ET METHODES

<b>1</b>	<b>Test des micronoyaux.....</b>	<b>47</b>
1.1	Test des micronoyaux en milieu liquide .....	47
1.1.1	Prégermination .....	47
1.1.2	Exposition.....	50
1.1.3	Test des micronoyaux.....	50
1.1.4	Application à des percolats de sols de cokerie (GISFI) .....	50
1.2	Test des micronoyaux en milieu solide.....	51
1.2.1	Application à des sols de cokerie (GISFI) .....	52
1.2.2	Optimisation du protocole en milieu solide .....	52
<b>2</b>	<b>Test des comètes.....</b>	<b>56</b>
2.1	Préparation des lames.....	56
2.1.1	Première couche d'agarose.....	56
2.1.2	Obtention des noyaux et inclusion en gel d'agarose .....	56
2.2	Le test des comètes.....	58
2.2.1	Lyse .....	58
2.2.2	Dénaturation .....	58
2.2.3	Electrophorèse.....	58
2.2.4	Neutralisation .....	58
2.2.5	Fixation.....	59
2.3	Observation des noyaux .....	61
<b>3</b>	<b>Dosage des phytochélatines par HPLC .....</b>	<b>63</b>
3.1	Extraction des thiols .....	63
3.2	Réduction des thiols .....	63
3.3	Dérivation.....	63
3.4	Dosage HPLC.....	64
<b>4</b>	<b>Le programme Nanoalter .....</b>	<b>64</b>
4.1	Vieillessement accéléré des nanocomposites.....	64
4.2	Exposition.....	65
4.3	Récupération du matériel biologique et tests .....	66
<b>5</b>	<b>Tests à long terme.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Exploitation statistique des données.....</b>	<b>69</b>

## RESULTATS ET DISCUSSION

<b>1</b>	<b>Test des micronoyaux.....</b>	<b>71</b>
1.1	Formation, aspect et devenir des micronoyaux .....	71
1.1.1	Action de l'hydrazide maléique .....	71
1.1.2	Action du cuivre .....	73
1.2	Micronoyaux en milieu liquide .....	74
1.2.1	Effets de l'hydrazide maléique.....	74
1.2.2	Applications : programme GISFI.....	77
1.3	Micronoyaux en milieu solide.....	79
1.3.1	Sol de Neuves-Maisons (Parcelles d'Homécourt).....	79
1.3.2	Optimisation du protocole en milieu solide : Elaboration de la norme.....	82
	<b>Publication soumise : Improvement of <i>Vicia</i>-micronucleus test for assessment of soil quality: a proposal for international standardization.....</b>	<b>85</b>
	<b>Abstract .....</b>	<b>85</b>
	<b>Introduction .....</b>	<b>86</b>
	<b>Material and methods .....</b>	<b>87</b>
	<b>Results .....</b>	<b>90</b>
	<b>Discussion .....</b>	<b>94</b>
	<b>Conclusion.....</b>	<b>96</b>
	<b>Acknowledgements.....</b>	<b>96</b>
<b>2</b>	<b>Test des comètes.....</b>	<b>99</b>
2.1	Ajustement du protocole .....	99
2.1.1	Première couche d'agarose.....	99
2.1.2	Nombre de racines à utiliser.....	99
2.1.3	Tampon à utiliser pour la découpe des racines .....	99
2.1.4	Scalpel ou lame de rasoir ?.....	99
2.1.5	Temps de séjour des noyaux dans le PBS .....	99
2.1.6	Filtration ? .....	100
2.1.7	Lyse .....	100
2.1.8	Electrophorèse .....	103
2.1.9	Fixation.....	103
2.1.10	Répétabilité, reproductibilité.....	103
2.1.11	Conservation.....	104
2.1.12	Comètes après exposition en milieu solide .....	104
2.1.13	Témoins positifs .....	104
2.2	Synthèse sur l'essai des comètes .....	104
<b>3</b>	<b>Dosage des thiols par HPLC.....</b>	<b>107</b>

<b>4</b>	<b>Nanoalter .....</b>	<b>110</b>
	<i>Publication à soumettre : Environmental impact of sunscreen nanomaterials: ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO<sub>2</sub> nanocomposites on Vicia faba</i> .....	111
	Abstract .....	112
	Introduction .....	113
	Materials and methods.....	114
	Results and Discussion .....	118
	Conclusion.....	129
	Acknowledgements.....	129
<b>5</b>	<b>Pertinence du test des micronoyaux : devenir à long terme des plantes .....</b>	<b>130</b>
5.1	Cadmium .....	131
	<i>Publication acceptée : Is there a relationship between early genotoxicity and life history traits in Vicia faba submitted to cadmium spiked soils?</i> .....	133
	Abstract .....	133
	Introduction .....	134
	Materials and methods.....	135
	Results .....	138
	Discussion .....	143
	Conclusion.....	144
	Acknowledgements.....	145
5.2	Cuivre et Hydrazide maléique.....	146
5.2.1	Choix des concentrations à utiliser.....	146
5.2.2	Pertinence écologique des concentrations choisies.....	146
5.2.3	Impact à long terme sur les plantes .....	148

## DISCUSSION GENERALE

<b>1</b>	<b>Relations entre fréquence de micronoyaux, indice mitotique et élongation racinaire.....</b>	<b>157</b>
1.1	Corrélation.....	157
1.2	Sensibilité.....	158
<b>2</b>	<b>Ajustement du protocole du test des micronoyaux .....</b>	<b>159</b>
2.1	Praticité.....	159
2.2	Spécificité.....	159
2.3	Répétabilité, reproductibilité.....	159
2.4	Sensibilité.....	159
2.5	Le protocole « 5 jours » : avantages et inconvénients.....	161
2.5.1	Avantages .....	161
2.5.2	Inconvénients .....	161
2.6	Le protocole « 48h » : avantages et inconvénients.....	162
2.6.1	Avantages .....	162
2.6.2	Inconvénients .....	162
2.7	Proposition d'un protocole .....	162

<b>3</b>	<b>Tests à long terme.....</b>	<b>163</b>
<b>4</b>	<b>Application à la gestion des sols contaminés.....</b>	<b>164</b>
<b>5</b>	<b>Le programme Nanoalter .....</b>	<b>165</b>
<b>6</b>	<b>Conclusion et perspectives.....</b>	<b>165</b>



# Liste des Figures

Figure 1 : Les différentes parties de la fève <i>Vicia faba</i> L. (Thomé 1885). .....	9
Figure 2 : Durée des principales étapes du cycle cellulaire des cellules méristématiques des racines primaires de <i>Vicia faba</i> var. Suttons' Prolific Longpod d'après Evans et Scott (1963). .....	10
Figure 3 : Les trois formes tautomères de l'hydrazide maléique : forme dihydroxy (gauche), forme monohydroxy-monocéto (centre) et forme dicéto (droite). Encadré en rouge : 1,3H-uracile .....	12
Figure 4 : Les deux mécanismes possibles de formation d'un micronoyau par un agent génotoxique (Fenech 1997) .....	33
Figure 5 : Coupe longitudinale de l'apex d'une racine d' <i>Allium cepa</i> montrant la partie méristématique (M), les cellules filles (F1) et la cape de protection de l'apex (CAP). D'après Ma et al. (1995). .....	34
Figure 6 : Mécanismes de chélation et de stockage du cadmium dans la vacuole, d'après Sanità di Toppi et Gabbriellini (1999).....	45
Figure 7 : Obtention des jeunes pousses de <i>Vicia faba</i> .....	49
Figure 8 : Illustrations schématisques des différents protocoles testés pour l'optimisation du test des micronoyaux. Chacun des protocoles (b), (c) et (d) ont été comparés au protocole (a).....	55
Figure 9 : Principales étapes de préparation des lames en vue du test des comètes .....	57
Figure 10 : Les différentes étapes du test des comètes. ....	60
Figure 11 : Ghost cell ou hedgehog. On voit bien le vestige de noyau sous forme d'anneau et une grosse quantité d'ADN dégradé dans la queue (grossissement x 400).....	62
Figure 12 : dispositif d'exposition des plantes aux nanoparticules .....	66
Figure 13 : Effets de l'hydrazide maléique sur les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de <i>Vicia faba</i> , visibles au microscope optique X1000. ....	72
Figure 14 : Effets du sulfate de cuivre sur les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de <i>Vicia faba</i> , visibles au microscope optique X1000. ....	73



- Figure 15 : Elongation racinaire mesurée sur les racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différentes concentrations d'hydrazide maléique. .... 76
- Figure 16 : Fréquence de micronoyaux pour 1 000 cellules et indice mitotique (%) retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différentes concentrations d'hydrazide maléique ..... 76
- Figure 17 : Fréquence de micronoyaux pour 1 000 cellules et indice mitotique (%) retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différents percolats issus de parcelles de sol de Neuves-Maisons plantées de différentes végétations ..... 78
- Figure 18 : Elongation des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différents percolats issus de parcelles de sol de Neuves-Maisons plantées de différentes végétations. .... 78
- Figure 19 : Longueur maximale des racines secondaires de *Vicia faba* après 5 jours de contamination dans des sols issus de parcelles de sol de Neuves-Maisons plantées de différentes végétations ..... 80
- Figure 20 : Fréquence de micronoyaux pour 1 000 cellules et indice mitotique (%) retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba* après 5 jours de contamination dans des sols issus de parcelles de sol de Neuves-Maisons plantées de différentes végétations ..... 80
- Figure 21 : Fréquence de micronoyaux pour 1 000 cellules et indice mitotique (%) retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différentes concentrations d'hydrazide maléique ..... 83
- Figure 22: Aspect of micronuclei (arrows) obtained in secondary root meristematic daughter cells of *Vicia faba* after 5 days exposure to: (a) 20  $\mu\text{mol}$  MH / kg dry soil; (b) 8 mmol  $\text{CuSO}_4$  / kg dry soil; (c) 8 mmol  $\text{CuSO}_4$  / kg dry soil, irregularly shaped micronucleus. Optical microscope, X 400 magnification. .... 90
- Figure 23: Root elongation (48-h protocol) and maximal root length (5-day protocol) of secondary roots of *Vicia faba* after 48 h (a) or 5 days (b) of exposure to maleic hydrazide (mean +/- SD). N = 3 roots x 3 individuals. The curve is the number (mean and SD) of secondary roots which appeared on the primary root (N = 3).... 91
- Figure 24: Root elongation (48-h protocol) and maximal root length (5-day protocol) of secondary roots of *Vicia faba* after 48 h (a) or 5 days (b) of exposure to copper sulphate (mean +/- SD). N = 3 roots x 3 individuals. The curve is the number (mean and SD) of secondary roots which appeared on the primary root (N = 3)..... 91
- Figure 25: Micronuclei (mcn) in the secondary roots of *Vicia faba* after 48 h or 5 days of exposure to maleic hydrazide (a) or copper sulphate (b) (mean +/- SD)..... 92

Figure 26: Root elongation of secondary roots in <i>Vicia faba</i> after 48 h of exposure to maleic hydrazide (a) or copper sulphate (b) (mean +/- SD).....	93
Figure 27: Micronuclei (mcn) in the secondary roots of <i>Vicia faba</i> after 48 h or 5 days of exposure to maleic hydrazide (a) or copper sulphate (b) (mean +/- SD).....	94
Figure 28 : Elongation racinaire mesurée sur les racines secondaires de <i>Vicia faba</i> après 48h de contamination dans différentes concentrations d'hydrazide maléique en milieu solide (moyenne +/- écart-type, 3 fèves, n = 9 racines).....	98
Figure 29 : Fréquence de micronoyaux pour 1 000 cellules et indice mitotique (%) retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de <i>Vicia faba</i> après 48h de contamination dans différentes concentrations d'hydrazide maléique en milieu solide (moyenne +/- écart-type, 3 fèves, n = 6 racines).....	98
Figure 30 : (a), (b) : type de structures parfois retrouvées à la place des comètes même dans les témoins négatifs, souvent avec les protocoles sans lyse. (c) : noyau ayant subi le test des comètes sans lyse, et qui semble avoir conservé sa membrane nucléaire (grossissement x 400). .....	100
Figure 31 : Tail DNA (moyenne +/-écart-type) obtenu avec le test des comètes sur racines secondaires de <i>Vicia faba</i> après 24h d'exposition au dichlorure de cadmium en milieu liquide (milieu de Hoagland).....	101
Figure 32 : Tail DNA (moyenne +/-écart-type) obtenu avec le test des comètes sur racines secondaires de <i>Vicia faba</i> après 24h d'exposition au dichlorure de cadmium en milieu liquide (milieu de Hoagland).....	102
Figure 33 : Courbes d'étalonnage des différents thiols dosés par HPLC.....	108
Figure 34 : Tracé obtenu par dosage HPLC des thiols dans les racines secondaires de <i>Vicia faba</i> .....	109
Figure 35 : Time evolution of particles size in the 5 first hours after dilution of ATN mother suspension to 25 mg ATN/L in the mixture of ultrapure and mineral waters (50:50, v:v). White triangles: particles below 700 nm; Black squares: particles over 10 µm. ....	119
Figure 36: Ti or Al concentrations in <i>V. faba</i> secondary roots after 48h exposure with respect to their concentrations in exposure suspensions.....	121
Figure 37: relationship between Ti and Al in <i>Vicia faba</i> secondary roots after 48h exposure to different ATN concentrations. Dotted line: Ti/Al ratio in exposure suspension... ..	121
Figure 38: µ-XRF analyses of roots after 48H exposure to 50 mg ATN/L. ....	123

- Figure 39: (a): Secondary root elongation (mean  $\pm$  SD) in *V. faba* exposed for 48h to ATN (3x4 individuals). (b): Shoot fresh weight (4 individuals, mean  $\pm$  SD). (c): Fv/Fm ratio in leaves (4 individuals, mean  $\pm$  SD). ..... 125
- Figure 40: Thiol concentrations (GSH and PCs, mean  $\pm$  SD) in roots of *V. faba* exposed 48h to ATN (4 individuals). Differences between ATN treated and control individuals are not statistically significant, ANOVA,  $p < 0.05$ . Cd: reference metal. .... 127
- Figure 41: Micronucleus frequency and mitotic index (mean  $\pm$  SD) in *V. faba* roots exposed 48h to ATN (2 x 4 individuals). Differences between ATN treated and control individuals are not statistically significant, ANOVA,  $p < 0.05$ . MH: positive control. .... 128
- Figure 42: Total cumulated length of all secondary roots and number of secondary roots in *Vicia faba* after 5 days of exposure to cadmium dichloride (mean  $\pm$  SD; n = 3). ..... 138
- Figure 43: Micronuclei (mcn) and mitotic index (MI) in the secondary roots of *Vicia faba* after 5 days of exposure to cadmium dichloride (mean  $\pm$  SD; n = 6). ..... 139
- Figure 44: Total number of lateral buds in *Vicia faba* exposed or not to CdCl<sub>2</sub> (mean  $\pm$  SD). ..... 140
- Figure 45: Total number of flowers in control or cadmium exposed *Vicia faba* plants (n = 6 individuals). ..... 141
- Figure 46: Total number of flowers produced by individual plant (plant number 1 to 6) throughout their whole life duration. .... 142
- Figure 47: Survival time of control plants (C) and cadmium exposed plants (E), long-term experiment (n = 6 individuals)..... 142
- Figure 48 : Elongation racinaire (moyenne  $\pm$  écart-type, 3 fèves, n = 9 racines) des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination en milieu solide dans du sol LUFA 2.2 dopé au sulfate de cuivre (a) ou à l'HM (c). Pour CuSO<sub>4</sub> : changement de variable : racine (x). (b), (d) : Indice mitotique (%) et fréquence de micronoyaux pour 1 000 cellules retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des mêmes racines, respectivement (moyenne  $\pm$  écart-type, 3 fèves, n = 6 racines)..... 147
- Figure 49 : Aspect des feuilles de *Vicia faba* 25 jours après semence. (a), (b) : Témoin. (c) : 20 $\mu$ mol/kg d'HM. (d) : L'une des 10 plantes exposées au sulfate de cuivre, les 9 autres ayant une taille et un aspect semblables au témoin. .... 149
- Figure 50 : Répartition des 10 individus exposés à 2 mmol/kg de sulfate de cuivre (Cu), 5  $\mu$ mol/kg d'HM (HM5) ou 20  $\mu$ mol/kg d'HM (HM20) en fonction de leur vitesse initiale de croissance sur les 25 premiers jours suivant leur émergence (Vi)..... 150

Figure 51 : Vitesse de croissance (moyenne +/- écart-type) de 10 individus exposés à 2 mmol/kg de sulfate de cuivre (Cu), 5  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM (HM5) ou 20  $\mu\text{mol/kg}$  HM (HM20). ..... 151

Figure 52 : Evolution de la proportion de feuilles encore vivantes (moyenne +/- écart-type) de 10 individus exposés à 2 mmol/kg de sulfate de cuivre (Cu), 5  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM (HM5) ou 20  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM (HM20). ..... 153



## Liste des tableaux

Tableau I : Liste des spécialités commerciales contenant de l'hydrazide maléique autorisées à la vente en France. Dans la dernière colonne, nous avons calculé la quantité d'HM par m <sup>2</sup> sur champ traité avec la spécialité en question aux doses recommandées... 15	15
Tableau II : Résumé des protocoles du test des comètes pratiqué par différents auteurs sur les plantes. .... 43	43
Table III: Basic characteristics of the LUFA 2.2 soil. .... 87	87
Tableau IV : Temps de rétention (TR) moyen des différents thiols dosés par HPLC. .... 107	107
Table V: Supernatant relative turbidity according to ATN concentration after 24 h settling following dilution of ATN mother suspension to 25 mg ATN/L in the mixture of ultrapure and mineral waters (50:50, v:v)..... 119	119
Table VI: Malonedialdehyde and oxidative stress enzymes activities in shoot tissues of <i>Vicia faba</i> plantlets after 48h exposure to ATN (mean +/- SD). .... 126	126
Table VII: Malonedialdehyde and oxidative stress enzyme activities in root tissues of <i>Vicia faba</i> plantlets after 48h exposure to ATN (mean +/- SD). .... 126	126
Table VIII: General characteristics of the LUFA soil (mean +/- SD)..... 136	136



# *Introduction*

---





L'évaluation des risques liés à la pollution des sols nécessite de disposer d'outils biologiques permettant d'apprécier l'impact des polluants sur les êtres vivants. En effet, si la typologie de la pollution est globalement bien définie par les analyses physico-chimiques, les questions récurrentes posées lors des évaluations de risque concernent la biodisponibilité des polluants du sol, leurs interactions possibles, et les effets potentiels de la pollution non caractérisée.

La réponse à ces questions implique l'évaluation des effets de l'ensemble des contaminants biodisponibles à l'aide d'une approche biologique venant compléter les analyses physico-chimiques. La nécessité de développer de tels outils écotoxicologiques pour les entreprises et les organismes en charge de problématiques environnementales apparaît clairement dans différents domaines :

- l'évaluation des substances chimiques et préparations dangereuses : citons notamment le règlement européen REACH qui est entré en vigueur le 01/06/2007 et qui oblige les fabricants ou importateurs du secteur de l'industrie chimique à évaluer, sous 11 ans, la toxicité et l'écotoxicité des substances mises sur le marché dans des proportions supérieures à 1 tonne/an (environ 30.000 substances) ;
- la gestion durable des sols contaminés : quelle que soit leur origine (friches industrielles, décharges publiques...), les sols contaminés présentent presque toujours la caractéristique d'être le siège d'une pollution mixte, dominée par la présence de composés organiques et/ou minéraux. Là encore, il est primordial de disposer d'outils biologiques qui puissent témoigner de l'efficacité des moyens de dépollution mis en œuvre, tout en explorant les éventuels effets indésirables (e.g. formation de composés toxiques suite aux procédés de décontamination) ;
- la caractérisation du potentiel écotoxique de matrices solides telles que les matières fertilisantes, les boues de station d'épuration, les déchets, etc...

Parmi les impacts environnementaux importants à caractériser, la génotoxicité (toxicité des contaminants environnementaux vis-à-vis du matériel génétique des êtres vivants) qui provoque l'altération de l'expression des gènes impliqués dans les fonctions métaboliques des organismes, peut perturber la dynamique des populations avec des conséquences sur le fonctionnement et la qualité des sols. Il est, par conséquent, primordial d'évaluer ces effets des micropolluants sur les êtres vivants à des concentrations sublétales.

Dans cette optique, cette thèse a pour objet l'étude des caractéristiques et des conséquences de la pollution diffuse des sols, ainsi que l'approfondissement de la compréhension des mécanismes de détoxification sur un modèle végétal, la fève *Vicia faba*, sur lequel nous avons optimisé deux tests de génotoxicité :

- Le test des micronoyaux permet d'évaluer l'aptitude d'un polluant à provoquer des ruptures chromosomiques. Il consiste en une observation microscopique des noyaux des cellules après coloration à l'acéto-orcéine. La présence dans le cytoplasme de petits éléments nucléaires appelés micronoyaux trahit une détérioration irréversible de l'ADN cellulaire.
- Le test des comètes permet de détecter au sein de l'ADN les dommages de type cassures double brin, simple brin ou sites alcali-labiles, ainsi que les sites d'excision-réparation incomplète et les ponts intercaténaux d'ADN (Gichner, 2006). Il consiste à réaliser une électrophorèse en gel d'agarose appliquée aux noyaux cellulaires d'un tissu vivant donné. L'électrophorèse permet de séparer les brins d'ADN en fonction de leur taille, Un logiciel dédié permet d'évaluer le pourcentage de dommages de l'ADN des noyaux étudiés.

L'un des objectifs primordiaux du présent travail est l'optimisation et la mise au point du test *Vicia*-micronoyaux, afin d'obtenir la normalisation ISO en phases liquide et solide. En effet, la norme française NF T90-327 (AFNOR 2004) décrit ce test sur cellules-filles méristématiques de racines secondaires de *Vicia faba*, mais uniquement en phase liquide. Elle ne reflète pas complètement la génotoxicité d'un sol, car un extrait liquide ne contient que les substances susceptibles de migrer dans le solvant utilisé.

D'autre part, afin de connaître les conséquences à long terme de l'exposition à une concentration génotoxique d'un polluant sur le cycle de vie d'une plante, et ainsi caractériser la pertinence du test, nous avons étudié le cycle de vie entier de jeunes fèves exposées à une concentration induisant la formation de micronoyaux mais pas d'inhibition de la croissance racinaire. Des traits d'histoire de vie ont été suivis pendant toute la durée de vie des plantes et mis en relation avec les dommages génotoxiques constatés.

Enfin, le test des micronoyaux a été appliqué dans le cadre de projets conduits en partenariats avec d'autres laboratoires :

- Le GISFI

Le LIEBE est membre du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (GISFI, [<http://www.gisfi.fr>]) présidé par le Pr. Jean-Louis Morel, directeur du Laboratoire Sols et Environnement, UMR INPL/INRA, Vandœuvre lès Nancy . Parmi les projets de ce consortium, le programme MULTIPOLSITE, auquel nous avons participé au cours de l'année 2007, a pour but d'étudier le devenir d'un sol pollué par d'anciennes activités de cokerie (site de Neuves-Maisons, Meurthe-et-Moselle) à forte teneur en HAP et métaux.

- Le projet Nanoalter

Le LIEBE a été impliqué dans un projet initié par le Dr Jérôme Labille, Chargé de Recherche CNRS au Centre Européen de Recherches et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement (CEREGE) de l'Université Paul Cézanne (CNRS UMR 6635, Aix-en-Provence). Ce projet, appelé « Ecotoxicité des sous-produits d'altération de Nanomatériaux » ou Nanoalter, eut pour but de prévoir le devenir de nanoparticules dans l'environnement, leur dégradation et la toxicité de leurs sous-produits d'altération sur les écosystèmes. Il se concentre particulièrement sur des nanocomposites contenant des nanoparticules de dioxyde de titane  $TiO_2$  entrant dans la composition de crèmes solaires commerciales (T-Lite S-F<sup>®</sup>, BASF, Germany). Ces nanocomposites sont composées d'un coeur de  $TiO_2$  de forme rutile enrobé d'une couche d' $Al(OH)_3$  et d'une couche de polydiméthylsiloxane (PDMS ; aussi appelé diméthicone).

Le CEREGE d'Aix en Provence s'est chargé de faire subir un processus de vieillissement accéléré à ces nanocomposites, puis a fourni au LIEBE les sous-produits d'altérations (SPA) obtenus. Nous avons ensuite testé la toxicité de ces SPA sur notre modèle végétal *Vicia faba*.

Dans ce dernier projet, le test des micronoyaux a été complété par d'autres biomarqueurs afin d'éclaircir les mécanismes d'action des particules étudiées. Ainsi, nous avons réalisé des dosages de phytochélatines, qui sont des polymères du glutathion jouant un rôle actif dans la tolérance des plantes vis-à-vis de certains métaux. De plus, certains marqueurs du stress oxydant ainsi que l'activité du photosystème II ont été évalués en collaboration avec le Dr. Jean-François Masfaraud (LIEBE, Metz). D'autres tests ont été pris en charge par le CEREGE (micro-spectroscopie à fluorescence X, granulométrie, turbidimétrie).

Ce travail a donné lieu à trois manuscrits :

- Une première publication intitulée « Is there a relationship between early genotoxicity and life history traits in *Vicia faba* submitted to cadmium spiked soils? » et acceptée dans *Mutation research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*.
- Un deuxième manuscrit intitulé « Improvement of *Vicia*-micronucleus test for assessment of soil quality: a proposal for international standardization » soumise à *Environmental and Molecular Mutagenesis*.
- Un troisième manuscrit intitulé « Environmental impact of sunscreen nanomaterials: ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO<sub>2</sub> nanocomposites on *Vicia faba* » est en attente des corrections de certains co-auteurs avant d'être soumise.

# *Analyse bibliographique*

---



# **1 Intérêt et historique des tests sur plantes en écotoxicologie**

Les plantes sont directement exposées à la pollution des sols. Leur réseau racinaire possède une surface d'échange phénoménale, ce qui les rend particulièrement vulnérables aux polluants. De plus, leur capacité d'évitement est limitée (développement racinaire préférentiel) et leurs systèmes d'excrétion ne sont pas très performants (Hock and Elstner 2005).

Les analyses physicochimiques seules ne peuvent en aucun cas suffire à prédire la toxicité d'un sol (Chapman et al. 2010; Vasseur et al. 2008). Dans une revue déjà ancienne, Kapustka et Reporter (1993) ont rassemblé les arguments qui plaident pour l'utilisation des producteurs primaires terrestres en écotoxicologie. A la base des chaînes alimentaires, les plantes utilisent l'énergie solaire en la transformant en énergie chimique via la photosynthèse et permettent à cette énergie de pénétrer dans les chaînes alimentaires (mis à part les communautés vivant aux dépens de la chimiosynthèse). Outre ce rôle important, les plantes participent à d'importantes fonctions écologiques (habitat pour la faune sauvage, rôle anti-érosion dû à la canopée et au système racinaire, cycles biogéochimiques). Le fonctionnement et la stabilité des écosystèmes terrestres sont principalement dépendants de la richesse spécifique des végétaux et de leur composition (Hooper and Vitousek 1997).

Comme rappelé par Cotelle (1999), les plantes ont été utilisées par de nombreux auteurs pour évaluer au laboratoire la contamination des sols et d'autres matrices solides. Simples, bon marché et ne présentant aucun problème éthique, les tests sur plantes sont à inclure dans les batteries d'essais (Domene et al. 2008; Fernández et al. 2005; Lors et al. 2010; Pandard et al. 2006).

Les tests les plus utilisés sur plante entière sont les tests de génotoxicité, de germination et de croissance, mais il existe également des tests sur culture cellulaire ou sur pollen. Les cellules végétales en culture constituent des modèles intéressants, mais elles ne peuvent pas refléter ce qui se passe dans un organisme entier, et notamment prendre en compte les cinétiques



d'absorption, de distribution et d'élimination. De plus, elles nécessitent des milieux de culture complexes susceptibles d'interagir avec les produits testés.

En 1979, le programme Gene-Tox est lancé par l'US Office of Toxic Substances de l'US Environmental Protection Agency (US-EPA). Son but est de déterminer les bioessais et les modèles à utiliser pour détecter les substances mutagènes ou cancérigènes. Parmi les tests sur plantes évalués, le test des aberrations chromosomiques sur cellules-filles méristématiques racinaires de *Vicia faba* et celui sur cellules-mères de pollen de *Tradescantia* semblent intéressants pour les screenings de substances mutagènes (Ma 1982).

En 1984, l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS, WHO en anglais) en collaboration avec le Programme des Nations Unies pour l'Environnement (PNUE, UNEP en anglais) lancent le Programme International sur la Sécurité des Substances Chimiques (IPCS, [<http://www.inchem.org>]). Un certain nombre de tests sur plantes ont été évalués dans ce cadre (Sandhu et al. 1994).

En 1994, l'International Program on Plant Bioassays est lancé par Te Hsiu Ma et l'année suivante est organisé en Chine le « Hands-on Workshop on Plant Bioassays for Global Environment » sous la houlette du PNUE (Ma et al. 1997). Ces travaux ont été publiés par Mutation Research en 1999. Un autre workshop a été organisé en 2004 à la Western Illinois University afin de promouvoir ces tests au niveau international.

La revue de White et Claxton (2004) portant sur 1312 études de la génotoxicité de sols contaminés montre que 51% des études se font avec des organismes procaryotes et 49% avec des organismes eucaryotes, dont les plantes (37%). Malgré la pertinence écologique des plantes dans l'étude des sols, elles sont très peu utilisées dans les batteries de tests.

La fiabilité de 9 tests de mutagenèse sur plantes a été évaluée en comparaison avec les résultats trouvés dans le cadre du programme Gene-Tox de l'Environmental Protection Agency (U.S.) [<http://toxnet.nlm.nih.gov>] (Ennever et al. 1988). Les tests plantes se sont révélés très sensibles avec une très grande proportion de faux positifs, ce qui a fait dire à ces auteurs que les tests plantes manquaient de spécificité mais que leur valeur prédictive négative était intéressante. Rank et Nielsen (1997) ne sont pas du même avis, affirmant que si une molécule peut causer des dommages génotoxiques dans une cellule végétale, elle est

potentiellement génotoxique pour d'autres organismes. Tout en retrouvant cette sensibilité supérieure des cellules végétales par rapport aux cellules animales, Yi et Meng (2003) affirment que les tests de génotoxicité sur plantes peuvent au moins servir à la surveillance de la qualité environnementale. Grant (1994), quant à lui, déclare : “*The results from higher plant genetic assays could make a significant contribution in protecting the public from agents that can cause mutation and cancer. The advantages possessed by higher plant genetic assays, which are inexpensive and easy to handle, make them ideal for use by scientists in developing countries.*”

Wilke et al. (2008) proposent une batterie de biotests pour l'évaluation écotoxicologique des déchets dangereux où les tests sur plantes trouvent toute leur place. Il en ressort que le test de production de biomasse sur *Brassica rapa* est pertinent, mais pas le test de germination sur la même espèce (ISO 11269-2). D'autres batteries de tests ont été proposées, comprenant par exemple le test des aberrations chromosomiques sur *Allium cepa*, le test des micronoyaux sur *Tradescantia* sp. en plus du test des comètes et des micronoyaux sur lignée hépatocytaire humaine en vue d'apprécier la génotoxicité des désinfectants chlorés présents dans l'eau du robinet (Feretti et al. 2008). Kristen (1997) propose également l'utilisation d'une batterie de tests sur cellules animales et végétales pour évaluer la toxicité de produits pharmaceutiques ou cosmétiques. Pour cet auteur, même la génotoxicité pourrait être évaluée par des tests plantes.

## **2 Le modèle biologique *Vicia faba***

### **2.1 La plante**

#### **2.1.1 Classification**

Décrite par Linné en 1753, la fève *Vicia faba* L. (broad bean en anglais) est une plante dicotylédone herbacée originaire d'Asie ou du Moyen-Orient. Sa culture est très ancienne et pratiquée dans le monde entier.

Sa classification systématique est la suivante :

- Règne *Plantae*
- Sous-règne *Tracheobionta*
- Division *Magnoliophyta*
- Classe *Magnoliopsida*
- Sous-classe *Rosidae*
- Ordre des *Fabales*
- Famille des *Fabaceae*
- Genre *Vicia*
- Espèce *faba*

Il en existe 2 sous-espèces, *paucijuga* et *eu-faba*. Dans la sous-espèce *eu-faba* qui nous intéresse, on dénombre 3 variétés différentes (Gallais and Bannerot 1992) :

- *Vicia faba major*, la fève maraîchère à grosses graines destinées à la consommation humaine ;
- *Vicia faba minor*, la petite fève ou féverole utilisée pour l'alimentation du bétail ;
- *Vicia faba equina*, la fève à cheval à grains moyens aussi appelée féverole ou févette dans certaines régions. Comme son nom l'indique elle est également destinée à l'alimentation du bétail.

Nous avons choisi comme modèle expérimental la fève d'Aguadulce (eau douce en espagnol), un cultivar de *Vicia faba major* facile à se procurer en jardinerie et d'une bonne sensibilité aux polluants (Rahoui et al. 2008).

### **2.1.2 Aspect et particularités**

La Figure 1 représente l'aspect des feuilles, fleurs et fruits de *Vicia faba*. Il s'agit d'une plante robuste, grimpante, qui peut atteindre plus d'un mètre. Ses feuilles, composées de 2 à 7 folioles, sont alternes sur la tige de section carrée. Ses fleurs, disposées en racème (grappe), sont blanches avec un point noir sur les ailes, zygomorphes (à symétrie axiale) et hermaphrodites, à pollinisation entomophile. Sa floraison dépend de la photopériode et de la température (Evans 1959). Ses fruits sont des gousses, caractéristiques de la famille des Fabacées.

Comme chez tous les représentants de cette famille, connus sous le nom de légumineuses, les racines de la plante possèdent des nodules à l'intérieur desquelles des cellules géantes servent d'abri à une bactérie symbiotique, appartenant à l'espèce *Rhizobium leguminosarum*. Cette bactérie est capable de capter le diazote atmosphérique et de le fixer dans le sol sous forme d'ions utilisables par les plantes.



Figure 1 : Les différentes parties de la fève *Vicia faba* L. (Thomé 1885).

### 2.1.3 Culture

Cette plante méditerranéenne est peu exigeante sur le type de sol, à condition que ce dernier soit bien ensoleillé et pas trop acide. Son pH optimal se situe aux environs de 6,75, mais elle tolère bien les pH compris entre 5,5 et 8 (données personnelles). Sa température optimale de pousse se situe aux environs de 20°C.

Il s'agit d'une plante annuelle. Elle peut se semer sous des climats très cléments à l'entrée de l'hiver, en octobre ou novembre pour donner des fruits dès la mi-avril, dès février dans le sud de la France, mais sous des climats moins favorables il faudra attendre le mois de mars pour les semis et le mois de juin pour la récolte.

### 2.1.4 Caryotype et cycle cellulaire

Le caryotype de *Vicia faba* est très simple. Toutes les variétés de la plante sont diploïdes, et possèdent 6 paires de grands chromosomes, dont 5 paires de chromosomes acrocentriques et une paire de chromosomes métacentriques mesurant 15 µm de long, soit environ le double de la longueur des premiers (Duc 1997).

Le noyau de ses cellules renferme 26,7 pg d'ADN dont beaucoup d'hétérochromatine (Bennett 1976), ce qui est très élevé par rapport à beaucoup d'autres plantes. En comparaison, le pois *Pisum sativum* n'en possède que 9,8 pg (Grant and Owens 2001). Le cycle cellulaire normal de la plante est représenté dans la Figure 2. Il dure environ 19,3h au total (Evans and Scott 1963).

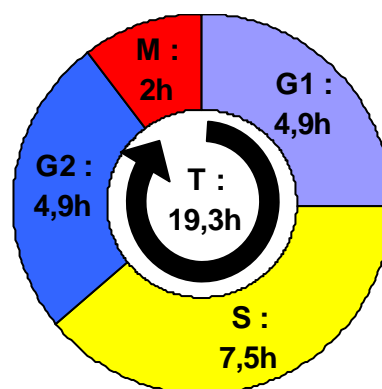


Figure 2 : Durée des principales étapes du cycle cellulaire des cellules méristématiques des racines primaires de *Vicia faba* var. Suttons' Prolific Longpod d'après Evans et Scott (1963). M : mitose ; G1, G2 : intervalles (gaps) ; S : synthèse d'ADN (réplication). Durée totale du cycle (T) : 19,3h.

## 2.2 Intérêt en écotoxicologie

Robuste, facile à se procurer et à faire germer, la fève permet, par la rapidité de sa germination et de sa croissance, de disposer très facilement de jeunes pousses dont les racines secondaires seront déjà utilisables pour les tests au bout d'une dizaine de jours seulement. De plus, cette plante, utilisée aussi en agriculture, peut pousser sur des sols de différentes natures, d'où son intérêt dans les expériences de terrain.

La fève est très sensible à la pollution du sol, ce qui en fait un modèle végétal très utilisé en écotoxicologie dans un grand nombre d'études. La simplicité de son caryotype l'a faite élire pour un grand nombre d'études de mutagénèse par le test des aberrations chromosomiques (De Marco et al. 1995; Kanaya et al. 1994; Sang and Li 2004). De plus, la grande quantité d'ADN contenue dans son noyau (Bennett 1976), la rend très sensible aux molécules génotoxiques (Ferrara et al. 2004). Ainsi, elle est l'un des modèles les plus utilisés dans le test des micronoyaux (cf. §4.1), pratiqué sur les cellules-filles de ses méristèmes racinaires (Cotelle 1999; Degrassi and Rizzoni 1982; Duan et al. 1999; Marcato-Romain et al. 2009). Un autre test de génotoxicité, le test des comètes, est également pratiqué sur différents tissus de la plante (Cotelle 1999; Koppen and Verschaeve 1996; Lin et al. 2007).

*Vicia faba* est en outre aussi employée pour étudier les réponses des marqueurs du stress oxydant (Radetski et al. 2004) et d'autres défenses antitoxiques de la plante comme les phytochélatines (cf. §5) (Béraud 2007).

En matière d'évaluation de la génotoxicité des sols pollués, les plantes les plus utilisées sont néanmoins celles des genres *Tradescantia*, *Allium*, *Zea* et *Arabidopsis*. L'utilisation de *Vicia faba* est moins fréquente (White and Claxton 2004).

Pour Ferrara et al. (2004), *Vicia faba* est un modèle plus sensible que *Pisum sativum* pour les tests de mutagénèse effectués sur l'hydrazide maléique (HM). Souguir et al. (2008) arrivent à la même constatation avec le cuivre, et l'expliquent par le fait que les chromosomes de la fève sont longs et fins, ce qui par un phénomène inexpliqué augmenterait leur sensibilité aux génotoxiques par rapport à ceux de *Pisum sativum*, plus courts.

Steinkellner et al. (1998) la trouvent plus sensible au plomb  $Pb(NO_3)_2$  en milieu liquide que *Allium cepa*, mais d'une sensibilité équivalente pour les autres métaux testés (arsenic  $As_2O_3$ , cadmium  $CdCl_2$ , cuivre  $CuSO_4$  et zinc  $ZnCl_2$ ). Ils concluent néanmoins à une sensibilité beaucoup moins intéressante des cellules méristématiques racinaires des deux fabacées

précitées par rapport aux cellules méiotiques des inflorescences de *Tradescantia sp.*. Ce résultat est confirmé par Knasmüller et al. (1998). En revanche, *Allium cepa* semble donner des résultats de sensibilité comparables à *Vicia faba* en matière de mutagénèse pour Yi et Meng (2003), mais selon Ünyayar et al. (2006), *Vicia faba* est plus sensible qu'*Allium sativum* pour le test micronoyaux sur le cadmium. *Vicia faba* est plus sensible que *Tradescantia* et *Allium cepa* pour d'autres auteurs (Cotelle et al. 1997; Cotelle et al. 1999; Monarca et al. 2003). Enfin, Manier et al. (2009) considèrent que *Vicia faba* est la plante la plus intéressante pour le test micronoyaux par exposition directe à un sol pollué ; de plus, sa chromatine est plus condensée que celle de *Trifolium repens*, ce qui donne une meilleure coloration et rend la lecture plus facile.

Les auteurs sont donc partagés en ce qui concerne le choix du modèle biologique, mais la plupart reconnaissent que *Vicia faba* est une plante très intéressante dans les études de génotoxicité.

### 3 Toxiques étudiés

#### 3.1 L'hydrazide maléique

##### 3.1.1 Structure et dénominations

L'hydrazide maléique (maleic hydrazide en anglais, CAS 123-33-1) est le nom le plus couramment utilisé pour désigner l'hydrazide cyclique de l'acide maléique ou maléohydrazide. Cette molécule dérivée de la pyridazine est un isomère de position de l'uracile. Elle possède trois formes tautomères représentées dans la Figure 3 (Swietlinska and Zuk 1978).

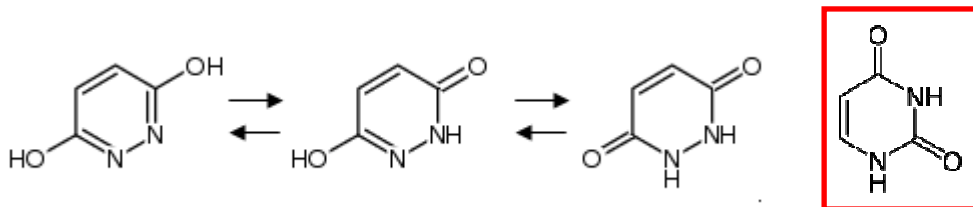


Figure 3 : Les trois formes tautomères de l'hydrazide maléique : forme dihydroxy (gauche), forme monohydroxy-monocéto (centre) et forme dicéto (droite). Encadré en rouge : 1,3H-uracile

Nous avons trouvé une dizaine de dénominations systématiques de la molécule ([<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>]), désignant indistinctement l'une ou l'autre de ses formes tautomères. Ainsi, le pyridazine-3,6-diol désigne la forme dihydroxy, mais on peut également trouver la 6-hydroxy-2H-pyridazine-3-one (forme monohydroxy-monocéto) ou encore la 1,2-dihydro-3,6-pyridazinedione (forme dicéto).

Les formes tautomères sont en équilibre les unes avec les autres, et leur concentration respective est fonction du solvant et du pH. En solution aqueuse, les formes dicéto et monohydroxy-monocéto sont d'importance égale, tandis que la forme dihydroxy est quasiment absente (Burton et al. 1993; Hofmann et al. 1991).

### 3.1.2 Propriétés physicochimiques

Les principales propriétés de l'hydrazide maléique (HM) sont répertoriées dans le rapport de la Commission Européenne du 2 Décembre 2002, SANCO/10501/2002-final (CE, 2002) et sur le site Toxnet [<http://toxnet.nlm.nih.gov/>]. Il se présente sous la forme d'une poudre blanche formée de cristaux allongés et translucides. Sa masse molaire est de 112,09 g/mol. Il est soluble dans l'eau jusqu'à une concentration de 4,51 g/L dans l'eau déminéralisée, à pH acide, mais il faut plusieurs heures pour sa dilution. Sa solubilité est environ 35 fois supérieure à pH supérieur ou égal à 7. Sa pression de vapeur est très faible : il est donc considéré comme non volatil. Il s'agit d'un acide faible dont le pKa à 20°C est d'environ 5,6.

L'HM semble relativement stable à l'hydrolyse, mais il peut être photosensible. D'après les données du site Toxnet [<http://toxnet.nlm.nih.gov/>], en solution, il est détruit en 48h par les rayons UV. Sa décomposition donne naissance à de nombreux composés peu toxiques, comme l'acide formique, l'acide succinique, l'acide maléique ou l'acide fumarique.

### 3.1.3 Utilisation et spécialités commerciales

Cette molécule est employée depuis 1950 comme herbicide, régulateur de la croissance végétale ou antigerminatif. Le Tableau I cite la liste exhaustive de toutes les spécialités commerciales contenant l'HM répertoriées sur le site du Ministère français de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche [<http://e-phy.agriculture.gouv.fr/mata/6493.htm>]. Ces spécialités se présentent sous la forme de granules dispersibles dans l'eau, de poudre mouillable, ou de liquide utilisable tel quel ou à diluer. Dans les spécialités FINALSAN ULTIMA et FINALSAN ULTIMA AF, l'hydrazide maléique est associé à de l'acide pélargonique aux concentrations respectives de 186,7 g/L et 31,02 g/L. Dans toutes les autres spécialités, l'hydrazide maléique est la seule substance active.



Dans les conditions normales d'utilisation, on peut calculer que les quantités retrouvées dans les sols des champs ou jardins après une utilisation normale de ces produits varient entre 2 et 4,83 mmol/m<sup>2</sup> (Tableau I, colonne de droite). Si on considère que l'HM pénètre dans le sol sur 10 cm, que la quantité présente dans les champs après traitement se situera théoriquement aux alentours de 20 à 48,3 mmol/m<sup>3</sup>.

L'HM est présenté par les fabricants comme un agent systémique (capable de diffuser dans tous les tissus de la plante) ayant des propriétés antigerminatives dues au blocage de la division cellulaire au niveau des méristèmes. Par contre, il est précisé que la molécule n'inhibe pas l'augmentation du volume des cellules, permettant une certaine croissance des tissus préexistants. Cette dernière propriété explique que les effets antigerminatifs se manifestent pour des doses (2 à 2,68 mmol/m<sup>2</sup>) deux fois inférieures à celles nécessaires pour obtenir un effet régulateur de croissance (4,83 mmol/m<sup>2</sup>).

L'effet herbicide n'est obtenu que pour 4,42 à 4,44 mmol/ m<sup>2</sup> d'HM associé à une concentration six fois supérieure d'acide pélargonique.

**Tableau I : Liste des spécialités commerciales contenant de l'hydrazide maléique autorisées à la vente en France. Dans la dernière colonne, nous avons calculé la quantité d'HM par m<sup>2</sup> sur champ traité avec la spécialité en question aux doses recommandées.**

<b>N° Autoris.</b>	<b>NOM COMMERCIAL (Fabricant)</b>	<b>Conc. HM</b>	<b>Usages</b>	<b>Doses</b>	<b>HM mmol/m<sup>2</sup></b>
8400425	FAZOR TUBERCLEAN J (Uniroyal Chemical)	600 g/kg	Antigerminatif ail, échalote, oignon	4 kg/ha	<b>2,14</b>
			Antigerminatif pommes de terre, défanage carottes	5 kg/ha	<b>2,68</b>
2090123	FINALSAN ULTIMA (Neudorff)	30 g/L	Désherbage jardins publics, allées de parcs et trottoirs	166 L/ha	<b>4,44</b>
2090124	FINALSAN ULTIMA AF (Neudorff)	4,95 g/L	Désherbage jardins publics, allées de parcs et trottoirs Usage autorisé dans les jardins	100 mL/m <sup>2</sup>	<b>4,42</b>
2060077	GERMISTOP (Top)	600 g/kg	Antigerminatif ail, échalote, oignon	4 kg/ha	<b>2,14</b>
			Antigerminatif pommes de terre, défanage carottes	5kg/ha	<b>2,68</b>
2090185	HIMALAYA 60 SG (Agriphar)	600 g/kg	Antigerminatif ail, échalote, oignon	4 kg/ha	<b>2,14</b>
			Antigerminatif pommes de terre	5kg/ha	<b>2,68</b>
2090183	ITCAN (Kreglinger)	600 g/L	Antigerminatif oignons	4 kg/ha	<b>2,14</b>
			Antigerminatif pommes de terre	5kg/ha	<b>2,68</b>
2030274	PERLOT (Uniroyal Chemical)	186,5 g/L	Ebourgeonnement chimique du tabac, traitement contre l'orobanche (plante parasite) du tabac	12 L/ha	<b>2,00</b>
			Limitation de la croissance des organes aériens	29 L/ha	<b>4,83</b>

### 3.1.4 Comportement dans les sols

D'après les informations trouvées sur Toxnet [<http://toxnet.nlm.nih.gov/>] et celles du rapport SANCO/10501/2002-final (CE, 2002), l'HM n'est pas rémanent dans les sols, car très rapidement dégradé par les microorganismes. En effet, suivant le type de sol, la demie-vie de la molécule atteint rarement 7 jours, et 13 jours maximum suffisent pour voir la dégradation de 90% du produit. Elle est plus stable en anaérobie, et relativement stable dans un sol stérile. Ses produits de dégradation permettent l'enrichissement du sol en composés nitrés (Swietlinska and Zuk 1978).

Dans les sols, l'HM est modérément à très mobile. Son  $K_{oc}$  peut varier énormément selon la nature du sol. Il est communément admis que plus le sol est argileux, moins la molécule y est mobile. En champ, l'HM semble ne pas migrer en dessous des dix premiers centimètres de sol. L'HM n'est pas lessivé dans les eaux de ruissellement car très rapidement dégradé.

### 3.1.5 Absorption, distribution, métabolisme dans la plante

L'HM est facilement absorbé par les feuilles ou les racines des plantes supérieures et rapidement distribué dans tous les tissus (Coupland and Peel 1971; Domir 1980; Frear and Swanson 1978; Smith et al. 1959). Cependant, il n'est pas fixé de la même façon dans toutes les parties de la plante. En effet, dans les racines du pois *Pisum sativum* et du maïs *Zea mais*, peu d'HM se fixe dans le méristème et 250 fois plus de molécules sont retrouvées dans les cellules basales, les plus anciennes. Toutefois, la quantité de molécules fixées dans les cellules en division est suffisante pour provoquer un effet (Noodén 1970).

La biodégradation de l'HM par le thé *Camellia sinensis* produit de nombreuses molécules peu toxiques (maléimide, acide succinique, acide lactique), mais également une molécule génotoxique pour les cellules animales et végétales, l'hydrazine (Biswas et al. 1967). Ce métabolite se révèle moins actif sur les cellules végétales que le produit de départ (Heindorff et al. 1984).

Le métabolite principal produit dans le tabac, l'orme d'Amérique *Ulmus americana* et les cellules en culture du soja *Glycine max*, du blé *Triticum aestivum* et du maïs *Zea mais* est le  $\beta$ -D-glucoside d'hydrazide maléique (Domir 1980; Frear and Swanson 1978; Komossa and Sandermann 1995).

(Frear and Swanson 1978) constatent que plus de 30% de l'HM administré par voie foliaire sur le tabac *Nicotiana tabacum* est rejeté tel quel dans le milieu par les racines au bout de 28 jours. Au bout de 7 jours, il reste encore entre 39 et 53% d'HM non transformé dans les tissus de la plante, proportion qui tombe entre 12 et 22% au bout de 28 jours.

Dans les racines du pois *Pisum sativum* et du maïs *Zea mais*, l'HM fixé dans les racines semble stable pendant au moins 7 jours (Noodén 1970).

### **3.1.6 Toxicité sur la cellule végétale et mode d'action**

Le mode d'action toxique de l'hydrazide maléique semble très différent de celui des agents génotoxiques les plus connus, comme le paraquat, l'éthylméthanesulfonate, la N-méthyl-N-nitrosourée ou le chlorure de méthylmercure (Angelis et al. 1986; Patra et al. 2000; Patra et al. 1997; Patra et al. 2005). Il est complexe et mal compris ; de plus, certaines études sont contradictoires.

Etant un isomère de l'uracile, l'HM est très vite intégré dans la cellule et concentré dans le noyau mais ne semble pas se fixer directement sur l'ADN (Appleton et al. 1981). Chez *Allium cernuum* et *Vicia faba*, on retrouve l'HM marqué au carbone 14 plutôt concentré dans le nucléole à 72h, d'où il disparaît ensuite progressivement. En revanche, il est stable 3 semaines dans le reste du noyau (Callaghan and Grun 1961).

Il semble s'intégrer à l'ARN, mais à la place d'une autre base pyrimidique que l'uracile, la cytosine (Appleton et al. 1981). Une autre étude nous apprend cependant, sans remettre en cause l'entrée de l'HM dans le noyau, que la majorité du produit se fixe plutôt sur la paroi cellulaire (Noodén 1970). Selon la même étude, son entrée dans la cellule et sa fixation nécessiteraient de l'énergie.

On sait qu'il ralentit considérablement le cycle cellulaire en inhibant la réplication de l'ADN (phase S du cycle), expliquant ainsi son action antigerminative (Evans and Scott 1963). En effet, s'il inhibe efficacement la division cellulaire, il n'empêche pas le grossissement des cellules (Noodén 1969). Son interférence avec la duplication de l'ADN provoque également de graves effets génotoxiques dans les cellules végétales. Ces effets sont dits S-dépendants, car ils n'apparaissent que si la cellule subit une phase de synthèse d'ADN après exposition. Une cellule exposée en phase G2 de son cycle ne montrera donc pas de dommages

chromosomiques immédiatement visibles à la mitose, mais ces derniers se manifesteront à la fin du cycle suivant (Evans and Scott 1963).

L'action génotoxique de l'HM mène à l'observation de chromosomes fragmentés ou délaissés, de ponts chromosomiques, de cellules aberrantes ou de micronoyaux (Rank and Nielsen 1997). Les aberrations chromosomiques qu'il provoque sont visibles lors de toutes les phases de la mitose : un « stekinesis », c'est-à-dire une agglomération des chromosomes en fin de prophase et en métaphase, qui mène ensuite à la formation de ponts chromosomiques à l'anaphase puis à la fragmentation des chromosomes. Le « stekinesis » peut également provoquer la délétion d'une chromatide à l'anaphase ou la non-séparation des chromatides (Marcano et al. 2004). Ses effets clastogènes et aneugènes (cf. Figure 4 p 33) induisent à la fin du cycle mitotique un grand nombre de micronoyaux facilement observables au niveau des racines de *Vicia faba* ou d'*Allium cepa* (De Marco et al. 1995; Marcano et al. 2004).

Selon Marcano et al. (2004), les anomalies qu'il provoque au niveau de la structure du nucléole seraient caractéristiques d'un inhibiteur transcriptionnel de l'ADN, confirmant l'hypothèse déjà formulée par Evans et Scott en 1963. Il empêcherait la réparation de l'ADN par les ADN polymérase. De plus, il interférerait avec la liaison des différents réplicons lors de la réplication de l'ADN (Angelis et al. 1986).

La génération de radicaux libres et le stress oxydatif semblent également jouer un rôle dans sa toxicité (Heindorff et al. 1985; Panda et al. 1995; Ruiz Flores et al. 2003). Un mécanisme d'action indirect était déjà soupçonné par Heindorff et al. (1984). Finalement, son mécanisme d'action serait médié par deux voies différentes, l'une passant par la création de dommages à l'ADN et l'autre non (Patra et al. 2005).

Les dommages génotoxiques qu'il provoque ne sont pas répartis au hasard (Angelis et al. 1986) et sont spécifiques de certains *loci* ; ainsi les aberrations chromosomiques sont-elles retrouvées en majorité dans les sections de chromosomes correspondant à l'hétérochromatine. Chez *Vicia faba*, un « hot spot » a été mis en évidence au niveau du segment 4 du seul chromosome métacentrique que compte la plante (Heindorff and Rieger 1984). Aucune spécificité n'a cependant été retrouvée pour la concentration de l'HM dans les *loci* connus pour contenir de l'hétérochromatine chez *Vicia faba* (Callaghan and Grun 1961).

Fait étrange, l'HM ne provoque pas de dommages à l'ADN visible par le test des comètes (Gichner et al. 2000a; Menke et al. 2001).

En outre, l'HM diminue le taux de lipides et augmente la proportion d'acides gras saturés par rapport aux insaturés dans les tubercules de la pomme de terre *Solanum tuberosum* (Mueller and Mondy 1977) et augmente leur teneur en azote sous forme de nitrates (Ponnampalam and Mondy 1985). Il serait également inhibiteur d'un certain nombre d'enzymes de la cellule végétale, et interférerait avec certaines hormones comme les auxines (Swietlinska and Zuk 1978).

La plupart des plantes semblent sensibles à son action clastogène (Swietlinska and Zuk 1978), sauf *Arabidopsis thaliana* qui semble relativement résistante (Gichner et al. 1994). La croissance du coton semble également peu affectée par le produit (Currier and Crafts 1950). En règle générale, en terme d'inhibition de croissance l'HM est plus efficace sur les jeunes plantes que sur les anciennes.

La bonne corrélation concentration-effet et la reproductibilité de ses effets clastogènes ont fait élire la molécule d'hydrazide maléique comme toxique de référence pour l'élaboration de la norme micronoyaux en milieu liquide sur racines secondaires de *Vicia faba* (AFNOR 2004). L'HM est aussi souvent utilisée comme témoin positif pour les études de génotoxicité de matrices contaminées (El Hajjouji et al. 2007; Marcato-Romain et al. 2009; Souguir et al. 2008).

### **3.1.7 Facteurs susceptibles de modifier sa toxicité**

L'action génotoxique de l'HM dépend du pH et du type de sol. Elle est augmentée en milieu acide (Heindorff and Rieger 1984) pour une exposition en hydroponie, mais cet effet est moins clair pour une exposition en milieu solide. Dans ce cas, le pH est un facteur moins important que la teneur en matières organiques et en argile, qui diminuent drastiquement la toxicité de l'HM. Si l'argile n'agit que comme un chélatant diminuant la biodisponibilité de l'HM, le mécanisme d'action des acides organiques est plus complexe (De Marco et al. 1995). En effet, la présence d'acides humiques et fulviques diminuent le pouvoir mutagène de l'HM sans que cette propriété soit due à son adsorption ou à la diminution de sa biodisponibilité (Ferrara et al. 2004; Ferrara et al. 2000). Cette protection peut être levée par la buthionine

sulfoximine (BSO ; inhibiteur de la synthèse du glutathion), ce qui suggère un rôle du GSH ou des phytochélatines (cf. § 5) (De Marco et al. 1999).

Il a été constaté qu'un préconditionnement d'une heure avec du  $\text{CdSO}_4$  à  $4.10^{-7}$  ou  $4.10^{-6}\text{M}$  pouvait inhiber très significativement la formation de micronoyaux dans les racines d'*Allium cepa* exposées 3h à  $5.10^{-3}\text{M}$  d'HM, et ceci même lorsque l'exposition a lieu 48h après le préconditionnement. Il est possible d'inhiber cette protection par une exposition de 2h au cycloheximide (inhibiteur de synthèse protéique) à  $10^{-7}\text{M}$  ou à la BSO à  $10^{-4}\text{M}$ , mais uniquement lorsque l'exposition à ces inhibiteurs métaboliques a lieu avant le préconditionnement au cadmium. Ces résultats amènent les auteurs à penser que les phytochélatines jouent un rôle protecteur contre la génotoxicité de l'HM. D'autres protéines seraient également nécessaires (Panda et al. 1997). Le même type de conditionnement avec  $\text{NiCl}_2$  induit la même protection chez *Vicia faba*, effet également annulé par la BSO (Rieger et al. 1990), ce qui n'est pas surprenant étant donné que comme les ions  $\text{Cd}^{2+}$ , les ions  $\text{Ni}^{2+}$  sont des inducteurs de la synthèse des phytochélatines. D'autres études ont montré que les ions métalliques  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  et  $\text{Zn}^{2+}$ , tous inducteurs de la synthèse de phytochélatines, induisent une réponse adaptative contre la génotoxicité de l'HM chez *Vicia faba*, *Allium cepa* ou *Hordeum vulgare* (références citées par Patra et al. (2000)).

La densité par unité de surface a également un effet, car dans le cas de fèves plantées trop près les unes des autres, on peut constater une diminution du nombre de micronoyaux dans les racines primaires de *Vicia faba* exposée à l'HM, sans que ne soit impliqué un quelconque rôle du GSH ou des PC (De Marco et al. 2005), car le prétraitement à la BSO n'a pas modifié le résultat.

## **3.2 Le cadmium**

### **3.2.1 Généralités**

Le cadmium (Cd) est un métal de transition (numéro atomique 48) de masse molaire 112,4 g/mol et de densité  $8,69\text{ g.cm}^{-3}$ . Il fut découvert en Allemagne début 1818 dans un minerai de zinc auquel il est souvent associé dans la nature. Son nom vient de *cadmia fossilis*, qui désignait anciennement le minerai de zinc (Berzelius 1839).

Les émissions anthropiques de ce métal seraient d'environ 29.190 tonnes/an (Sanità di Toppi and Gabbrielli 1999).

A l'état oxydé, l'ion cadmium  $\text{Cd}^{2+}$  associé à un anion (souvent chlorure ou nitrate) forme un sel hautement soluble dans l'eau.

Le cadmium n'est pas un métal essentiel à la vie : il est toxique pour les écosystèmes.

### 3.2.2 Comportement dans les sols et biodisponibilité

Dans les sols, les ions  $\text{Cd}^{2+}$  se trouvent souvent en grande partie voire très majoritairement sous forme mobile ou aisément mobilisable. Ils peuvent se lier à l'argile et aux acides humiques chargés négativement, ou former des complexes avec les oxydes de fer ou de manganèse (Barančíková and Makovníková 2003; Nowack et al. 2010). Leur biodisponibilité, donc leur toxicité diminue lorsque la CEC du sol augmente (Babich and Stotzky 1977; Figueroa et al. 2008). Ils sont donc plus toxiques pour les organismes vivants dans un sol sableux que dans un sol argileux (Lock and Janssen 2001). Leur biodisponibilité augmente également lorsque le pH diminue (Liang et al. 2005) et lorsque la force ionique du milieu augmente. En particulier, les ions  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  entrent en compétition avec les ions  $\text{Cd}^{2+}$  pour les mêmes sites de liaison et augmentent leur fraction libre (Hansen and Maya 1997). Les ions phosphate  $\text{PO}_4^{3-}$  quant à eux ralentissent l'absorption du cadmium (Wang et al. 2008). Sa toxicité est également diminuée par le silicium sans qu'on puisse en expliquer le mécanisme exact, et qui ne passe pas complètement par une réduction de sa biodisponibilité (Liang et al. 2005). De manière générale, plus le sol est riche en nutriments (N, P, S) et en oligo-éléments (Zn, Ca, Mn, Mg, Si), moins le cadmium sera toxique pour les plantes. Ceci est dû à la diminution de sa biodisponibilité, mais aussi à la concurrence avec les autres cations divalents pour les transporteurs, et également tout simplement à une meilleure résistance des plantes lorsqu'elles ne subissent pas de carence (Sarwar et al. 2010).

Un dernier facteur est susceptible de modifier la biodisponibilité du cadmium dans les sols : le temps. En effet, Hamon et al. (1998) constatent que des liaisons peu réversibles se forment au fil du temps entre une petite fraction de ces ions et les constituants du sol, ce qui rend le métal de moins en moins biodisponible au fil des ans. Dans le sol concerné par cette étude, entre 1 et 1,5% du cadmium apporté reste fixé au moins plusieurs dizaines d'années dans les dix premiers centimètres de la couche de sol, sans être lessivés par les pluies.

### 3.2.3 Absorption et distribution dans la plante

On retrouve généralement la plus forte concentration de cadmium dans les racines (Page et al. 2006; Weigel and Jager 1980), et c'est là que les dommages génotoxiques sont logiquement



les plus sévères (Gichner et al. 2004). Cette concentration diminue dans la plante au fur et à mesure que l'on considère des parties plus éloignées de la racine. Les fruits peuvent donc être quasiment épargnés par la contamination (Wu et al. 2004; Wu and Zhang 2002).

Certaines études évoquent un stockage du cadmium sur la paroi cellulaire des racines (Sela et al. 1988; Vázquez et al. 2009), mais il semblerait que chez le haricot *Phaseolus vulgaris*, la majorité du cadmium se retrouve dans le cytosol fixé sur des peptides. Très peu d'ions restent à l'état libre (Weigel and Jager 1980). Le cadmium semble traverser la membrane plasmique en empruntant les canaux calciques (Perfus-Barbeoch et al. 2002). Sa similarité avec le calcium ou le zinc lui permet de se fixer à leur place et d'inhiber les fonctions métaboliques correspondantes. Il peut ainsi se fixer sur la calmoduline.

Le cadmium est l'un des inducteurs les plus efficaces de la synthèse de phytochélatines, molécules capables de chélater la plupart des métaux ou métalloïdes et de les stocker dans la vacuole (cf. § 5), qui permettent de diminuer sa toxicité. Le glutathion joue également un rôle dans sa détoxification (Zhu et al. 1999). Il est également pris en charge par des protéines chaperon ou HSP, dites de choc thermique (Prasad 1995).

Liu et al. (2003b) trouvent une corrélation positive entre la concentration de cadmium et celle de cuivre, zinc et fer, mettant en évidence une synergie entre l'absorption de ces différents métaux.

Il a été montré que le calcium, et dans une moindre mesure le zinc et le sélénium, ont une action protectrice sur les effets du cadmium vis-à-vis de l'orge *Hordeum vulgare* (Zhang and Xiao 1998).

### **3.2.4 Effets sur la cellule végétale**

La sensibilité des plantes aux effets du cadmium est très variable d'une espèce à l'autre, et même d'un cultivar à l'autre au sein d'une même espèce (Liu et al. 2003b; Wu and Zhang 2002). Il est possible de sélectionner des cultivars de plantes (e.g. *Oryza sativa*) accumulant peu de métaux dans leurs parties comestibles (Yu et al. 2006).

Le cadmium diminue la croissance des racines et, dans une moindre mesure, des feuilles. Les racines exposées à cet élément peuvent être atrophiées, noircir et devenir cassantes, tandis que les feuilles peuvent porter des signes de nécrose. Il diminue également l'indice mitotique des

méristèmes racinaires, montrant un effet cytotoxique (Béraud et al. 2007; Ünyayar et al. 2006).

Le cadmium diminue le taux de chlorophylle de *Vicia faba*, mais en fonction de sa concentration, il peut augmenter ou diminuer l'efficacité de la photosynthèse et donc permettre de compenser la diminution du taux de chlorophylle (Karavaev et al. 2001). Il provoque également la fermeture des stomates et une perturbation du métabolisme hydrique des plantes (Perfus-Barbeoch et al. 2002; Poschenrieder et al. 1989).

Ces effets seraient en partie dûs à une interférence des ions  $\text{Cd}^{2+}$  avec l'absorption de certains nutriments, comme le zinc (Aravind and Prasad 2003; Hart et al. 2002). Cette interférence a pour conséquence la diminution du métabolisme de la plante et une modification du protéome (Gianazza et al. 2007).

### 3.2.5 Effets génotoxiques

Borboa et De La Torre (1996) observent l'apparition de ponts et d'adhérences chromosomiques lors de l'ana-télophase de cellules méristématiques sur des racines de *Allium cepa* exposées durant 20h à une concentration de  $3 \cdot 10^{-5}$  M de  $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ .

Un phénomène semblable est observé au niveau des méristèmes des racines de *Pisum sativum* (Fusconi et al. 2006). Un traitement de 48h à des concentrations situées entre 0,25 et  $1 \mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  provoque des altérations chromosomiques observables au cours de la mitose sous différentes formes :

- chromosomes en métaphase «agglomérés» ;
- ponts chromosomiques à l'anaphase et à la télophase ;
- fragmentation des chromosomes à la métaphase suivante.

Ces altérations peuvent donner lieu à la formation de micronoyaux (Béraud et al. 2007; Cordova Rosa et al. 2003; De Marco et al. 1988; Ünyayar et al. 2006). Comme pour l'hydrazide maléique, ces micronoyaux sont dus à l'exclusion hors du noyau de chromosomes, chromatides ou fragments de chromosomes engendrés par l'action clastogène et aneugène de la substance (cf. §4.1) (De Marco et al. 1988). Cependant, les micronoyaux induits par le cadmium sont plus petits et souvent liés au noyau principal (Liu et al. 2003a).

La génotoxicité du cadmium est aussi mise en évidence par le test des comètes sur *Vicia faba* en milieu liquide (Koppen and Verschaeve 1996; Lin et al. 2007) et en milieu solide (Gichner et al. 2008; Lin et al. 2005).

Pour tenter d'élucider le mécanisme par lequel ce métal cause des dommages génotoxiques, on peut avancer deux hypothèses :

- une interaction directe avec l'ADN : Hossain et Huq (2002) ont en effet démontré que le cadmium pouvait se fixer sur les bases G, A et T de l'ADN ;
- un mécanisme indirect : contrairement au fer et au cuivre, ce métal ne semble pas catalyser les réactions de Fenton ou d'Haber-Weiss (Salin 1988). Il agit donc en diminuant les niveaux des enzymes et de divers composés antioxydants, provoquant ainsi une augmentation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracellulaire (Misra et al. 1998), entraînant un stress oxydant et des dégâts à l'ADN (Ercal et al. 2001). A cela s'ajoute l'inhibition des enzymes de réparation de l'ADN (Hartwig 1998).

Parmi ces deux mécanismes d'action, Gichner et al. (2004) ont prouvé que les dommages causés à l'ADN visibles par le test des comètes étaient majoritairement causés de façon indirecte. En effet, en exposant des racines de *Nicotiana tabacum* pendant 2h à des concentrations comprises entre 0,2 et 1,6 mM de cadmium, ces auteurs ont trouvé une augmentation concentration-dépendante des dommages génotoxiques. En revanche, en exposant aux mêmes concentrations les noyaux de racines témoins dépourvus de leur cytoplasme, ils ne constatent quasiment aucun dommage. La génotoxicité du cadmium serait donc principalement médiée par un mécanisme indirect impliquant des réactions cytoplasmiques, donc sans doute due en grande partie au stress oxydant.

Cette théorie est étayée par plusieurs études dont celle de Zhang et al. (2009) qui montrent que dans les feuilles de *Vicia faba* et *Phaseolus aureus* exposées aux ions Cd<sup>2+</sup>, il existe une production d'anions superoxyde O<sub>2</sub><sup>•-</sup> et de peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Plusieurs antiradicalaires se sont montrés efficaces pour prévenir les nécroses foliaires engendrées par le métal. Chez *Vicia faba*, le niveau de stress oxydant est également corrélé avec les dommages génotoxiques des feuilles (Lin et al. 2007). Dans les racines de *Pinus sylvestris*, le cadmium accélère la lignification et crée une accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> due à la diminution des activités des enzymes de détoxification (Schützendübel et al. 2001). Chez *Arabidopsis thaliana*, le peroxyde d'hydrogène est le principal agent responsable du stress oxydant et donc

des dommages causés par le cadmium. Son accumulation est également due à la défaillance des enzymes et des systèmes de détoxification cellulaires (Cho and Seo 2005).

Chez *Pisum sativum*, le cadmium est responsable de l'augmentation du stress oxydant, de troubles du métabolisme hydrique, de diminution de la chlorophylle totale, de diminution des macronutriments (Ca, Mg, P, N, K) surtout dans les feuilles, d'une désorganisation de la structure foliaire et d'une fermeture des stomates (Sandalio et al. 2001). La luzerne (*Medicago sativa*) exposée au cadmium augmente également son arsenal antioxydant (ascorbate peroxydase, glutathion reductase, taux de glutathion, de PCs et ascorbate) tandis que ses parties aériennes subissent une augmentation de la peroxydation lipidique et une diminution du taux de chlorophylle totale (Sobrino-Plata et al. 2009).

L'exposition au cadmium diminue la concentration en glutathion réduit surtout dans les cellules racinaires. Cette diminution est expliquée par le rôle de détoxification du GSH vis-à-vis des métaux et des radicaux libres qu'ils produisent et par le fait qu'il est consommé pour la synthèse des phytochélatines (cf. §5). Il existe également une diminution du taux d'acide ascorbique cellulaire et une modification des concentrations de certains acides aminés (Wu et al. 2004). Les enzymes du stress oxydant voient leur activité augmentée à faible concentration, puis diminuée aux plus fortes (Cordova Rosa et al. 2003; Szöllösi et al. 2009), et la peroxydation lipidique due aux radicaux libres produits par le métal est indiquée par l'augmentation du taux de malonedialdéhyde (Sun et al. 2008; Ünyayar et al. 2006).

### **3.3 Le cuivre**

#### **3.3.1 Généralités**

De numéro atomique 29 et de masse molaire 63,5 g/mol, le cuivre est un métal de transition connu depuis l'antiquité. Son nom vient de l'île de Chypre où les Grecs et les Romains exploitaient ses gisements (Berzelius 1839).

L'ion le plus stable en solution est l'ion cuivrique  $\text{Cu}^{2+}$ , qui associé à un anion forme un sel hautement soluble dans l'eau. Contrairement au cuivre à l'état solide de couleur rouge orangée, l'ion cuivrique est bleu en solution aqueuse.

Le cuivre est un métal essentiel à la vie, mais comme toute substance, il devient toxique à trop forte dose. Un sol contenant moins de 1 à 2 mg/kg de cuivre extractible à l'EDTA (NF X31-120, novembre 1992), soit 16 à 31  $\mu\text{mol/kg}$ , est considéré comme pauvre en cuivre. Les

plantes qui y poussent risquent des carences. Le seuil de toxicité varie en fonction des sols et des auteurs entre 50 et 120 mg/kg de cuivre extractible à l'EDTA, soit 0,8 à 1,9 mmol/kg (Baize et al. 2006).

### 3.3.2 La bouillie bordelaise

Mélange de chaux éteinte ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) et de sulfate de cuivre ( $\text{CuSO}_4$ ), la bouillie bordelaise (burgundy mixture ou Bordeaux mixture en anglais) a longtemps été présentée comme une panacée en agriculture biologique. En effet, le cuivre est toxique pour les champignons, et empêche donc le développement des maladies cryptogamiques des plantes dont la plus connue est le mildiou. Elle est l'un des rares pesticides autorisés en agriculture biologique.

Elle contient entre 10 et 20 g/L de sulfate de cuivre, soit en admettant que le produit de base est la poudre pentahydratée (poudre bleue à dissolution instantanée), 40 à 80 mmol/L.

En agriculture biologique, un maximum de 6 kg de cuivre par hectare et par an est autorisé (CE 2008), [<http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/LexUriServ-1.pdf>], p37) soit 94,5 mol s'il s'agit de cuivre pur, ce qui correspond à un épandage aux alentours de  $9,5 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{an}^{-1}$ .

Année après année, le cuivre s'accumule dans le sol. Biologiques ou non, les vignobles sont particulièrement touchés. Dans deux études portant sur des vignobles français du sud de la France (département de l'Hérault), les concentrations en cuivre se situent entre 20 et 251 mg/kg (Brun et al. 2001; Brun et al. 1998), soit entre 0,3 et 40 mmol/kg.

### 3.3.3 Comportement dans les sols et biodisponibilité

Dans les sols, la fraction mobile ou aisément mobilisable du cuivre est souvent très faible, bien inférieure à celle du cadmium (Barančíková and Makovníková 2003; Nowack et al. 2010). Comme pour le cadmium, sa biodisponibilité dépend étroitement des propriétés physicochimiques (pH), de la granulométrie et de la composition desdits sols. Un pH acide favorise sa mobilité et sa biodisponibilité (Sauvé et al. 1997; Temminghoff et al. 1997). De plus, l'absorption est d'autant plus importante que la CEC du sol diminue (Brun et al. 2001). La biodisponibilité des ions  $\text{Cu}^{2+}$  est limitée par sa fixation sur les acides humiques et sa complexation avec les oxydes de fer et de manganèse (Barančíková and Makovníková 2003; Nowack et al. 2010). La présence de calcium dans les sols freinerait également l'absorption des ions cuivre par les végétaux (Alva et al. 1993).

Parmi tous ces paramètres, la toxicité du cuivre vis-à-vis du blé cultivé en plein champ serait surtout corrélée au pH et au contenu en carbone organique du sol (Warne et al. 2008).

La mobilité du cuivre dans les sols peut paradoxalement être favorisée par sa fixation sur la matière organique lorsque cette dernière est sous forme dissoute ou mobile (McCarthy and Zachara 1989; Temminghoff et al. 1997). Les argiles sont également des phases fixatrices de métaux (Besnard et al. 2001), mais elles peuvent ainsi permettre leur dissémination de par leur petite taille qui leur permet d'être aisément transportées par le vent. Ceci est particulièrement vrai dans le cas du cuivre (Madrid et al. 2008).

### **3.3.4 Absorption et distribution dans la plante**

Le cuivre reste fixé en majorité dans la racine des plantes (Brun et al. 2001; Sela et al. 1988), stocké surtout sur les parois cellulaires (Sela et al. 1988). Le fait que certaines cellules racinaires soient très affectées et d'autres pas laisse supposer que *Zea mais* possède un mécanisme de défense basé sur le « sacrifice » de certaines cellules qui accumulent le métal afin de préserver les autres (Ouzounidou et al. 1995). Chez *Phaseolus vulgaris*, le cuivre est fixé majoritairement dans les feuilles aux concentrations bénéfiques alors qu'il est stocké dans la racine aux concentrations toxiques (Cook et al. 1997). Chez cette espèce, il est transloqué vers l'étage foliaire inférieur dès 48h d'exposition (Cuypers et al. 2000).

Aux concentrations bénéfiques pour la plante, le cuivre possède plusieurs familles de transporteurs (Markossian and Kurganov 2003; Sancenón et al. 2003).

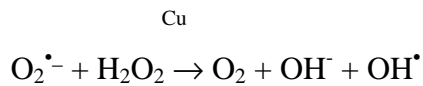
Aux concentrations toxiques, d'autres mécanismes se mettent en place. Comme le cadmium, le cuivre est un inducteur de la synthèse de phytochélatines, mais dans une moindre mesure (Hall 2002; Zenk 1996). Les PC peuvent le chélater et le stocker dans la vacuole afin de le détoxifier (cf. §5). Chez la tomate *Lycopersicon esculentum*, il induit la synthèse de nicotianamine, un acide aminé supposé prendre en charge le transport et/ou la détoxification du métal. La nicotianamine serait la molécule permettant la translocation du cuivre des racines jusqu'aux feuilles par le xylème (Pich and Scholz 1996).

### **3.3.5 Effets toxiques sur la cellule végétale**

Exposées à une concentration excessive de cuivre, les plantes sensibles subissent un ralentissement de leur croissance et un stress oxydatif qui influe sur les activités des enzymes de détoxification des radicaux libres et augmente la peroxydation lipidique (Cuypers et al.

2000; Landberg and Greger 2002). Il existe également une augmentation des agents antioxydants comme le GSH et l'ascorbate dans les cellules (Gupta et al. 1999; Upadhyay and Panda 2009; Wang et al. 2004).

On sait en effet que le cuivre catalyse la réaction d'Haber-Weiss (Haber and Weiss 1934) dans les cellules, libérant des espèces réactives de l'oxygène :



Ce stress oxydant induit une chlorose et une nécrose des feuilles (Drażkiewicz et al. 2004). Le métabolisme hydrique est également perturbé, et le taux de protéines est diminué (Jouili and El Ferjani 2003). Il perturbe le métabolisme lipidique et la structure membranaire (Ouariti et al. 1997). Le cuivre peut augmenter ou diminuer le taux de chlorophylle foliaire et modifie la fluorescence chlorophyllienne et l'activité du photosystème II (Cook et al. 1997; Pätsikkä et al. 2002). L'excès de cuivre a également un effet cytotoxique, qui se manifeste par une diminution de l'indice mitotique des cellules méristématiques racinaires (Yildiz et al. 2009).

Comme le cadmium, le cuivre peut être génotoxique, et causer des aberrations chromosomiques visibles au cours de la mitose, à type de ponts chromosomiques ou de métaphases « collantes » conduisant à une fragmentation des chromosomes (effet clastogène). Il désorganise également le fuseau mitotique, provoquant des délétions chromosomiques (effet aneugène) (Souguir et al. 2008; Yildiz et al. 2009). Ces deux derniers effets provoquent à la fin de la mitose la formation de micronoyaux. La fréquence de micronoyaux est augmentée dans les racines de *Vicia faba* et *Pisum sativum* à partir de 2,5 mM de CuSO<sub>4</sub> pour une exposition de 42h en milieu liquide. Par contre, d'après Steinkellner et al. (1998), le sulfate de cuivre n'induit pas de micronoyaux dans les cellules filles méristématiques de *Vicia faba* et *Allium cepa* après une exposition de 2h en milieu liquide suivie d'une période de récupération de 36h, pour des concentrations allant jusqu'à 125 mM.

Le cuivre cause également des dommages génotoxiques visibles par le test des comètes dans les méristèmes racinaires d'*Allium cepa* (Yildiz et al. 2009).

Les effets génotoxiques sont vraisemblablement causés par les radicaux libres et agents oxydants libérés par l'action du métal. Cette hypothèse est étayée par le fait que l'induction de

micronoyaux dans les racines de *Vicia faba* est inhibée par un extrait de betterave rouge aux propriétés antioxydantes (Posmyk et al. 2008).

### **3.4 Les nanoparticules**

#### **3.4.1 Définition et propriétés physico-chimiques**

La définition la plus communément admise est la suivante : est appelée nanoparticule toute particule dont au moins une dimension est inférieure à 100 nm (Kahru et al. 2008; Masciangioli and Zhang 2003; Navarro et al. 2008), quelle que soit sa nature ou sa structure. Cependant, le SCENIHR<sup>1</sup>, en 2007, donne la définition suivante : « *a discrete entity that has three dimensions of the order of 100 nm or less* », tandis que Nowack et Bucheli (2007) les définissent comme « *substances that are less than 100 nm in size in more than one dimension* ».

La petite taille des nanoparticules leur confère des propriétés différentes de celles que possède habituellement le même matériau plus grossièrement divisé (Chiang et al. 2006; Daniel and Astruc 2003; Wang and Ro 2006). En effet, plus les particules sont petites, plus le rapport surface/volume est élevé (i.e. augmentation de la surface d'échange disponible pour une même masse de matériau), et plus le matériau est réactif (Auffan et al. 2008; Haruta 1997).

Les propriétés des nanoparticules sont très diverses et recherchées par les industriels de nombreux secteurs : plastiques, peintures, composants électroniques, cosmétiques...

#### **3.4.2 Ecotoxicologie**

Le devenir de tous ces nanomatériaux une fois relargués dans l'environnement et leurs effets vis-à-vis des êtres vivants et des écosystèmes sont encore mal connus. Sur ce point, la bibliographie est rare, souvent imprécise, voire contradictoire (Auffan et al. 2009; Baun et al. 2008a). Prévoir les propriétés des nanoparticules et donc leur écotoxicité est souvent difficile car leur étude se situe à l'interface entre la physique, la chimie et la biologie. Leur comportement en phase aqueuse et donc leur biodisponibilité dépend d'un grand nombre de facteurs, comme le pH, la force ionique et les propriétés inhérentes aux particules elles-mêmes, comme leur taille, leur nature ou leur charge de surface (Labille and Brant 2010) ; dans une matrice complexe naturelle, prévoir leur devenir est donc très hasardeux. Selon (Auffan et al. 2009), les mécanismes de toxicité des nanoparticules métalliques sont de trois

---

<sup>1</sup> Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risk



ordres : la dissolution pure et simple du métal, les propriétés catalytiques du métal et ses propriétés oxydoréductrices qui peuvent générer des espèces réactives de l'oxygène et un stress oxydant. La présence de nanoparticules peut en outre favoriser l'absorption d'autres polluants par les organismes vivants (Blaise et al. 2008; Sun et al. 2007; Yang and Watts 2005). Les plus petites particules sont considérées comme les plus nocives, car leur réactivité est supérieure (Hund-Rinke and Simon 2006; Oberdörster et al. 2005; Yang and Watts 2005).

Chez les plantes, les nanoparticules peuvent pénétrer par les racines, mais aussi par les stomates des feuilles. On peut ainsi observer une obstruction des stomates et une modification des échanges gazeux (Silva et al. 2006). Dans le cas d'un passage par les racines, la biodisponibilité des nanoparticules est très difficile à prévoir, car elle est modifiée par les interactions avec les composés du sol. Le passage de la paroi cellulaire est conditionné par la taille de la nanoparticule, qui doit forcément être inférieure au diamètre des pores, sauf en cas de lésions. Le passage de la membrane cellulaire lui-même pose débat. Elle peut être traversée par endocytose (Ovečka et al. 2005), en utilisant des protéines de transport membranaire ou en empruntant des canaux ioniques (Navarro et al. 2008). Une absorption et une distribution systémique de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> de 2,8 nm de diamètre a été récemment montrée chez *Arabidopsis Thaliana*. Une internalisation dans les cellules et une concentration dans les vacuoles a également été mise en évidence (Kurepa et al. 2010).

Dans la littérature, les dégâts cellulaires causés par les nanoparticules dans les cellules sont généralement attribués à la catalyse de réactions d'oxydo-réduction avec les molécules organiques (Zhang 2003) et à la production d'espèces réactives de l'oxygène (Navarro et al. 2008).

De manière plus globale, les nanoparticules peuvent perturber la photosynthèse et les échanges gazeux (Silva et al. 2006), inhiber l'élongation racinaire (Lin and Xing 2007; Yang and Watts 2005) et plus rarement la germination des graines (Lin and Xing 2007). Ces deux effets se produisent néanmoins pour des concentrations élevées de nanoparticules (100 à 2000 mg/L de ZnO ou Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). A concentrations inférieures (4 nM de nano-Au, 2 nM de nano-Ag ou 330 nM de nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), les effets sur la germination et l'élongation racinaire chez le concombre ou la laitue sont faibles et vont plutôt dans le sens d'une augmentation (Barrena et al. 2009). Néanmoins, d'après Stampoulis et al. (2009), les tests de germination et

d'élongation racinaires ne seraient pas adaptés à l'évaluation de la toxicité des nanoparticules sur les plantes, par manque de sensibilité et de reproductibilité.

La présence de nanoparticules dans l'environnement peut s'avérer bénéfique pour certains êtres vivants, en régulant la concentration de nutriments présents (Lütz-Meindl and Lütz 2006) ou en réduisant la biodisponibilité d'autres polluants (Baun et al. 2008b). La toxicité des nanoparticules est donc difficile à cerner et doit être relativisée par rapport à celle d'autres polluants mieux connus (Brar et al. 2010). Ainsi, le remplacement des nanoparticules par d'autres composés doit être bien réfléchi, car il ne peut jamais être exclu que le produit de substitution soit plus dangereux pour les écosystèmes que les nanoparticules (Labille et al. 2010).

### **3.4.3 Les nanoparticules de dioxyde de titane TiO<sub>2</sub>**

Le dioxyde de titane possède deux formes cristallines différentes, aux propriétés également dissemblables : la forme rutil et la forme anatase. Les nanoparticules de dioxyde de titane de forme rutil sont surtout utilisées dans les crèmes solaires pour leurs propriétés de filtre anti-UV, tandis que les nanoparticules d'anatase sont employées dans les ciments et dans les revêtements de verres autonettoyants pour leurs propriétés photocatalytiques (AFSSET 2010; Aitken et al. 2006). Les mêmes propriétés sont également exploitées pour le traitement et la désinfection des eaux (Brunet et al. 2009). Une utilisation en aérosol a également été proposée afin de lutter contre les bactéries pathogènes présentes dans l'air (Wang et al. 2010).

En matière d'écotoxicologie, les nanoparticules de dioxyde de titane peuvent avoir des effets soit positifs soit négatifs sur les plantes. Elles peuvent d'abord exercer un effet physique : en bouchant les pores racinaires, les particules peuvent perturber le métabolisme de l'eau et ainsi diminuer la croissance des plantes (Asli and Neumann 2009). Mais leur plus grand potentiel toxique vient de la plus intéressante de leurs propriétés aux yeux des industriels qui les utilisent : leur pouvoir photocatalytique, qui en fait de puissantes productrices d'espèces réactives de l'oxygène (Kus et al. 2006; Zhao et al. 2007). La génotoxicité de nanoparticules de TiO<sub>2</sub> sous lumière (UV/visible) a d'ailleurs été mise en évidence sur cellules animales (Nakagawa et al. 1997). Paradoxalement, ce pouvoir photocatalytique est soupçonné d'augmenter l'efficacité de la photosynthèse (Gao et al. 2006; Gao et al. 2008; Zheng et al. 2007a; Zheng et al. 2007b), de renforcer la résistance des plantes au stress oxydatif (Hong et al. 2005b; Zheng et al. 2008) et également d'accélérer l'assimilation de l'azote en augmentant

l'efficacité de la nitrate reductase (Yang et al. 2006; Yang et al. 2007). Ainsi, les nanoparticules de dioxyde de titane peuvent augmenter le poids sec des plantes ainsi que leur résistance aux stress. La synthèse de chlorophylle et le taux de germination de certaines graines peuvent également être augmentés par ces particules (Zheng et al. 2005). Chez *Allium cepa* exposée aux nanoparticules de TiO<sub>2</sub>, aucune inhibition de croissance racinaire et aucune génotoxicité (test des micronoyaux) n'a été décelée. Seule une modification de l'activité mitotique des cellules méristématiques racinaires a été mise en évidence (Klančnik et al. 2011). Testées sur *Pseudokirchneriella subcapitata*, les nanoparticules de TiO<sub>2</sub> n'ont pas eu d'effet à des concentrations  $\leq 100$  mg/L (Blaise et al. 2008). Néanmoins, une faible concentration de nanoparticules de dioxyde de titane dans l'environnement, même agglomérées, pourrait perturber les communautés microbiennes (Battin et al. 2009).

## 4 Tests de génotoxicité

### 4.1 Le test des micronoyaux

L'observation des micronoyaux en tant qu'indicateur de génotoxicité est apparue dans les années 1940, mais c'est dans les années 1970 que ce test a été développé sur un grand nombre d'organismes (Godet et al. 1993).

Un micronoyau est défini dans le « Glossary of Genetics and Cytogenetics » de Rieger et al. (1968) comme « un petit noyau surnuméraire 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 ».

#### 4.1.1 Principe

Suite à l'action de substances clastogènes et/ou aneugènes, des micronoyaux peuvent apparaître dans le cytoplasme des cellules végétales (Figure 4). L'observation microscopique des cellules-filles méristématiques (F1, Figure 5) racinaires après coloration à l'acéto-orcéine permet le dénombrement de ces micronoyaux. Leur fréquence d'apparition est un marqueur très fiable de la présence d'agents génotoxiques dans un sol ou en milieu liquide.

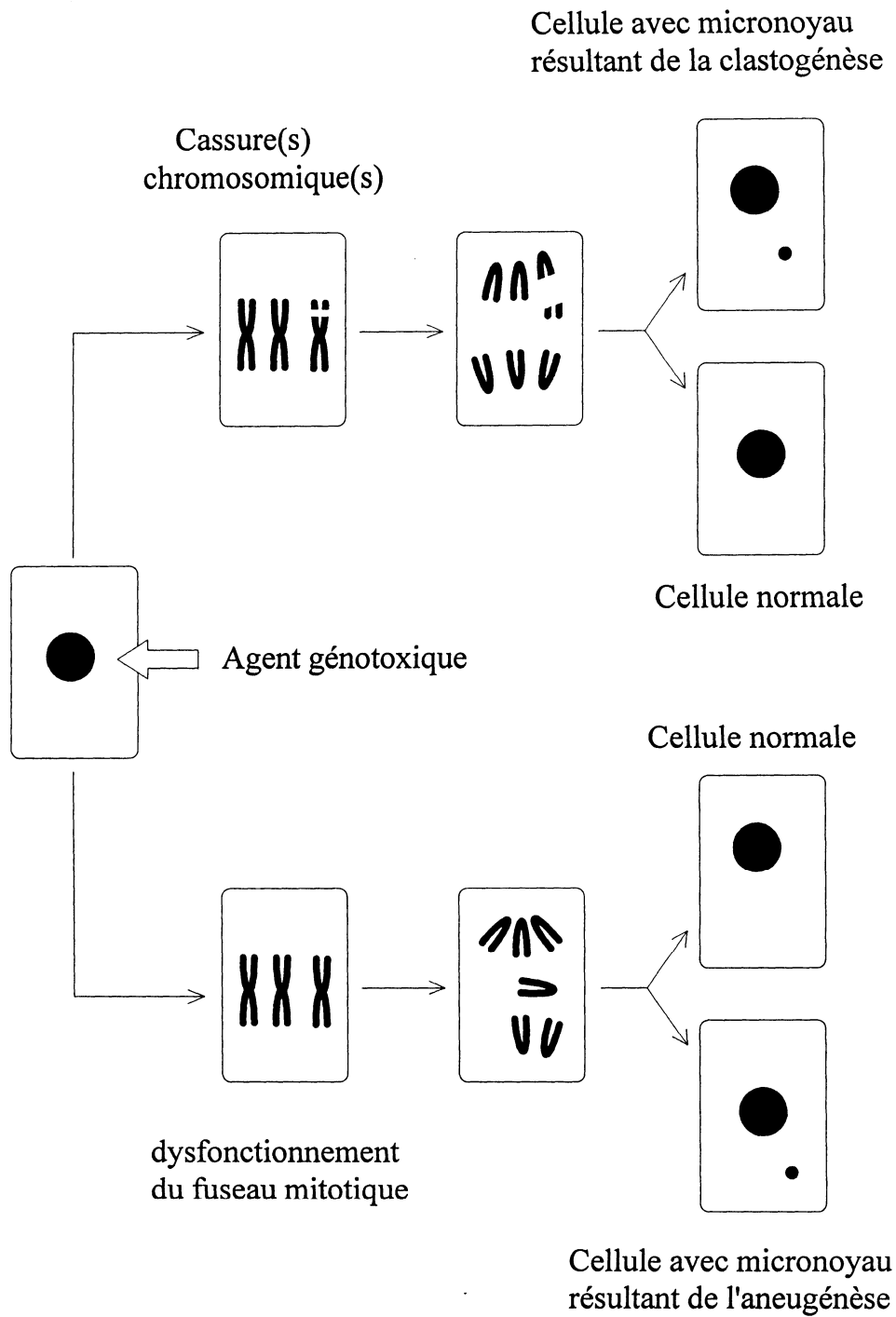


Figure 4 : Les deux mécanismes possibles de formation d'un micronoyau par un agent génotoxique (Fenech 1997)

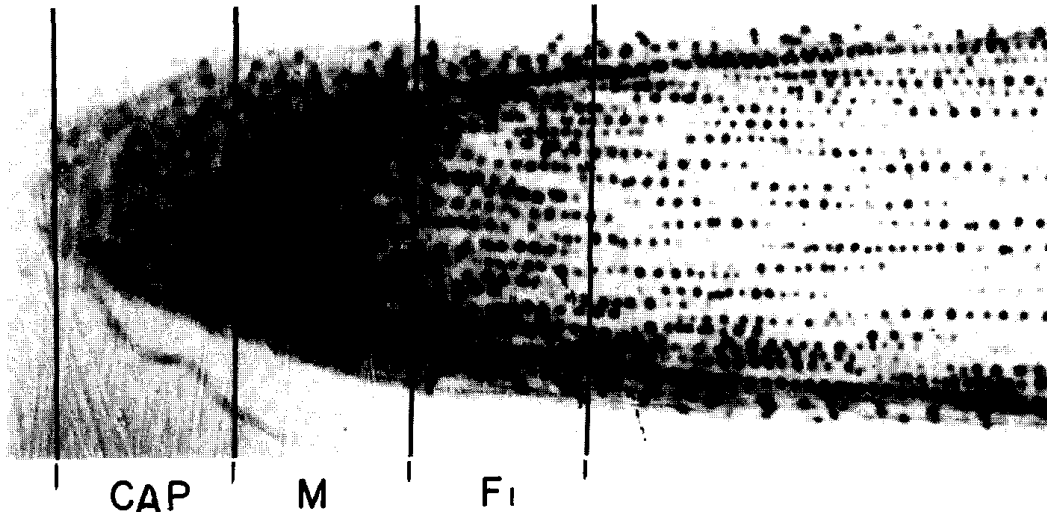


Figure 5 : Coupe longitudinale de l'apex d'une racine d'*Allium cepa* montrant la partie méristématique (M), les cellules filles (F1) et la cape de protection de l'apex (CAP). D'après Ma et al. (1995).

Pendant la lecture, on dénombre systématiquement le nombre de cellules en mitose qui, exprimé en pourcentage, représente l'indice mitotique. La diminution de cet indice mitotique trahit un effet cytotoxique de la matrice ou de la molécule testée. Les micronoyaux étant justement formés au cours de la mitose, leur nombre sera fatalement diminué si l'indice mitotique est trop bas (Degrassi and Rizzoni 1982). Dans la norme en phase liquide (AFNOR 2004), il est spécifié qu'un indice mitotique en dessous de 2% (normale chez *Vicia faba* : 8 à 12% selon les auteurs) doit invalider les résultats du dénombrement des micronoyaux.

Afin d'observer ces micronoyaux, il est nécessaire qu'il se soit écoulé au moins 30h entre le début de la contamination et l'observation microscopique, car les micronoyaux n'apparaissent qu'à la suite d'une mitose, il faut garantir au moins le temps requis pour permettre le déroulement entier du cycle cellulaire. Dans le cas où le temps de contamination serait inférieur, il faudra prévoir une période de récupération permettant aux cellules d'achever un cycle avant l'observation (Ma et al., 1995). Chez *Vicia faba*, le cycle dure un peu moins de 20h (Figure 2, p10), mais il peut être retardé par une irradiation en G2 par exemple. L'HM a aussi pour effet d'allonger la phase S du cycle cellulaire de *Vicia faba* de 7,5h à 20h, ce qui donne un cycle d'une durée de plus de 32h (Evans and Scott 1963).

### 4.1.2 Applications

Le test des micronoyaux sur plantes supérieures, en particulier *Vicia faba*, *Tradescantia sp.* et *Allium cepa* est très utilisé par de nombreux auteurs pour sa simplicité, sa fiabilité et sa reproductibilité, et pour des applications diverses dans le domaine de l'évaluation de la génotoxicité :

- de percolats de décharges municipales (Sang & Li, 2004) ou de lixiviats de cendres d'incinération d'ordures ménagères (Radetski et al., 2004) ;
- d'eaux de lacs ou rivières (Duan et al. 1999; Miao et al. 1999) ;
- de sédiments (Minissi et al. 1998; Minissi and Lombi 1997).

Il est également utilisé pour :

- l'évaluation de la qualité de l'air (Carreras et al., 2006) ;
- l'étude de l'influence des caractéristiques d'un sol sur la toxicité d'un polluant (De Marco et al., 1995) ;
- l'efficacité d'un protocole de bioremédiation (Abdel Migid et al. 2007) ;
- l'estimation des dommages causés par une irradiation au  $^{137}\text{Cs}$  (Minouflet et al., 2005) ;
- l'étude du mécanisme d'adaptation et de détoxification de la plante vis-à-vis d'un toxique (Patra et al., 2005)...

Une édition spéciale du journal *Mutation Research* a été consacrée au statut du test micronoyaux et à son utilisation dans les batteries de tests destinés aux screenings précoces de molécules d'intérêt (Kirsch-Volders 1997).

Ce test est plus efficace et plus sensible que les tests d'anomalies mitotiques d'après Ferrara et al. (2004), car le décompte s'effectue sur des cellules en interphase qui représentent environ 90% des cellules d'un étalement racinaire dans la zone F1 des racines secondaires de *Vicia faba*, alors que les cellules en mitoses dépassent rarement les 12%.

En revanche, sur *Allium cepa*, Rank et Nielsen (1997) lui préfèrent le test des aberrations chromosomiques sur cellules en ana-télophase qui présente l'avantage de différencier les effets clastogènes des effets sur le fuseau mitotique. De même, Chakraborty et al. (2009) constatent l'apparition d'aberrations chromosomiques et de cellules binucléées dans les

racines d'*Allium cepa* exposées à une matrice solide contenant différents métaux alors que le nombre de micronoyaux induits reste non significatif.

Abdel Migid et al. (2007) tranchent entre les deux tests en attribuant la préférence au modèle *Vicia* pour la génotoxicité visible en interphase (micronoyaux et déformations nucléaires), et au modèle *Allium* pour la cytotoxicité (indice mitotique) et les aberrations chromosomiques visibles sur les cellules en division. Ainsi, ils dégagent une complémentarité intéressante entre les deux tests.

#### 4.1.3 Devenir d'une cellule micronucléée

La plupart des auteurs s'accordent à dire que la formation de micronoyaux est un mécanisme quasi-irréversible et que la plupart du temps, la cellule en question meurt (Elhajouji et al. 1997; Fernandes et al. 2007).

Nous avons trouvé néanmoins deux cas où le phénomène est réversible :

- Si un toxique a causé une polyploïdisation accidentelle et que le micronoyau a pour fonction de rétablir le nombre normal de chromosomes en expulsant le matériel en trop (Fernandes et al. 2007) ;
- Si le micronoyau, dû à un effet aneugène et composé d'un chromosome ou d'une chromatide entière, continue son cycle indépendamment du noyau mais reste, par hasard, synchrone avec lui. On pourrait alors assister lors de la mitose suivante à une récupération du chromosome ou de la chromatide perdu(e) par la machinerie de réplication de la cellule et à sa réintégration. La probabilité de réintégration du matériel génétique d'un micronoyau serait alors dépendante de la probabilité que le cycle du micronoyau soit synchrone avec celui du noyau principal. Montrée sur cellules méristématiques de *Vicia faba* et sur lignée cellulaire de hamster chinois (Rizzoni et al. 1989), ainsi que sur lymphocytes humains (Gustavino et al. 1994), cette théorie est toutefois critiquée (Fernandes et al. 2007).

Dans certains cas, la cellule continue son cycle de division, tandis que le micronoyau peut se séparer d'elle et former une mini-cellule indépendante (Fernandes et al. 2007). La formation de cette mini-cellule pourrait augmenter les chances de survie de la cellule principale en éliminant le micronoyau de son cytoplasme (Elhajouji et al. 1997), surtout s'il contient du matériel génétique en surplus comme évoqué dans le premier point. En tout état de cause, il

semble impossible de prévoir la survie ou la destruction d'une cellule portant un micronoyau (Fernandes et al. 2007).

Si la cellule survit, la majorité des micronoyaux subissent une hypercondensation chromatinienne (pycnose) et disparaissent (Scott and Evans 1964). Plus rarement, certains micronoyaux peuvent synthétiser de l'ADN et de l'ARN et même se répliquer (Das 1962; Scott and Evans 1964). Selon Das (1962), 16% des micronoyaux obtenus par irradiation chez *Vicia faba* sont capables de synthétiser de l'ADN.

#### 4.1.4 Protocoles

Le protocole du test micronoyaux sur racines secondaires de *Vicia faba* est décrit en phase liquide par la norme AFNOR NF T90-327 (2004). Cette norme est donc parfaitement adaptée à l'évaluation de tous types de matrices liquides, mais concernant le domaine de l'évaluation des sols, elle impose une étape de lixiviation ou autre extraction liquide. De fait, la grande majorité des auteurs étudiant la toxicité des sols travaillent sur lixiviats ou autres extraits liquides (Jun-hui and Hang 2009; Song et al. 2006; White and Claxton 2004).

Peu d'auteurs réalisent une exposition directe des plantes dans les sols à tester en vue du test des micronoyaux, et leurs protocoles sont très variés. Voici quelques exemples de protocoles d'exposition de *Vicia faba* en phase solide :

- Béraud (2007) expose les jeunes fèves (*V. faba major*) durant 5 jours dans le sol à tester, après une étape de prégermination (apparition de la racine primaire) de 4 jours dans l'eau déminéralisée. Le test des micronoyaux est alors effectué sur les racines secondaires apparues durant l'exposition ;
- De Marco et al. (2005) laisse germer les fèves (*V. faba minor*) durant 4 jours dans un sol sableux avant de les transférer dans le sol contaminé. L'exposition dure 2 jours et la racine primaire est utilisée pour les tests ;
- Knasmüller et al. (1998) travaillent également sur *V. faba minor*. Ces dernières germent durant 3 jours dans de l'eau du robinet puis sont exposées 72h dans le sol à tester. Il n'est pas précisé clairement si le test est effectué sur les racines primaires ou secondaires.

Ces différents protocoles montrent de grandes disparités au niveau du temps d'exposition et des conditions de prégermination. De plus, la provenance et/ou la variété des graines utilisées



diffèrent, ainsi que les parties de la plante utilisées (racines primaires ou secondaires). Cette grande hétérogénéité des protocoles en fonction des auteurs interdit la comparaison de leurs résultats.

#### **4.1.5 Statistiques**

Selon les auteurs, un grand panel de tests statistiques différents a été utilisé :

- loi de Poisson (Amphlett and Delow 1984; Kanaya et al. 1994) ;
- loi Binomiale (Hayashi et al. 1994) ;
- loi normale, ANOVA suivi d'un test de Dunnett (Grant 1999; Yi and Meng 2003) ou de Tukey (El Hajjouji et al. 2007) ;
- loi normale, test de Student (Minissi et al. 1998) ;
- loi normale, test de Student après transformation en arcsin (Knasmüller et al. 1998) ;
- Kruskal-Wallis suivi du test U de Mann-Whitney (Manier et al. 2009).

## **4.2 Le test des comètes**

Voir le site Comet Assay Interest Group, [<http://cometassay.com>]

### **4.2.1 Généralités**

Simple, peu coûteux et d'une très grande sensibilité, le test des comètes aussi appelé en anglais « single cell gel electrophoresis » ou SCGE est un outil incontournable pour l'étude de la génotoxicité à l'échelle cellulaire d'une ou plusieurs substances sur n'importe quel tissu vivant constitué de cellules eucaryotes. En effet, pour effectuer ce test, il suffit de pouvoir disposer de noyaux : il est donc virtuellement possible de l'appliquer à tout tissu, animal ou végétal, dont on peut extraire les noyaux ou isoler les cellules. Cotelle et Férard (1999) et Dhawan et al. (2009) donnent une bonne illustration de la variété des espèces, animales ou végétales, sur lesquelles le test des comètes a été effectué avec succès.

Le test des comètes requiert peu de matériel biologique et peut s'effectuer sur cellules mitotiques ou non. Il est hautement sensible et donc peu spécifique, et permet de visualiser les lésions génotoxiques à l'échelle de chaque cellule.

## 4.2.2 Types de lésions génotoxiques mises en évidence par le test des comètes

### 4.2.2.1 *En conditions neutres*

Le test des comètes en conditions neutres permet de détecter sélectivement les cassures doubles brins (Kozak et al. 2009), car la molécule d'ADN n'est pas dénaturée.

### 4.2.2.2 *En conditions alcalines*

Le test des comètes en conditions alcalines est beaucoup plus sensible et permet de détecter un large panel de lésions génotoxiques :

- les cassures simple et double brins, car la molécule d'ADN est dénaturée ;
- les sites de réparation par excision-resynthèse. En effet, si cette dernière est mal exécutée, elle peut causer des ruptures simple brin (Gichner et al. 1999) ;
- les sites alcali-labiles, qui se forment lorsqu'une base se détache du désoxyribose, donnant naissance à des sites apuriques ou apyrimidiques. En milieu alcalin (pH>13), ces « points faibles » se rompent et créent des cassures simple brin (Friedberg et al. 1995) ;
- l'alkylation de l'ADN par des agents alkylants tels que l'éthyl methanesulfonate (EMS) ou la N-méthyl-N-nitrosourée (MNU). L'alkylation des bases de l'ADN peut donner lieu à réparation par excision-resynthèse, mais les bases alkylées peuvent aussi devenir par glycosilation des sites apuriques ou apyrimidiques alcali-labiles (Gichner et al. 1999) ;
- les ponts chromosomiques ou les liaisons entre deux chaînes d'ADN ou entre une chaîne et des protéines, qui peuvent être détectés par l'inhibition de la migration de l'ADN ;
- l'apoptose cellulaire, dont la structure caractéristique après migration se compose d'un vestige de noyau matérialisé par un fin anneau et suivi par une queue très fournie (Figure 11 p 62) ;
- les cellules nécrosées, qui ne laissent qu'un halo plus ou moins diffus sur la lame (Figure 30 a, b, p 100).

De plus, une hybridation in situ avec une sonde marquée (fluorescence in situ hybridization ou FISH) effectuée avant la réalisation du test des comètes permet de savoir quels domaines

chromosomiques sont lésés et apporte de très précieuses informations quant au mécanisme d'action génotoxique d'une molécule (Menke et al. 2000a; Menke et al. 2000b).

### **4.2.3 Les différentes étapes du protocole**

#### ***4.2.3.1 Isolement des noyaux***

La première étape consiste à isoler les noyaux cellulaires du tissu à étudier. Ces noyaux, une fois isolés de la matrice cellulaire, sont très fragiles et facilement dégradés par les rayons lumineux et la chaleur : toutes les étapes qui suivent doivent donc se dérouler en lumière rouge et à une température d'environ + 4°C (Singh et al. 1988).

Les noyaux des cellules animales sont faciles à isoler par lyse de la membrane plasmique. Mais les cellules végétales qui nous intéressent sont protégées par une paroi de cellulose très résistante : le seul moyen d'en extraire les noyaux est de le faire mécaniquement en découpant le tissu végétal à l'aide d'un scalpel ou d'une lame de rasoir. Ce découpage doit se faire dans un tampon isotonique maintenu à basse température par de la glace. Les noyaux ainsi isolés sont ensuite inclus dans un gel d'agarose sur une lame de microscope et recouverts d'une seconde couche d'agarose (Cotelle 1999). Facultative, cette dernière couche comble les trous éventuels de la première couche et joue aussi un rôle de protection des noyaux en augmentant l'épaisseur d'agarose (Tice et al. 2000).

#### ***4.2.3.2 Lyse***

La solution de lyse permet de détruire les membranes plasmique et nucléaire des cellules. Cette propriété lui est conférée par des détergents, le Triton X-100 et le N-lauroyl sarcosinate de sodium. De plus, la dénaturation de la molécule d'ADN est initiée par le NaCl tandis qu'un pH alcalin de 10,5 est maintenu par du Tris et de la soude, facilitant la libération des histones. Le Na<sub>2</sub>EDTA sodique protège l'ADN en chélatant les ions Mg<sup>2+</sup>, ce qui inhibe l'action des DNases dont cet ion métallique est le cofacteur (Cotelle and Féraud 1999).

#### ***4.2.3.3 Dénaturation***

Après la lyse, les lames sont immergées dans la solution d'électrophorèse après un bref rinçage dans 100 mL de la même solution afin d'éliminer toute trace de détergent ou de sels (Tice et al. 2000). Le pH de ce mélange est supérieur à 13 et induit la dénaturation des molécules d'ADN et sa libération des histones et des autres protéines, ainsi que la rupture des sites alcali-labiles qui seront donc pris en compte dans l'évaluation des dégâts à l'ADN (Rojas et al. 1999)

#### **4.2.3.4 Electrophorèse**

Les noyaux sont placés dans un champ électrique. La molécule d'ADN, naturellement chargée négativement, migre donc vers le pôle positif, ou anode. Si la molécule d'ADN est intacte, elle se déplacera peu, car elle est trop encombrante pour migrer dans l'agarose. Par contre, si elle a subi des dommages qui se traduisent par des coupures des brins, les fragments d'ADN issus de ces coupures pourront se déplacer dans le gel, d'autant plus loin qu'ils sont plus petits (Cotelle and Férard 1999). L'ADN intact se présentera donc après coloration sous une forme bien ronde et compacte, appelée la tête de la comète, tandis que la queue, très allongée et d'une texture plus diffuse, sera constituée de l'ADN dégradé.

#### **4.2.3.5 Neutralisation**

Le colorant fluorescent utilisé pour la lecture des lames est un intercalant, c'est-à-dire qu'il s'intègre entre les deux brins de l'ADN. Or, l'ADN qui vient de migrer est sous forme dénaturée, un état qui ne permet pas la fixation du colorant. Pour pouvoir lire les lames, il est donc nécessaire de provoquer un réappariement des brins. La solution de neutralisation, un tampon Tris de pH 7,5, permet un réappariement bien sûr aléatoire et ponctuel, mais qui autorise tout de même la fixation de certaines molécules de colorant. Le résultat sera une image de comète non pas constituée de filaments, mais de l'assemblage de millions de petits spots fluorescents (Devaux 2006).

#### **4.2.3.6 Fixation**

Pour empêcher la rapide dégradation des comètes avant la lecture, on peut fixer les lames à l'éthanol, qui les dessèche (Tice et al. 2000) et permet de les conserver intactes théoriquement pendant très longtemps. Certains auteurs (Mancini et al. 2006; Restivo et al. 2002) désignent même les lames fixées par ce procédé comme « échantillons permanents ».

#### **4.2.3.7 Coloration**

Le colorant fluorescent utilisé est le bromure d'éthidium, ou BET. Il s'agit d'un puissant intercalant de l'ADN qui, sous un filtre d'excitation adéquat, renvoie une lumière orangée. Mais ses propriétés d'intercalant lui confèrent aussi une grande toxicité : mutagène, cancérigène, cette molécule doit être manipulée avec les plus grandes précautions.

A cause de la dangerosité intrinsèque du BET, des essais ont été menés afin de le remplacer. L'un de ses meilleurs succédanés est le gel SYBR® Green I, qui tout en possédant de bonnes propriétés de fixation de l'ADN (Cosa et al. 2001), semble peu mutagène (Singer et al. 1999).

#### **4.2.4 Les différents protocoles de la bibliographie**

Le protocole du test des comètes sur tissus végétaux n'est pas normalisé, et chaque auteur adapte le sien à son modèle et à la sensibilité qu'il souhaite obtenir.

On peut trouver un certain nombre de publications détaillant un protocole de test des comètes sur les racines de *Vicia faba* (Cotelle and Féraud 1999; Koppen and Angelis 1998; Koppen and Verschaeve 1996; Lin et al. 2007; Menke et al. 2000b).

Le Tableau II résume des exemples de protocoles pratiqués par différents auteurs sur des organes de plantes, en particulier les racines et les feuilles, exposés à divers agents génotoxiques.

**Tableau II : Résumé des protocoles du test des comètes pratiqué par différents auteurs sur les plantes.**

	Gichner & Mühlfeldova, 2002	Stavreva & Gichner, 2002	Chakraborty <i>et al.</i> , 2009	Gichner <i>et al.</i> , 2008	Restivo <i>et al.</i> , 2002
<b>Plante(s) utilisée(s)</b>	10 plantes adventices*	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Allium cepa</i>	<i>Solanum tuberosum</i> var. <i>korela</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> + <i>Impatiens balsamina</i>
<b>Organe(s) utilisé(s)</b>	Feuilles	Cultures cellulaires	Racines	Feuilles et racines	Feuilles
<b>Agent(s) génotoxique(s) utilisé(s)</b>	Bas de la feuille plongé dans EMS 2 à 10mM 18h à l'obscurité	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 15mM 2h	Particules solides des fumées de centrales à charbon (riches en métaux, surtout Zn, Pb, Cu, Ni)	CdCl <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 100mM 20 min Ozone : conditions atmosphériques intérieures et extérieures
<b>Isolement des noyaux</b>	Partie des feuilles non en contact avec le contaminant découpée dans 200µL de Tris 400mM pH 7,5	Grattage de 400mg de cellules, transfert dans 500µL de tampon de Sörensen modifié + 100mg de sable. Agitation filtration maille 53µm	Racines découpées dans 400µL de Tris 400mM pH 7,5	Feuilles ou racines découpées dans 250µL de Tris 400mM pH 7,5	Feuilles découpées et plongées 10 fois directement dans 1 goutte de LMPA 0,5% dans PBS
<b>Préparation des lames</b>	NMPA 1%	NMPA 1%	NMPA 1%	NMPA 1%	NMPA 1%
<b>(3 couches)</b>	50µL de suspension nucléaire + 50µL de LMPA 1% dans PBS 100µL LMPA 0,5%	45µL de suspension nucléaire + 45µL de LMPA 1% dans PBS 90µL LMPA 0,5%	40µL de suspension nucléaire + 40µL de LMPA 1% dans PBS 80µL LMPA 0,5%	50µL de suspension nucléaire + 50µL de LMPA 1% dans PBS 100µL LMPA 0,5%	1 goutte de LMPA 0,5% dans PBS contenant la suspension nucléaire LMPA
<b>Lyse</b>	Non	NaCl 2,5M Na <sub>2</sub> EDTA 100mM Tris 10mM Sarcosinate de sodium 1% Triton X-100 1% DMSO 10% Toute la nuit	inutile	Non	NaCl 2,5M Na <sub>2</sub> EDTA 10mM Tris-HCl 10mM Triton X-100 1% DMSO 10% pH10 7 jours
<b>Dénaturation</b>	5, 15 ou 30 min	20 min	15 min	10 min	15 min
<b>Electrophorèse</b>	Na <sub>2</sub> EDTA 1mM NaOH 300mM pH >13 26V, 300mA, 15ou 30min	Na <sub>2</sub> EDTA 1mM NaOH 300mM pH >13,5 0,75V/cm, 26V, 300mA 30 min	Na <sub>2</sub> EDTA 1mM NaOH 300mM pH >13 0,7 V/cm, 20V, 300mA 20 min	Na <sub>2</sub> EDTA 1mM NaOH 300mM pH >13 0,75V/cm, 26V, 300mA 15 min	Na <sub>2</sub> EDTA 1mM NaOH 300mM pH >=13 0,66V/cm, 230mA 10 min
<b>Neutralisation</b>	Rinçage (?)	Tris 700mM pH 7,5 3 rinçages	Tris 400mM pH 7,5 3 rinçages	Tris 400mM pH 7 3 rinçages Séchage à l'air libre 5 min eau froide	Tris-HCl 0,4M pH 7,5
<b>Fixation</b>	Non	Non	Séchage à l'air	Non	Ethanol 95%
<b>Révélation</b>	BET	80µL BET 20µg/mL	Rinçage eau 5 min 80 µL BET 20µg/mL 5 min	100µL BET 20µg/ml 5 min	100µL BET 10µg/mL

**\*Gichner et Mühlfeldova, 2002:**

*Arabidopsis thaliana*

*Convolvulus arvensis*

*Bellis perennis*

*Urtica dioïca*

*Lamium album*

*Chenopodium rubrum*

*Plantago media*

*Poa annua*

*Taraxacum officinale*

*Agropyron repens*

**Tampon de Sörensen**

50 mM sodium phosphate

0,1 mM EDTA

pH 6,8

	<b>Pincheira et al., 2003</b>	<b>Sriussadaporn et al., 2003</b>	<b>Poli et al., 2003</b>	<b>Liu et al., 2004</b>	<b>Mancini et al., 2006</b>
<b>Plante(s) utilisée(s)</b>	<i>Allium cepa</i>	<i>Ginkgo biloba</i> <i>Epipremnum aureum</i> <i>Vinca rosea</i>	<i>Impatiens balsamina</i>	<i>Glycine max</i>	<i>Nicotiana tabacum</i> transgénique
<b>Organe(s) utilisé(s)</b>	Méristèmes des racines	Feuilles	Feuilles	Extrémités des racines	La 7 <sup>ème</sup> feuille à 70 jours
<b>Agent(s) génotoxique(s) utilisé(s)</b>	EMS 2mM, 1,5h  Rayons $\gamma$ 3,7Gy/min, 1Gy	Proximité d'une route	Fenarimol 145mM  1h	TCB 50, 100, 200, 300 $\mu$ g/g Chlorobenzène et hexachlorobenzène 100, 500, 1000 $\mu$ g/g 48h	Feuille plonge en entier dans H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 20, 50, 80mM  Vide (-80mBar) 1 min puis 2, 3, 4h dans l'obscurité
<b>Isolement des noyaux</b>	Découpe de l'extrémité de jeunes racines, passage dans 4 gouttes successives de 45 $\mu$ L de tampon de Sørensen 80mM pH 6,8 On ne retient que la 4 <sup>ème</sup> goutte	Découpe des feuilles dans du tampon de Sørensen modifié pH 6,8	Feuilles coupées et plongées dans 1 goutte de LMPA 0,5% dans PBS à 37°C	Homogénéisation au mixer « interiorly-cut blender »  (XHF-1) 1 min Filtration 30 $\mu$ m	Feuilles découpées dans 300 $\mu$ L de tampon de Sørensen modifié pH 6,8
<b>Préparation des lames</b>	NMPA	Lames prétraitées	Agarose	NMPA 0,7%	NMPA 1% dans PBS
<b>(3 couches)</b>	La 4 <sup>ème</sup> goutte de 45 $\mu$ L de suspension nucléaire + 30 $\mu$ L de LMPA 0,5% + 45 $\mu$ L de LMPA 1%  10 min à 0°C	75 $\mu$ L de suspension nucléaire à 1% v/v dans LMPA puis 30 min à +4°C dans l'obscurité	LMPA 0,5% dans PBS	30 $\mu$ L de suspension nucléaire + 70 $\mu$ L LMPA 0,7% dans PBS	50 $\mu$ L de suspension nucléaire + 50 $\mu$ L de LMPA 1% dans PBS
	85 $\mu$ L LMPA 0,5%	non	LMPA	Non	100 $\mu$ L LMPA 0,5%
<b>Lyse</b>	Inutile	NaCl 2,5M EDTA 100mM Tris base 10mM Triton X-100 1% +4°C toute la nuit	Non	NaCl 2,5M Tris 10mM EDTA 100mM pH 10 DMSO 10% Triton X-100 1% 8h à +4°C	NaCl 2,5M Na <sub>2</sub> EDTA 10mM Tris-HCl 10mM Triton X-100 1% DMSO 10% pH 10 16h
<b>Dénaturation</b>	Tampon alcalin pH 13,5	20 min	15 min	30 min	10 min
<b>Electrophorèse</b>	pH neutre 0,65V/cm, 230mA 10°C 20 min	NaOH 10N EDTA 200mM 1V/cm, 300mA 20 min	Na <sub>2</sub> EDTA 1mM NaOH 300mM pH $\geq$ 13 0,66V/cm, 230mA 10min	NaOH 0,3M EDTA 5mM pH 13 18mV, 200mA 25 min	Na <sub>2</sub> EDTA 1mM NaOH 300mM pH >13 0,66 V/cm, 320mA 20min
<b>Neutralisation</b>	Protocole non précisé	Tris base 0,4M, pH 7,5 2 rinçages de 5 min	Tris-HCl 0,4M pH 7,5	Tris 0,4M, pH 7,5 2 lavages	Tris-HCl 400mM pH 7,5
<b>Fixation</b>	Non	Ethanol 10 min Séchage à 37°C	Non	Non	Ethanol 95%
<b>Révélation</b>	BET 4 $\mu$ g/mL	BET 20 $\mu$ g/mL	70 $\mu$ L BET 2 $\mu$ g/mL	15 $\mu$ L BET 5 $\mu$ g/mL	80 $\mu$ L BET 10 $\mu$ g/mL

## 5 Les phytochélatines

### 5.1 Généralités

Les phytochélatines, ou métallothionéines de classe III (anciennement appelées phytoalexines) sont des polymères du glutathion secrétées par l'immense majorité des plantes supérieures ainsi que par certaines algues, protistes chlorophylliens et levures (Mendoza-Cózatl and Moreno-Sánchez 2006) en réponse à un stress métallique. Leur dosage peut ainsi servir de marqueur d'exposition à un métal lourd et est le reflet de la réaction de la plante vis-à-vis de ce toxique. Une review très complète sur ces peptides a été publiée très récemment par Pal et Rai (2010).

La formule générale d'une phytochélatine est  $[\gamma\text{-Glutamine-Cystéine}]_n\text{-Glycine}$  avec  $n$  pouvant varier de 2 à 11 (Grill et al. 1985). Leurs nombreux résidus cystéine porteurs de fonctions thiols leur donne une forte affinité pour les cations métalliques, qu'elles chélatent très efficacement. Elles sont considérées comme les métallothionéines des plantes (Grill et al. 1987).

Chez certaines fabacées, comme *Lupinus albus*, on retrouve des homo-phytochélatines, de rôle semblable mais de structure  $[\gamma\text{-Glutamine-Cystéine}]_n\text{-}\beta\text{-Alanine}$  ( $n = 2-7$ ) (Grill et al. 1986). Bien qu'appartenant à cette famille, notre modèle *Vicia faba* ne synthétise pas d'homo-phytochélatines (Matamoros et al. 1999).

### 5.2 Biosynthèse

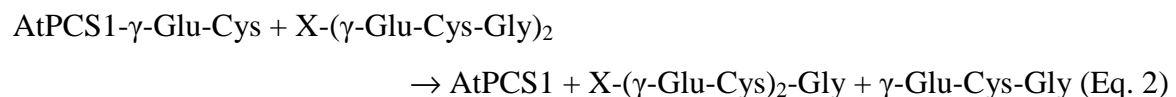
Les PC sont synthétisées par une enzyme constitutive appelée phytochélatine synthase. Cette  $\gamma$ -glutamylcystéine dipeptidyl transpeptidase (EC 2.3.2.15) catalyse la formation des PC par polymérisation du GSH (Grill et al. 1989; Vatamaniuk et al. 1999), mais uniquement si elle est induite par la présence de l'un des métaux ou métalloïdes cités plus bas. L'enzyme étant constitutive, les PC apparaissent donc dans les premières minutes d'exposition à un des agents inducteurs (Clemens 2001). Chez *Vicia faba*, les phytochélatines apparaissent de manière significative dans les racines à partir d'une exposition de 48h à une concentration de  $10^{-6}\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$  en milieu liquide (Béraud et al. 2007). La synthèse de PC semble stoppée lorsque tous les agents inducteurs ont été chélatés, inactivant l'enzyme (Grill et al. 1989).



La synthèse des PC est induite par les ions  $\text{AsO}_4^{2-}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Hg}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Au}^+$ ,  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{Se}^{4+}$ ,  $\text{Sb}^{3+}$ ,  $\text{Bi}^{3+}$ ,  $\text{Sn}^{2+}$ ,  $\text{Te}^{4+}$ ,  $\text{W}^{6+}$  chez *Rauvolfia serpentina* (Grill et al. 1987). L'élément Al, par contre, ne provoque pas la synthèse de PC (Grill et al. 1987). Chez *Rubia tinctorum*, les ions  $\text{Ga}^{3+}$ ,  $\text{In}^{3+}$  et  $\text{Pd}^{2+}$  sont également des inducteurs (Maitani et al. 1996). Les mêmes auteurs classent les éléments dans l'ordre suivant selon leur pouvoir décroissant d'induction de la synthèse de PC :  $\text{Cd} > \text{Pb} > \text{Zn} > \text{Ag} > \text{Hg} > \text{As} > \text{Cu}$ .

Schat et al. (2002) ajoutent l'élément Co à la liste et proposent un classement différent des inducteurs de PC :  $\text{As/Cd/Cu} > \text{Zn} > \text{Ni/Co}$ . Dans l'ensemble, la majorité des auteurs reconnaissent le cadmium comme étant le plus puissant inducteur de la PC synthase.

Même si l'activation de la PC synthase peut être médiée par la fixation directe de l'inducteur métallique sur l'enzyme, cette fixation n'est pas un prérequis obligatoire à la synthèse de PC (Vatamaniuk et al. 2000). En revanche, il est indispensable que la fonction thiol du GSH soit substituée, généralement par un cation métallique. En effet, l'enzyme utilise deux cosubstrats, le glutathion réduit et le glutathion oxydé ou S-substitué. L'équation de la réaction catalysée par la PC synthase d'*Arabidopsis thaliana* (AtPCS1) serait donc la suivante : AtPCS1 se fixe d'abord sur une molécule de GSH réduit en éliminant un résidu glycine (Equation 1). Ce complexe réagit avec un dimère GSSG lié par un cation métallique (X) pour donner la PC2 liée au cation métallique, avec libération de l'enzyme et d'une molécule de GSH réduit (Equation 2).



Les mêmes auteurs (Vatamaniuk et al. 2000) ont apporté la preuve que l'enzyme pouvait fonctionner sans aucun inducteur métallique si on lui fournissait comme substrat du glutathion S-substitué, par exemple du S-méthylglutathion ou du S-éthylglutathion.

La synthèse de PC induit logiquement la diminution du taux de glutathion cellulaire (De Vos et al. 1992; Tukendorf and Rauser 1990) et pour compenser, la cellule augmente sa synthèse (Mendoza-Cózatl and Moreno-Sánchez 2006). Même si l'enzyme est constitutive, une

induction de sa biosynthèse dans les feuilles de *Brassica juncea* a été constatée après une exposition de longue durée au cadmium (Heiss et al. 2003). La synthèse de PC est inhibée par la buthionine sulfoximine (BSO), un inhibiteur de la  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase (EC 6.3.2.2), qui freine la synthèse du précurseur des PC, le GSH (Grill et al. 1987).

### 5.3 Rôles

Comme exposé dans la Figure 6, les phytochélatines sont capables de chélater les métaux, permettant leur inactivation et leur stockage dans des compartiments où ils ne pourront pas interférer avec le métabolisme (Clemens 2001). On sait que le cuivre se fixe sur les fonctions thiols des PC sous forme cuivreuse  $Cu^+$  (Mehra and Winge 1988; Reese et al. 1988). La stabilité de ces complexes dépend de la longueur de la chaîne (Gusmão et al. 2010; Mehra and Winge 1988). Des ions sulfure  $S^{2-}$  peuvent s'ajouter à ces complexes pour les stabiliser (Cobbett 2000b; Reese et al. 1988).

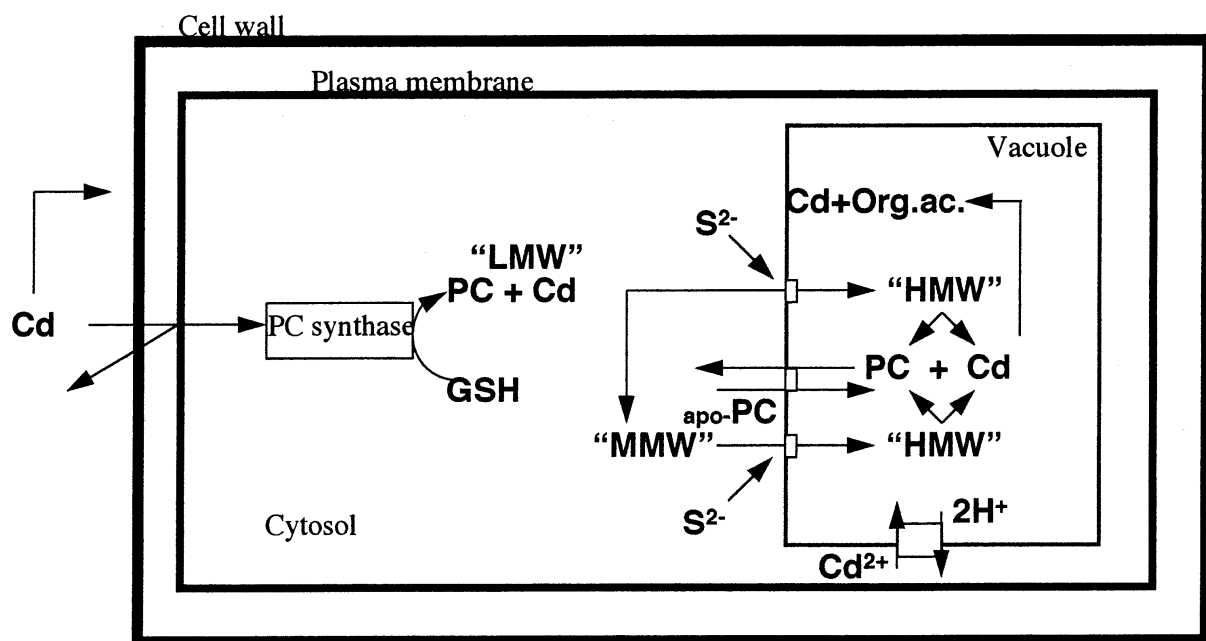


Figure 6 : Mécanismes de chélation et de stockage du cadmium dans la vacuole, d'après Sanità di Toppi et Gabbrielli (1999). PC : phytochélatines ; GSH : glutathion réduit ; org. ac. : acides organiques ; LMW : complexe à bas poids moléculaire ( $Cd+PC_2$  ou  $Cd+PC_3$ ) ; MMW : complexe à poids moléculaire moyen ( $Cd+PC$  à degré de polymérisation supérieur à 3) ; HMW : complexe à haut poids moléculaire (MMW lié à  $S^{2-}$ ) ;  $S^{2-}$  : sulfure acido-labile.

Fait inattendu, les phytochélatines pourraient diminuer la génotoxicité de certaines molécules comme l'hydrazide maléique (voir §3.1.7).

Néanmoins, si le rôle des PC dans la chélation et la prise en charge des métaux est reconnu, leur importance réelle dans leur détoxification est sujette à débats (Pal and Rai 2010). Il semblerait qu'elles soient très utiles à la détoxification du cadmium, mais beaucoup moins en ce qui concerne le cuivre (Clemens 2001). De Vos et al. (1992) avancent même l'idée que la synthèse de PC pourrait être un facteur aggravant la toxicité du cuivre, à cause de la déplétion en GSH qu'elle provoque.

Selon Vázquez et al. (Vázquez et al. 2006; 2009), leur rôle dans la détoxification du cadmium est peu clair. Le mécanisme de détoxification le plus efficace chez *Lupinus albus* serait la fixation des ions métalliques sur la paroi cellulaire des racines. Les homo-PC n'interviendraient que lorsque cette première barrière est franchie et que le métal a pénétré dans le cytoplasme. Leur efficacité serait inférieure à celle du GSH.

Si une déficience en PC peut mener une souche d'*Arabidopsis thaliana* à une hypersensibilité au cadmium (Howden et al. 1995), une autre souche modifiée pour surexprimer la PC synthase a paradoxalement également montré une hypersensibilité au cadmium, qui selon les auteurs peut être expliquée par la consommation du GSH cellulaire mais aussi par la toxicité d'un taux trop élevé de PC pour la plante (Lee et al. 2003).

La production de PC étant un mécanisme de défense constitutif, ces dernières ne sont pas impliquées dans les mécanismes de tolérance acquise aux métaux. Ainsi, une souche de *Silene cucubalus* ayant acquis une résistance au cuivre ne synthétise quasiment pas de PC lorsqu'elle est exposée à ce métal, alors que cette synthèse est très importante chez la souche sensible (De Vos et al. 1992). Chez la plante hyperaccumulatrice de zinc et de cadmium *Thlaspi caerulescens*, la résistance à de fortes concentrations de ces métaux n'est pas due aux PC (Ebbs et al. 2002).

Un niveau basal de PC2 existant chez les plantes non exposées aux métaux laisse à penser que les PC jouent également un rôle dans le transport des métaux essentiels (Cobbett 2000a; Cobbett 2000b; Schat et al. 2002).

# *Matériel et Méthodes*

---



# 1 Test des micronoyaux

## 1.1 Test des micronoyaux en milieu liquide

Le protocole du test des micronoyaux a été normalisé AFNOR (NF T90-327) en 2004, suite aux travaux réalisés au LIEBE par Sylvie Cotelle. Cette norme décrit le test uniquement en milieu liquide.

Un test préliminaire sera d'abord effectué dans les conditions de la norme avec les mêmes concentrations d'HM pour vérifier la validité de notre protocole.

### 1.1.1 Prégermination

Les principales étapes sont décrites dans la Figure 7. Les graines sont achetées en jardinerie (Vilmorin® puis Fabre®) sous le nom de « fève d'Aguadulce à très longue cosse ». Elles sont préalablement mises à tremper 24h dans de l'eau déminéralisée, puis les graines sont sorties de l'eau, débarrassées du tégument brun qui les entoure et mises à germer durant 3 jours entre deux couches de coton hydrophile humide. Ce système est arrosé tous les jours à l'eau déminéralisée. Au bout de trois jours, les graines germées sont récupérées. A ce stade, elles présentent une racine primaire longue de quelques centimètres.

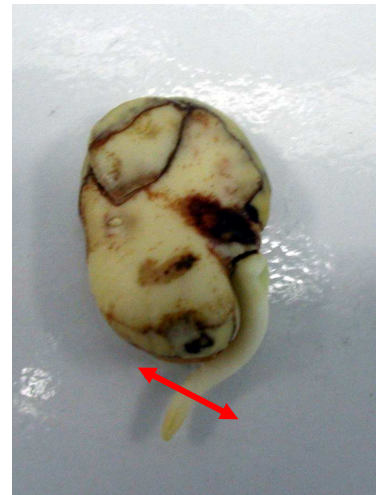
Après avoir coupé les 5 premiers millimètres de chaque racine primaire afin de favoriser l'apparition des racines secondaires qui nous intéressent, il faut placer les jeunes pousses en milieu hydroponique, la graine reposant sur une grille permettant aux racines de tremper dans un milieu nutritif, le milieu de Hoagland (cf. Composition des solutions, Annexe 2). Ce milieu est changé tous les jours. Les fèves sont maintenues en phytotron sous lumière artificielle et à une température d'environ 25°C. Au bout de 5 jours, les racines secondaires ont atteint une longueur de 2 à 3 cm, idéale pour la réalisation des tests.

Dans ce protocole, les racines plongent dans le milieu nutritif transparent à travers une grille (Figure 7 étape 3) : elles sont donc exposées à la lumière. Les réactions de la plante à ces conditions peu physiologiques pourraient être à l'origine d'une baisse de sensibilité des racines aux toxiques (Ojima et al., 2009).

Le premier essai que nous avons réalisé dans le cadre de l'optimisation du test fut la comparaison avec de jeunes fèves dont les racines ont été cachées de la lumière durant la phase d'apparition des racines secondaires. A la place de la grille, une plaque de polystyrène opaque a été percée pour s'ajuster à la taille des graines, et le récipient de culture a été entouré d'un film opaque. Un tel dispositif garantissait la pousse des racines à l'abri de la lumière tandis que les feuilles y restaient exposées. Un test des micronoyaux a ensuite été réalisé avec l'HM en comparaison avec des plantes dont les racines secondaires avaient poussé à la lumière.



1. Graines de *Vicia faba*.  
Elles sont préalablement trempées 24h dans l'eau déminéralisée, puis débarrassées de leur tégument avant d'être mises à germer 3 jours dans du coton humide.



2. Une graine de *Vicia faba* après germination dans le coton. Les 5 premiers millimètres de la racine primaire sont éliminés afin d'accélérer l'apparition des racines secondaires.



4. Une jeune pousse de *Vicia faba* présentant des racines secondaires d'une longueur idéale pour les tests de contamination en milieu liquide.



3. Les graines de *Vicia faba* continuent leur croissance 5 jours dans le milieu de Hoagland. Ce milieu est changé tous les jours.



Figure 7 : Obtention des jeunes pousses de *Vicia faba*



### 1.1.2 Exposition

L'exposition des plantes aux toxiques est toujours réalisée selon la norme AFNOR NF T90-327.

Lorsqu'il s'agit d'une substance particulière à tester (ex : HM), les concentrations voulues sont obtenues par dilutions en cascade d'une solution-mère dans du milieu de Hoagland. Quant aux matrices complexes échantillonnées sur le terrain, elles peuvent être testées pures ou diluées dans de l'eau bidistillée. Le témoin négatif est toujours constitué de milieu de Hoagland.

Les jeunes pousses de *Vicia faba* obtenues selon le protocole décrit précédemment sont exposées par les racines dans un bécher contenant 200 mL de solution pour 3 fèves. La contamination se déroule toujours en phytotron à 24±2°C et à l'obscurité pour éviter la dégradation de certaines molécules photosensibles. L'exposition dure 48h, et le milieu est changé au bout de 24h. En parallèle, on détermine systématiquement l'élongation racinaire de trois racines en calculant la différence entre leur longueur avant et après contamination.

Les racines subissent plusieurs rinçages à l'eau déminéralisée afin d'éliminer le toxique résiduel avant d'être utilisées pour le test des micronoyaux et le test des comètes.

### 1.1.3 Test des micronoyaux

Après 48h d'exposition, les racines secondaires sont prélevées, rincées à l'eau déminéralisée et fixées une nuit durant à +4°C dans une solution de Carnoy (75% éthanol : 25% acide acétique, v : v), puis elles peuvent être soit conservées à +4°C dans l'éthanol à 70°, soit directement hydrolysées après un rinçage de 10 min dans l'eau déminéralisée. L'hydrolyse se fait dans l'acide chlorhydrique 1M à 60°C pendant 6 min. Elle a pour effet de ramollir les tissus afin de permettre l'étalement de l'extrémité racinaire sur la lame de microscope. La lecture s'effectue après coloration à l'acéto-orcéine 1%.

### 1.1.4 Application à des percolats de sols de cokerie (GISFI)

Le sol pollué aux HAP et métaux lourds prélevé sur le site de l'ancienne cokerie de Neuves-Maisons a été transféré sur le site de l'ancienne cokerie d'Homécourt (Meurthe-et Moselle). Le sol est d'abord criblé à 80 mm et tamisé à 4 mm.

Ce sol a été divisé en 24 parcelles de 6 m<sup>2</sup>. Les 20 premières ont été remplies et traitées selon 5 modalités :

- le sol est laissé nu et régulièrement désherbé manuellement (4 parcelles, dites TN) ;
- le sol est laissé à la recolonisation végétale spontanée (4 parcelles, dites VS) ;
- une plante hyperaccumulatrice de métaux, le tabouret calaminaire (*Thlaspi caerulescens*) est semée (4 parcelles, dites TC) ;
- une plante fixatrice d'azote (ordre des Fabales), la luzerne *Medicago sativa* est semée, mais sans mycorhize (4 parcelles, dites MS) ;
- *Medicago sativa* est semée avec mycorhize à *Glomus intraracides* (4 parcelles, dites MSm).

Les 4 dernières parcelles, dites TD, sont remplies du même sol de départ criblé et tamisé de la même façon, mais ayant subi un traitement de thermodésorption (unité mobile de désorption thermique Deep Green) visant en particulier à détruire les HAP présents.

Les 24 parcelles sont réparties de manière aléatoire.

Un dispositif a été prévu sous chaque parcelle pour récolter l'eau de pluie ayant percolé à travers toute la hauteur de la colonne de sol. Ainsi, les percolats sont récupérés à chaque fois que leur volume est assez abondant pour le permettre.

A chaque prélèvement de percolats, on mesure la température, la hauteur d'eau, le pH, la conductivité, l'oxygène dissous et la concentration en HAP totaux à l'aide d'une sonde.

Les percolats sont conservés en bouteille opaque en chambre froide, à +5°C environ.

Le test des micronoyaux est conduit selon le protocole en milieu liquide détaillé ci-dessus. Une plante est exposée à 100 mL de chaque percolat. Le témoin négatif employé est le milieu de Hoagland. Etant donné que chaque type de traitement a été appliqué à quatre parcelles, nous disposons de quatre réplicats par traitement. L'élongation de trois racines par individu nous donne donc  $n=3 \times 4$  racines. Pour les micronoyaux et l'IM, deux lames sont lues par individu, ce qui nous donne  $n = 2 \times 4$ . Environ 8.000 cellules sont donc examinées pour chaque traitement.

## **1.2 Test des micronoyaux en milieu solide**

Nous avons dans un premier temps appliqué le protocole de Béraud (2007) à des sols de cokerie dans le cadre du programme GISFI pour compléter les études sur les percolats correspondants (chapitre précédent).

En vue de la normalisation ISO du test Vicia-micronoyaux, nous avons dans un deuxième temps optimisé ce test en phase solide.

### 1.2.1 Application à des sols de cokerie (GISFI)

Deux fois par an, des échantillons de sol de chaque parcelle sont prélevés et envoyés dans les différents laboratoires partenaires pour réaliser les analyses et les tests.

Les sols sont tamisés sur place à 4 mm.

Le test micronoyaux est conduit selon le protocole « 5j » décrit au § 1.2.2.1.1. Deux fèves sont plantées dans 200g de sol pour chaque parcelle. On ne retiendra que la plus développée pour les tests. Le sol LUFA 2.2 (Speyer, Allemagne) de pH 5,4 (caractéristiques : Annexe 4) est utilisé comme témoin négatif. Comme pour les percolats, nous disposons donc de trois réplicats pour chaque traitement,  $n = 3 \times 4$  pour l'élongation racinaire et  $n = 2 \times 4$  pour les micronoyaux et l'IM.

### 1.2.2 Optimisation du protocole en milieu solide

Il n'existe pas encore de norme internationale détaillant le protocole à suivre pour réaliser le test des micronoyaux en milieu solide. C'est pourquoi nous avons optimisé le protocole en vue de le proposer à l'ISO au niveau de trois éléments essentiels :

- la durée d'exposition ;
- l'origine des graines utilisées ;
- le nombre de graines par pot.

Le sol standard LUFA 2.2 de pH 5,4 est utilisé comme matrice et le sera pour tous les tests d'optimisation. Le taux d'humidité du sol reste fixé à 85 % de sa capacité de rétention, maintenu chaque jour par pesée. Il nous faut signaler que la capacité de rétention calculée par nos soins (30 mL/100g) est très différente de celle indiquée dans les caractéristiques du sol (46,5 mL/100g). Toutes les expériences se déroulent en phytotron à  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  en lumière artificielle avec une photopériode jour/nuit égale à 16h/8h. La fixation des racines ainsi que la lecture des lames s'effectue selon la norme (§ 1.1.3).

#### 1.2.2.1 Durée d'exposition

Afin de choisir entre les deux protocoles suivants lequel est le plus avantageux, nous avons d'abord exposé de jeunes fèves à deux toxiques de référence pour le test micronoyaux, l'hydrazide maléique et le sulfate de cuivre, suivant le protocole « 48h » ci-dessous, sélectionné arbitrairement. Après avoir testé plusieurs concentrations, nous avons déterminé pour chacun des deux toxiques celle qui induit dans le sol utilisé le « pic de micronoyaux »,

c'est-à-dire celle qui provoque la formation d'un nombre maximal de micronoyaux. En outre, deux autres concentrations sont retenues pour chacune des deux molécules :

- une concentration inférieure à la concentration induisant le pic ;
- une concentration supérieure à la concentration induisant le pic où l'indice mitotique se trouve réduit en dessous de 2%, provoquant une baisse artificielle de la fréquence de micronoyaux.

Les deux protocoles décrits ci-dessous seront ainsi comparés avec nos deux molécules de référence aux trois concentrations précédemment décrites (Figure 8a,b).

#### 1.2.2.1.1 Protocole « 5 jours »

Ce protocole est inspiré de celui employé par Béraud dans le cadre de sa thèse soutenue au LIEBE en 2007. Les graines de *Vicia faba* sont réhydratées et mises à germer 3 jours dans du coton humide comme décrit au §1.1.1, mais lorsque la racine primaire s'est développée, les jeunes pousses sont repiquées directement dans la matrice contaminée humidifiée à 85% de sa capacité de rétention. Comme pour les contaminations en milieu liquide, les 5 premiers millimètres de la racine primaire sont retirés. Les racines secondaires se développeront donc entièrement dans la matrice solide.

Quatre fèves par pot sont plantées dans 200g de sol. Chaque pot est ensuite pesé afin que l'évaporation puisse être exactement compensée par de l'eau osmosée toutes les 24h.

Au bout de 5 jours de culture en phytotron à 24 °C +/- 1 en lumière artificielle avec photopériode jour/nuit de 16h/8h, les trois fèves les plus développées sont extraites du sol avec précaution et les racines secondaires sont nettoyées à l'eau déminéralisée avant d'être utilisées pour les tests. La mesure de l'élongation racinaire en milieu solide est plus compliquée qu'en milieu liquide car lorsque les fèves sont repiquées dans le sol contaminé, elles ne comportent que leur racine primaire. A la fin de la contamination, on ne peut donc pas mesurer l'élongation racinaire, mais uniquement la longueur des racines secondaires. Après quelques essais, nous avons jugé pertinent de choisir comme indicateurs la longueur des trois plus longues racines et le nombre total de racines secondaires.

#### 1.2.2.1.2 Protocole « 48 heures »

Au contraire de Béraud (2007), De Marco et al. (2005) laissent les graines de *Vicia faba* germer durant 4 jours dans un sol non contaminé avant de les repiquer dans un sol contenant de l'hydrazide maléique. L'exposition est de 2 jours. Sur la base de cet article, nous avons tenté de laisser les racines secondaires se développer durant 4 jours en hydroponie dans du

milieu de Hoagland avant de repiquer trois plantules dans 200g de sol contaminé pour une exposition de 48h. La culture se fait dans les mêmes conditions que précédemment (taux d'humidité du sol, température, lumière). L'indicateur de croissance retenu est le même qu'en milieu liquide, à savoir l'élongation racinaire de trois racines par plante. En milieu solide, on prendra néanmoins la précaution de mesurer quatre racines avant exposition, au cas où l'une d'entre elles serait abîmée lors du repiquage.

### ***1.2.2.2 Origine des graines utilisées***

Il a été prouvé que *Vicia faba* pouvait devenir tolérante à une pollution métallique par le cadmium au fil des générations lorsqu'elle était cultivée sur sol contaminé par ce métal (Duan et al. 2000). Cette tolérance acquise peut poser des problèmes de sensibilité du test des micronoyaux s'il est effectué sur des fèves commerciales ayant été obtenues par culture conventionnelle dans des conditions non maîtrisées. C'est pourquoi nous avons voulu comparer la sensibilité de nos fèves habituelles avec des individus de même variété (Aguadulce) et du même fournisseur (Fabre, Metz), mais issues de l'agriculture biologique (labellisées AB) selon le protocole 48h (Figure 8c). Les toxiques de référence restent l'HM et  $\text{CuSO}_4$  aux trois concentrations fixées précédemment.

### ***1.2.2.3 Nombre de graines par pot***

De Marco et al. (2005) ayant établi que le nombre de micronoyaux trouvés dans les racines de *Vicia faba* exposée à l'HM était très diminué lorsque les graines étaient plantées trop près les unes des autres, nous avons cherché à savoir si le fait que trois individus partagent le même pot pouvait influencer sur le résultat du test des micronoyaux. Pour ce faire, nous avons exposé selon le protocole 48h, d'une part trois fèves dans un même pot rempli de 390g de sol, et d'autre part trois fèves en pots individuels de 130g de sol chacun (Figure 8d). La quantité de sol a été augmentée à 390g au lieu des 200g habituels afin que toutes les plantes disposent de la même quantité de sol chacune, sachant que 130g était le minimum de volume dans lequel on pouvait faire pousser une fève dans des conditions acceptables. Ce test n'a été réalisé qu'avec l'HM aux trois concentrations préfixées.

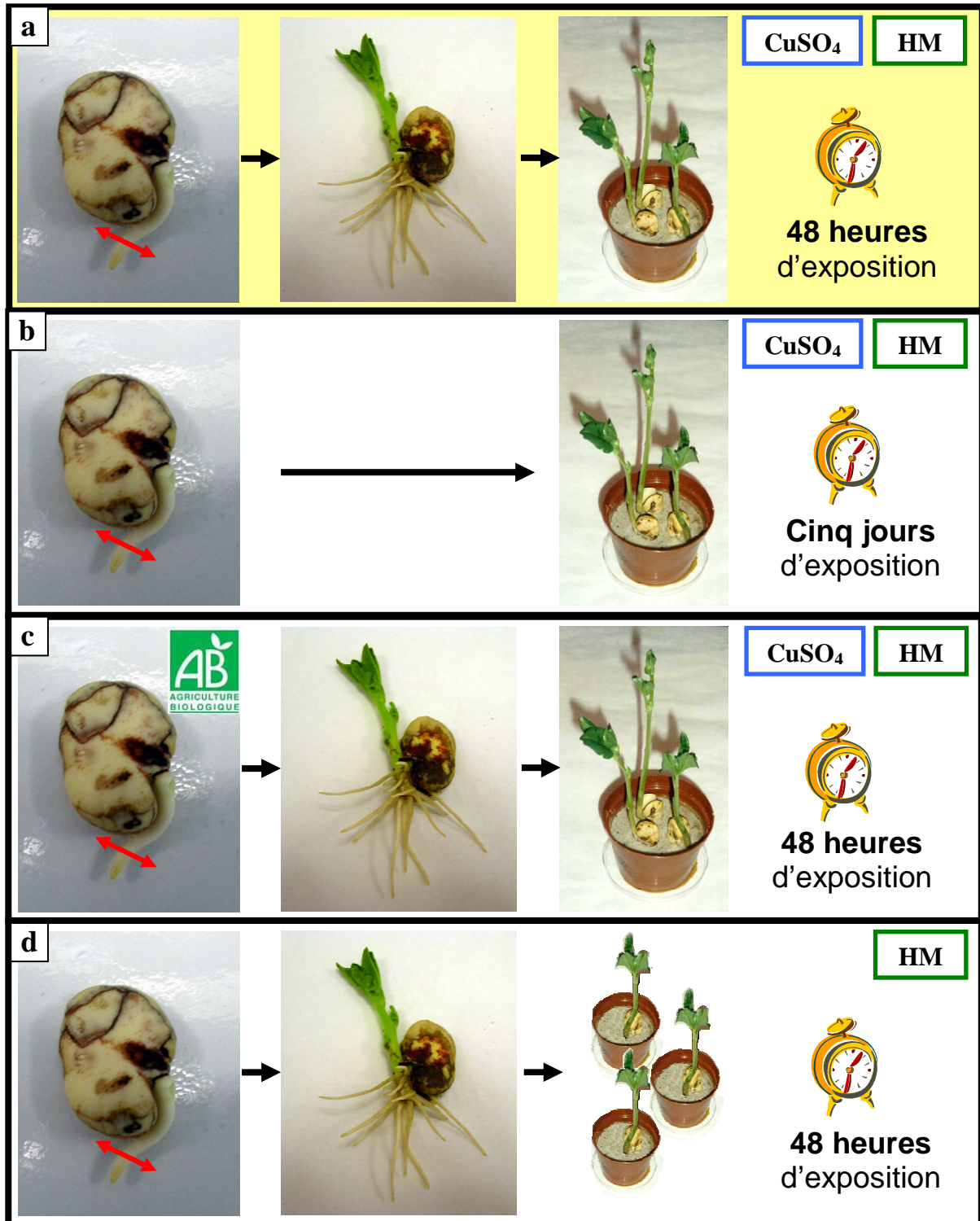


Figure 8 : Illustrations schématiques des différents protocoles testés pour l'optimisation du test des micronoyaux. Chacun des protocoles (b), (c) et (d) ont été comparés au protocole (a).

## 2 Test des comètes

Le test des comètes a été optimisé en prenant pour base le protocole de Cotelle, 1999.

Ce test se réalise sur les racines secondaires de *Vicia faba* : moins rigides et plus nombreuses que les racines primaires, elles sont faciles et rapides à obtenir ; de plus, elles sont relativement épaisses, ce qui facilite l'extraction des noyaux. La racine est également le premier organe à entrer en contact avec le toxique, c'est donc logiquement dans ce tissu que les phénomènes toxiques seront les plus rapides et les plus prononcés. En effet, Gichner en 2004 intoxique des plants de tabac par la racine dans du  $\text{CdCl}_2$  durant 24 ou 72h et ne trouve de génotoxicité que dans les racines et pas dans les feuilles.

Le protocole détaillé ci-dessous est celui qui a été retenu après une longue phase d'optimisation. Les graphiques de la partie Résultats ne sont donc pas forcément issus de ce protocole exact. Les différences seront énoncées dans la légende de chaque figure. L'obtention des plantes utilisées pour les tests est décrite au §1.1.1. La contamination se fait en milieu liquide comme indiqué au § 1.1.2.

### 2.1 Préparation des lames

#### 2.1.1 Première couche d'agarose

Afin d'empêcher le décollement de la couche d'agarose que l'on déposera sur les lames au cours du test, il est nécessaire de revêtir préalablement ces dernières d'une première couche d'agarose. Pour ce faire, 0,5% d'agarose à bas point de fusion est dissous dans du PBS à une température de 70°C. Puis une gouttelette de 70 $\mu\text{L}$  de cette solution est étalée sur chaque lame à l'aide d'un cône de micropipette. Les lames ainsi traitées sont laissées à sécher au moins une nuit à plat, dans une boîte à l'abri de la poussière, puis sont conservées dans leur boîte originelle. On attendra au moins 3 à 4 jours avant de les utiliser, pour s'assurer qu'elles soient complètement sèches.

#### 2.1.2 Obtention des noyaux et inclusion en gel d'agarose

Toutes les opérations suivantes doivent s'effectuer dans une pièce aveugle ou après parfait calfeutrage des ouvertures, porte fermée, éclairée en lumière rouge (attention à la

claustrophobie...). On veillera également à travailler sur de la glace afin de maintenir les noyaux à une température d'environ +4°C.

Deux solutions de LMPA dans du PBS, l'une à 0,5% et l'autre à 1%, sont placées préalablement dans un bain-Marie à 70°C. Une fois l'agarose fondu, il est maintenu dans un bain-Marie à +35°C. Une température supérieure pourrait endommager l'ADN, mais en dessous de +30°C, l'agarose commence à se solidifier.

Les principales étapes de la fabrication des lames sont illustrées dans la Figure 9.

Dix racines secondaires de 1 cm chacune sont isolées de chaque plante en prenant soin d'éliminer les 5 premiers millimètres de l'extrémité de chaque racine ; en effet, l'extrémité méristématique des racines contient un fort taux de noyaux mitotiques qui se prêtent mal au test. Ces morceaux de racines sont rincés brièvement dans du PBS. Sur de la glace, elles sont découpées en très petites tranches à l'aide d'un scalpel ou d'une lame de rasoir dans une boîte de Petri contenant 200 µL de tampon PBS + Na<sub>2</sub>EDTA 5mM. Le tampon contenant les noyaux est ensuite récupéré. 100µL de cette suspension nucléaire sont alors mélangés à 100µL de LMPA 1% à une température de 35°C. 100µL sont alors déposés sur deux lames différentes préalablement recouvertes d'une première couche d'agarose séché comme indiqué précédemment. Chaque lame est laissée sur la glace 5 à 10 min, temps nécessaire à la solidification de l'agarose (deuxième couche). La lamelle est retirée avec précaution et on ajoute 90µL de LMPA 0,5% dans du PBS à 35°C. Le tout est recouvert d'une seconde lamelle (troisième couche). La lame est laissée sur la glace 5 à 10 min. La lamelle est retirée.

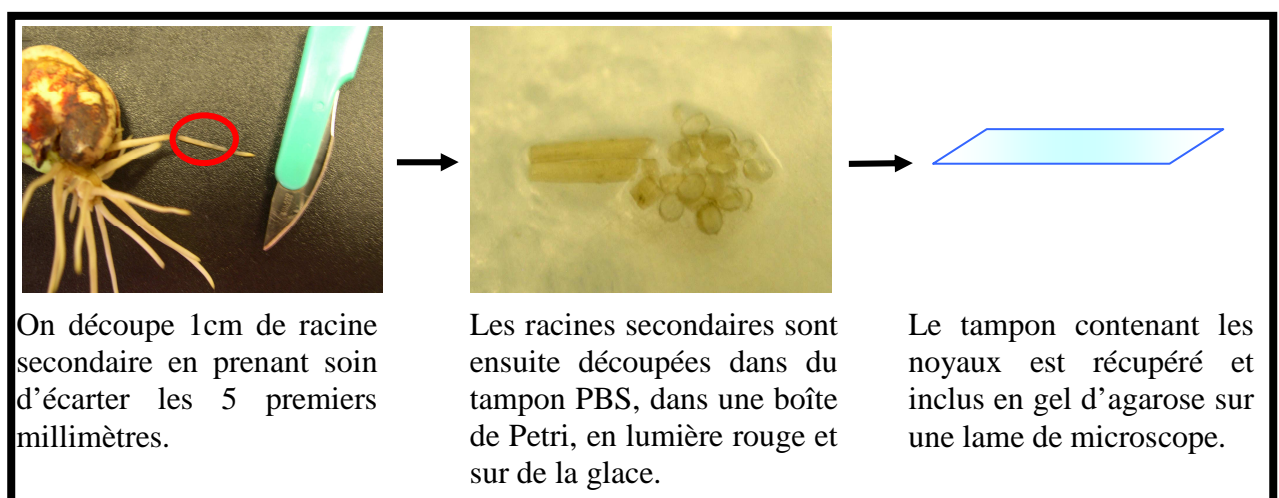


Figure 9 : Principales étapes de préparation des lames en vue du test des comètes



## **2.2 Le test des comètes**

Le test en conditions alcalines tel que nous le réalisons ici a été mis au point par Singh et al. (1988).

Toutes les étapes suivantes se déroulent également en lumière rouge ; de plus, il faut veiller à maintenir tous les tampons à basse température (+4°C) par un séjour au réfrigérateur avant que les lames n'y soient immergées. La composition des différents tampons utilisés est détaillée dans l'annexe 2. Leur volume dépend du nombre de lames à traiter. Selon les cuves utilisées, il faut compter 100 mL pour 10 lames. La Figure 10 montre l'aspect des noyaux après coloration et fixation à la fin de chaque étape principale du test.

### **2.2.1 Lyse**

Aussitôt la troisième couche d'agarose solidifiée, les lames privées de lamelle sont plongées durant au moins 20 min dans la solution de lyse préalablement refroidie pendant environ 1h au réfrigérateur (au-delà, la solution risque de se solidifier).

Cette étape est facultative. Il est alors recommandé de remplacer la solution de lyse par du PBS pour plonger les lames au fur et à mesure de leur fabrication et éviter leur dessèchement.

### **2.2.2 Dénaturation**

Une fois retirées de la solution de lyse, les lames sont brièvement rincées dans la solution d'électrophorèse. Elles sont ensuite rangées dans la cuve d'électrophorèse remplie de la même solution où on laissera d'abord l'ADN se dénaturer durant 15 min, cuve éteinte.

### **2.2.3 Electrophorèse**

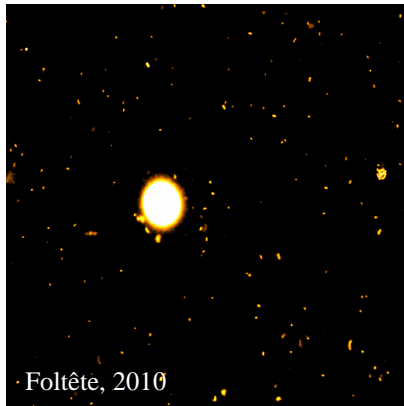
Au bout de ces 15 min, la cuve est mise sous tension à 300 mA pendant 30 min. Le rapport entre la tension et l'intensité dépend du volume de tampon. Pour 1,2 L de tampon, l'intensité est fixée à 15 V. Il est recommandé de poser la cuve sur la glace, afin d'éviter que le tampon ne chauffe pendant la migration.

### **2.2.4 Neutralisation**

Les lames sont retirées de la cuve et leur pH est ramené à 7,5 par deux rinçages successifs dans la solution de neutralisation.

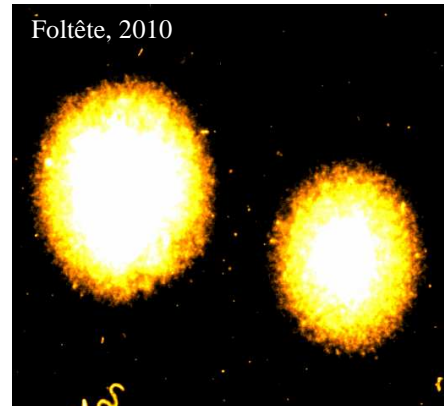
### **2.2.5 Fixation**

Les lames sont fixées par un passage de 5 min exactement dans l'éthanol à 95°. Un temps plus long peut altérer la qualité des comètes. Les lames peuvent ainsi se conserver au moins plusieurs semaines.



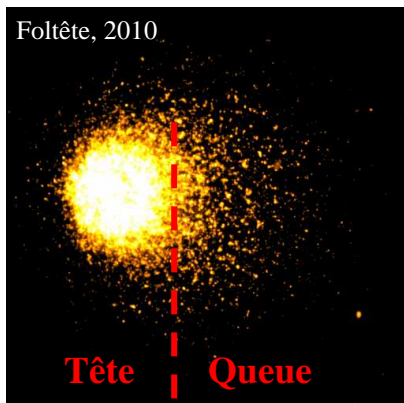
Aspect d'un noyau de *Vicia faba* n'ayant pas subi le test des comètes : il est très condensé et bien délimité (grossissement x 400).

LYSE  
→



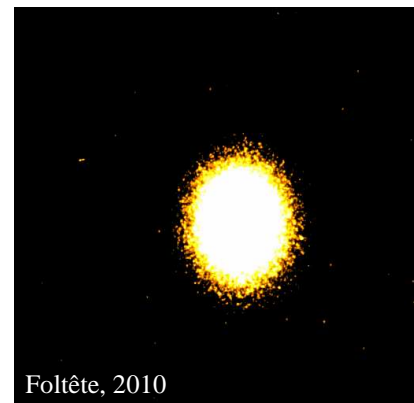
Aspect de deux noyaux de *Vicia faba* après la lyse. On voit une très nette décondensation due à la perte de la membrane nucléaire et au début de dénaturation de l'ADN (grossissement x 400).

DENATURATION  
↓



Une comète obtenue sur *Vicia faba* après 2h de contamination à  $\text{CdCl}_2$   $10^{-8}\text{M}$  en milieu liquide. La tête contient l'ADN intact, et la queue est formée de l'ADN dégradé (grossissement x 400).

ELECTROPHORESE  
←



Aspect d'un noyau de *Vicia faba* après dénaturation et neutralisation. Contrairement à l'image précédente, celle-ci est constituée de minuscules spots accolés dûs à la dénaturation et au réappariement aléatoire (grossissement x 400).

Figure 10 : Les différentes étapes du test des comètes.

### 2.3 Observation des noyaux

Le traitement au bromure d'éthidium (BET) permet de rendre l'ADN fluorescent. Pour la lecture, nous avons utilisé un microscope à fluorescence équipé d'une lampe au mercure complétée d'un miroir dichroïque DM 570 (filtre d'excitation : BP 510-550 nm ; filtre barrière : BA 590 nm). Ce microscope est également relié à une caméra CCD qui permet l'analyse des images par le logiciel Komet 3.1 (Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK). En janvier 2008, notre laboratoire a fait l'acquisition d'un nouveau logiciel d'analyse d'image : Comet Assay IV (Perceptive Instruments), relié au microscope par une nouvelle caméra (monochrome CCD IEEE1394 Fire Wire). Ce logiciel, plus rapide et plus pratique, montre également une sensibilité et une précision bien supérieures à ce que permettait l'ancien équipement.

Sur chaque lame, 50 noyaux sont analysés :

A partir de l'image d'une comète, le logiciel détermine la limite entre la tête et la queue (Figure 10) et calcule une trentaine de mesures. Mais les quatre paramètres le plus souvent pris en compte par les auteurs dans la bibliographie sont :

- le pourcentage d'ADN dans la queue ou tail DNA : il reflète le taux d'ADN dégradé par rapport à l'ADN total ;
- la longueur de la queue ou tail length en  $\mu\text{m}$  : elle représente en réalité la taille des plus petits fragments d'ADN dégradé. Plus ces derniers sont petits, plus la queue sera longue ;
- le moment de queue ou tail extent moment en  $\mu\text{m}$  : c'est le produit des deux paramètres précédents ;
- Le moment d'Olive ou Olive tail moment (OTM, unités arbitraires) : c'est le produit du tail DNA avec la distance entre les centres de gravité de la tête et de la queue.

Nous avons choisi de nous intéresser uniquement au pourcentage d'ADN dans la queue (Tail DNA), car nous le considérons comme le paramètre le plus fiable : il représente exactement ce que nous désirons connaître, c'est à dire le taux de dégradation de l'ADN. De plus, sa mesure par le logiciel semble moins sujette à controverse que le tail length.

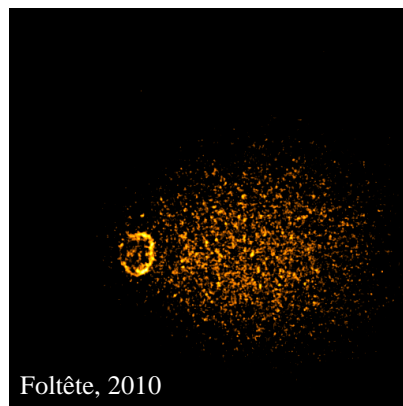
Par ailleurs, le tail moment, paramètre pris en compte par la très grande majorité des auteurs, a tendance à être de plus en plus délaissé au profit du tail DNA. Ce dernier semble plus pertinent que le tail moment, car le tail length est critiqué (Møller 2006).

Récemment les auteurs préfèrent choisir au moins deux paramètres, dont le tail DNA fait souvent partie. Le moment d'Olive a également ses adeptes (Liu et al. 2009). Chakraborty et al. (2009) utilisent le tail DNA, le tail length et le moment d'Olive. Parmi les trois, le tail DNA s'est montré beaucoup plus sensible que les autres.

L'inconvénient du moment d'Olive réside dans le fait qu'il est mesuré en unités arbitraires, ce qui pose un problème pour la comparaison interlaboratoire des résultats (Kumaravel and Jha 2006).

Les « ghost cells » (Figure 11), encore appelées « hedgehogs » ou cellules-hérisson, sont les restes d'une cellule apoptotique. Elles se présentent sous la forme d'un anneau vide suivi d'une queue très longue et épaisse (Mancini et al., 2006).

Dans la lecture d'une lame, ces cellules apoptotiques ne doivent pas être prises en compte.



**Figure 11 : Ghost cell ou hedgehog. On voit bien le vestige de noyau sous forme d'anneau et une grosse quantité d'ADN dégradé dans la queue (grossissement x 400).**

En annexe 3 sont présentés certains trucs et astuces utiles pour les étudiants qui prendront ma suite.

### 3 Dosage des phytochélatines par HPLC

#### 3.1 Extraction des thiols

Nous suivons le protocole utilisé par Béraud (2007) : méthode de Tang et al. (2000) modifiée par Courbot et al. (2004).

Les feuilles et racines prélevées sont d'abord rincées à l'eau déminéralisée, puis séchées et pesées en poids frais. Elles sont alors introduites dans des micro-tubes de 2 mL et congelées à -80°C.

Une fois décongelés, les tissus sont broyés au mortier dans 1 mL (racines) ou 2 mL (feuilles) d'une solution d'extraction composée d'acide sulfosalicylique (SSA) à 5% et d'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA) à 5 mM. Le plus grand volume possible de solution d'extraction est ensuite récupéré, placé dans un autre micro-tube et centrifugé à 10 000 g pendant 10 min. Le surnageant est aspiré et utilisé pour le dosage. Il peut être stocké à -80°C avant analyse.

#### 3.2 Réduction des thiols

Un volume de 100 µL de l'échantillon à doser est mélangé à 270 µL de tampon borate (acide borique 0,2M + DTPA 4mM, pH = 9) auxquels on ajoute 20 µL de NaOH 2M pour compenser l'acidité de la solution d'extraction SSA-DTPA et ajuster le pH à 9.

On ajoute ensuite 50 µL de tributyl-phosphine (TBP) diluée au 1/20ème dans du diméthylformamide (DMF). La TBP est un réducteur qui permet de faire passer tous les thiols à l'état réduit, car le marqueur ne se fixe que sur les fonctions thiols libres. Avant de fermer le tube, on remplace l'air par du diazote, gaz inerte qui évite la réoxydation. Les tubes sont portés à +50°C pendant 5 min.

#### 3.3 Dérivation

On ajoute dans les micro-tubes 30 µL de 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfosamide (ABD-F) qui se fixe sur les fonctions thiols libres. Encore une fois, l'air est remplacé par du diazote. Les tubes sont laissés à +50°C pendant 20 min.

Ensuite, ils sont retirés et immédiatement placés sur de la glace afin de stopper la réaction, qui est définitivement bloquée par l'ajout de 70µL d'acide chlorhydrique à 1M. Le pH doit alors être égal à 2.

### **3.4 Dosage HPLC**

Le contenu des micro-tubes est transféré dans des tubes pour injecteur automatique HPLC (234 autoinjector, Gilson). Ils sont maintenus à +4°C jusqu'au dosage.

20 µL d'échantillons sont injectés dans la colonne (C18) préalablement équilibrée (au moins 2h à 0,4 mL/min, 10% acétonitrile, 0,1%TFA) et maintenue à +40°C. La phase mobile est constituée d'un gradient eau/acétonitrile (pompe Gilson 322) allant de 0 à 50% d'acétonitrile et acidifié par de l'acide trifluoroacétique (TFA) à 0,1%. Le débit est de 0,4 mL/min.

La détection est assurée par un détecteur spectrofluorimétrique (Jasco FP 920) avec  $\lambda_{\text{excitation}}=385\text{nm}$  et  $\lambda_{\text{émission}}=515\text{nm}$ . Le gain est de 100 et la largeur de fente égale à 40 nm.

Des courbes d'étalonnage sont réalisées à l'aide de gammes de glutathion,  $\gamma$ -glutamyl-cystéine et cystéine commerciaux dans du SSA-DTPA. Des standards PC2, PC3, PC4 et PC5 (Anaspec) sont également utilisés dilués dans du SSA-DTPA pour le dosage de chaque PC.

Les quantités de GSH et de PC seront exprimées en moles par gramme de poids frais.

## **4 Le programme Nanoalter**

### **4.1 Vieillesse accélérée des nanocomposites**

Le protocole d'altération des nanocomposites a été assumé par le CEREGE d'Aix-en-Provence. Il est décrit par Labille et al. (2010).

Cent milligrammes de nanomatériaux sont introduits dans 250 mL d'eau ultrapure. Le container utilisé est un bécher de 1 L à large ouverture, pour un maximum d'interface air / eau, permettant un maximum d'exposition aux UV. Le mélange est laissé sous agitation par barreau aimanté et sous lampe blanche pendant 48 h. Le pH est laissé libre. L'évaporation de l'eau est compensée par des apports réguliers d'eau ultrapure. La vitesse d'agitation est de 690 tpm. La lampe utilisée est une lampe à iodure métallique 400 W Philips Master HPI-T Plus. Elle est installée dans un système cool tube avec extraction de l'air chaud, à 50 cm de la surface du milieu d'altération.

A la fin de l'étape de vieillissement artificiel, la suspension obtenue est décantée durant 48h. 3 phases se forment alors : une phase hydrophobe à la surface, une phase déposée au fond du récipient et composée des particules de 1 à 5 µm, et une phase en suspension stable. Cette dernière est séparée des deux autres et constitue la suspension mère de sous-produits

d'altération (SPA) utilisée pour les tests. Sa concentration en SPA est déterminée par la pesée de l'extrait sec.

## **4.2 Exposition**

Ne connaissant pas la toxicité des SPA, nous avons pris la précaution de travailler sous boîte à gants pour toutes les étapes de contamination et de prélèvements des tissus végétaux.

Les concentrations voulues en SPA (5, 25 et 50 mg/L) sont obtenues par dilutions en cascade d'une solution-mère dans une matrice composée à 50% d'eau Evian<sup>®</sup> et 50% d'eau milli-Q. Le témoin négatif correspond à la matrice utilisée pour la dilution des nanoparticules alors que le témoin positif micronoyaux est constitué d'hydrazide maléique à la concentration de  $10^{-5}$ M dilué dans la même matrice. Pour les marqueurs du stress oxydant et les contenus en thiols, le métal de référence choisi est  $\text{CdCl}_2$  à 0,1 mM.

Le pH de chaque solution de contamination et du témoin négatif est ajusté avec  $\text{HNO}_3$  afin d'obtenir un pH de 6,5. Dans les témoins positifs, le pH est laissé libre.

Les jeunes fèves sont retirées de leur milieu de croissance et leur partie racinaire est rincée une première fois à l'eau déminéralisée puis dans la matrice de dilution. La longueur de 3 de leurs racines secondaires est alors mesurée. Leur partie racinaire est ensuite immergée dans un pot de verre (sodocalcique Wheaton 800<sup>®</sup>) contenant 100 mL de solution de contamination. La contamination dure 48h sans changement de milieu. Elle se fait en 4 réplicats et se déroule dans une boîte à gants. Une protection opaque est placée autour des pots, de telle sorte que les racines et le toxique se trouvent à l'obscurité pour éviter la dégradation de certaines molécules photosensibles, tandis que les feuilles sont exposées à la lumière (Figure 12). L'ampoule utilisée (Envirolite<sup>®</sup>), de puissance 125 Watts, est une ampoule fluorescente de couleur bleue (6400°K) délivrant 12 000 Lumens. Son spectre est assimilé à 100% par les plantes. Les jarres de contamination sont réparties de manière aléatoire dans la boîte à gants afin de compenser l'éventuelle hétérogénéité de l'énergie lumineuse reçue. L'ampoule reste allumée sans photopériode durant les 48h que dure la contamination. La température, mesurée le jour de la contamination et le lendemain, est d'environ  $19 \pm 1$  °C.

La suspension est agitée 3 fois dans les 48h par reflux à l'aide d'une micropipette de 5 mL.





Figure 12 : dispositif d'exposition des plantes aux nanoparticules

### 4.3 Récupération du matériel biologique et tests

Au bout de 48h, la fluorescence chlorophyllienne des feuilles de chaque individu (dans la mesure où les feuilles sont assez développées pour le permettre) est mesurée à l'aide d'un analyseur portable de fluorescence (Handy PEA, Hansatech Instruments®). Cet appareil fournit le rapport  $F_v/F_m$  ( $F_v = F_m - F_o$  ;  $F_m$  = fluorescence chlorophyllienne en lumière saturante ;  $F_o$  = fluorescence chlorophyllienne à l'obscurité). Ce rapport est proportionnel au rendement quantique maximum de la photochimie du photosystème II.

Les fèves sont ensuite retirées de leur milieu de contamination. Le pH de ce dernier est mesuré.

Les racines subissent 2 rinçages à l'eau déminéralisée afin d'éliminer le toxique résiduel avant d'être prélevées. L'élongation racinaire est systématiquement déterminée sur 3 racines de 4 individus par concentration en calculant la différence entre la longueur des racines avant et après contamination.

Les 2 premiers cm des racines secondaires sont placés immédiatement dans la solution de Carnoy en vue de leur fixation pour la lecture des micronoyaux.

le reste des racines ainsi que les feuilles sont répartis dans des cryotubes puis congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  en vue du dosage des enzymes du stress oxydant et des phytochélatines, ainsi que dans des microtubes en vue du séchage et du dosage des métaux (conservation :  $-20^{\circ}\text{C}$ ).

Toutes les parties vertes sont pesées pour en déterminer la masse fraîche.

Le test des micronoyaux (§ 1.1.3) est réalisé sur 2 racines par individu, et 4 individus par concentration. Huit lames sont donc lues pour chaque concentration. Pour chaque lame, on détermine le nombre de mitoses et de micronoyaux présents pour 1000 cellules.

La lecture est réalisée en aveugle strict.

Pour la mesure du stress oxydant, les activités enzymatiques de la superoxyde dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), de la catalase (CAT, EC 1.11.1.6), de la guaiacol peroxydase (GPX, EC 1.11.1.7), de l'ascorbate peroxydase (APX, EC 1.11.1.11) et de la glutathion reductase (GR, EC 1.6.4.2) sont mesurées selon Dazy et al. (2008).

La peroxydation lipidique est évaluée par le test à l'acide thiobarbiturique (Aravind and Prasad 2003). Brièvement, 900  $\mu\text{L}$  de TBA dilué à 0,5% dans l'acide thiobarbiturique à 20% (w/v) est ajouté à 100  $\mu\text{L}$  d'extrait de plante. Le mélange est incubé à 95°C pendant 30 min, puis la réaction est stoppée en transférant les tubes sur la glace. L'absorbance non spécifique à 600 nm est soustraite de l'absorbance à 532 nm et un  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  est utilisé pour le calcul du taux de malonedialdéhyde (MDA).

Le dosage du glutathion total et des phytochélatines est effectué dans les feuilles et les racines suivant le protocole décrit au § 3.

Les concentrations de Ti et Al sont mesurées par ICP-MS dans les racines après minéralisation dans HF-HClO<sub>4</sub>.

Une analyse au microscope à fluorescence à rayons X (XRF) est réalisée sur les racines fixées dans la solution de Carnoy et conservées à +4°C dans l'éthanol à 70%. Cette analyse révèle la répartition du titane dans les racines. L'aluminium, pour sa part, se trouvait à des concentrations trop faibles pour être cartographié par cette méthode.

## 5 Tests à long terme

L'objectif de ces tests est d'étudier les effets à long terme des polluants lorsqu'ils agissent à une concentration génotoxique, sans effet sur les paramètres classiques de toxicité. Pour ce faire, on détermine dans un premier temps la concentration qui, dans un sol donné, induit un nombre significatif de micronoyaux (§ 1.1.3) sans inhiber l'élongation racinaire selon le protocole « 48h » (§ 1.2.2.1.2).

Une première expérience est conduite avec  $\text{CdCl}_2$ , dans le sol LUFA 3A (Speyer, Allemagne, caractéristiques en annexe 4). Une autre expérience indépendante est menée plus tard avec l'HM et  $\text{CuSO}_4$  dans le sol LUFA 2.2.

Trois kilogrammes de sol sont contaminés avec la molécule choisie, en solution dans l'eau osmosée. Le taux d'humidité est fixé à 85% de la capacité de rétention du sol utilisé. Dix graines sèches de fève, de dimension et d'aspect comparables, sont plantées dans chaque pot, à environ 2 cm de profondeur. On prend soin de les placer à la verticale, l'embryon de racine orienté vers le bas afin de lui éviter de se « replier » pour pousser dans le bon sens. Durant la période de germination, le taux d'humidité est ajusté tous les jours par pesée, en ajoutant de l'eau osmosée. Le temps d'émergence et le taux de germination sont notés.

Après émergence, les plantes sont arrosées une fois par semaine ou plus selon le taux d'évaporation ambiant. Au bout d'un mois environ, 100 mL de milieu de Hoagland sont ajoutés toutes les semaines car le sol employé est peu nutritif et risque l'épuisement.

L'expérience avec  $\text{CdCl}_2$  est conduite en phytotron les deux premiers mois, à 23°C sous deux tubes au néon GRO-LUX 36W/120cm (Sylvania) avec une photopériode jour/nuit de 16h/8h. Ensuite, la luminosité étant insuffisante, les pots sont transportés dans une serre où les plantes bénéficient de la lumière et de la photopériode naturelles (avril, mai, juin 2008).

En revanche, l'expérience avec HM et  $\text{CuSO}_4$  est menée dans le sol LUFA 2.2 et se déroule intégralement dans le phytotron, mais sous une lampe beaucoup plus adaptée à la croissance des végétaux. De puissance 125 Watts, cette ampoule fluorescente (Envirolite®) de couleur bleue (6400°K) délivre 12.000 Lumens et possède un spectre assimilé à 100 % par les plantes.

Chaque semaine, la croissance des plantes est appréciée en dénombrant le nombre de bourgeons latéraux apparus sur la tige. Le bourgeon apical n'est pas compté, et en cas d'apparition de tiges secondaires, fréquent chez cette espèce, on additionne le nombre de bourgeons latéraux de toutes les tiges. Les nécroses, chloroses, déformations ou dessèchement de feuilles sont notées également. La vitesse initiale de pousse (en nombre de bourgeons apparus par jour) est calculée pour chaque individu entre son jour d'émergence et le jour 25. La vitesse de pousse est également appréciée par régression linéaire sur toutes les mesures effectuées. La production de fleurs ou de fruits est minutieusement suivie tous les deux à trois jours.

## 6 Exploitation statistique des données

L'exploitation statistique est réalisée à l'aide du logiciel Statistica (StatSoft, Inc., USA), versions 6.1 et 7.0.

Pour les variables quantitatives, le test de Shapiro-Wilk est d'abord systématiquement réalisé sur chacun des groupes de variables à comparer entre eux afin de vérifier si la répartition des données peut être approchée par une loi normale (répartition gaussienne). S'il n'est significatif dans aucun des groupes à comparer ( $p > 0,01$ ), on admet que la répartition des variables de chacun de ces groupes peut être approchée par une loi gaussienne, ce qui autorise l'utilisation des tests paramétriques basés sur cette loi.

L'homogénéité intergroupe des variances (homoscédasticité) est ensuite testée par le test de Levene. S'il n'est pas significatif ( $p > 0,01$ ), on considère que les variances de tous les groupes ne sont pas différentes entre elles, ce qui autorise le calcul d'une variance commune à tous les groupes.

Si notre jeu de données répond à ces deux caractéristiques, on pourra employer le test du t de Student pour les comparaisons 2 à 2, et une analyse de variance à un facteur, ou ANOVA, pour les comparaisons multiples. La probabilité que toutes les variables puissent être décrites par une même loi normale est représentée par  $p$ . Si  $p < 0,05$ , le test est dit significatif car cette probabilité est trop faible pour être réaliste. Les groupes comparés sont donc considérés statistiquement significativement différents.

Dans le cas d'une ANOVA non significative, tous nos groupes peuvent être considérés comme équivalents. Par contre, une ANOVA significative ( $p < 0,05$ ) nous apprend seulement

qu'il existe des différences non négligeables entre les groupes. Pour en savoir plus, il faut faire un test *post-hoc*. Nous utiliserons le test HSD de Tukey pour obtenir une comparaison 2 à 2 de tous les groupes, et le test t de Dunnett pour comparer uniquement chaque groupe traité au groupe témoin. Là encore, les différences seront considérées comme significatives si  $p < 0,05$ .

Si notre jeu de variables ne répond pas aux pré-requis de normalité et d'homoscédasticité, il est possible de réaliser un changement de variable non linéaire ( $\log(x)$ ,  $\sqrt{x}$ ,  $1/x$ ). S'il est impossible de satisfaire à ces pré-requis, on utilisera des tests non paramétriques : Kruskal-Wallis pour les comparaisons de plusieurs variables suivi du test U de Mann-Whitney comme test *post-hoc*, en prenant toujours un risque de premier ordre  $\alpha = 5\%$ .

Pour les variables qualitatives, on utilise un test du Khi-deux ( $\chi^2$ ) en s'assurant que les effectifs de chaque catégorie sont au moins égaux à 5 dans chaque groupe. Les groupes sont considérés comme différents si  $p < 0,05$ .

## *Résultats et Discussion*

---



# 1 Test des micronoyaux

## 1.1 Formation, aspect et devenir des micronoyaux

### 1.1.1 Action de l'hydrazide maléique

L'hydrazide maléique est un clastogène, ce qui signifie qu'il provoque des cassures chromosomiques. Les fragments de chromosomes détachés sont visibles durant l'anaphase (Figure 13a, b). Ces ana-télophases atypiques sont décrites dans les racines de *Pisum sativum*, *Vicia faba* et *Allium cepa* exposées à l'HM (Ferrara et al. 2004; Marcano et al. 2004). Marcano et al. (2004) décrivent également chez *Allium cepa* un effet aneugène dû à la désorganisation du fuseau mitotique, excluant un chromosome entier durant l'ana-télophase. Nous avons également pu observer ce phénomène (Figure 13c).

Ces fragments ou chromosomes exclus sont évacués du reste du matériel génétique. A l'interphase suivante, l'une des cellules filles présentera un micronoyau dans son cytoplasme (Figure 13d, e), voire, beaucoup plus rarement, plusieurs micronoyaux (Figure 13f). Dans certains cas, la cellule peut continuer son cycle et entrer de nouveau en mitose ; le micronoyau peut également poursuivre son propre cycle indépendamment du noyau principal, soit en phase synchronisée (Figure 13g, h, i), soit en phase décalée (Figure 13j, k, l). Dans le premier cas, lorsque le micronoyau et le noyau principal sont synchrones, une réintégration du micronoyau est en théorie possible (Rizzoni et al. 1989). On peut alors imaginer que plusieurs micronoyaux présents dans le cytoplasme de la même cellule peuvent découler :

- d'une grande quantité d'ADN perdu suite à l'action des toxiques sur différents *loci* et qui pourrait se répartir dans plusieurs micronoyaux à la fin d'une même division ;
- de pertes successives d'une partie du matériel génétique au cours de deux cycles de division distincts ;
- de la mitose d'un micronoyau (Das 1962).

Il est important de signaler que les cellules à deux micronoyaux ont été observées à 5 jours d'exposition (Figure 13f), ce qui va dans le sens de ces deux dernières hypothèses.



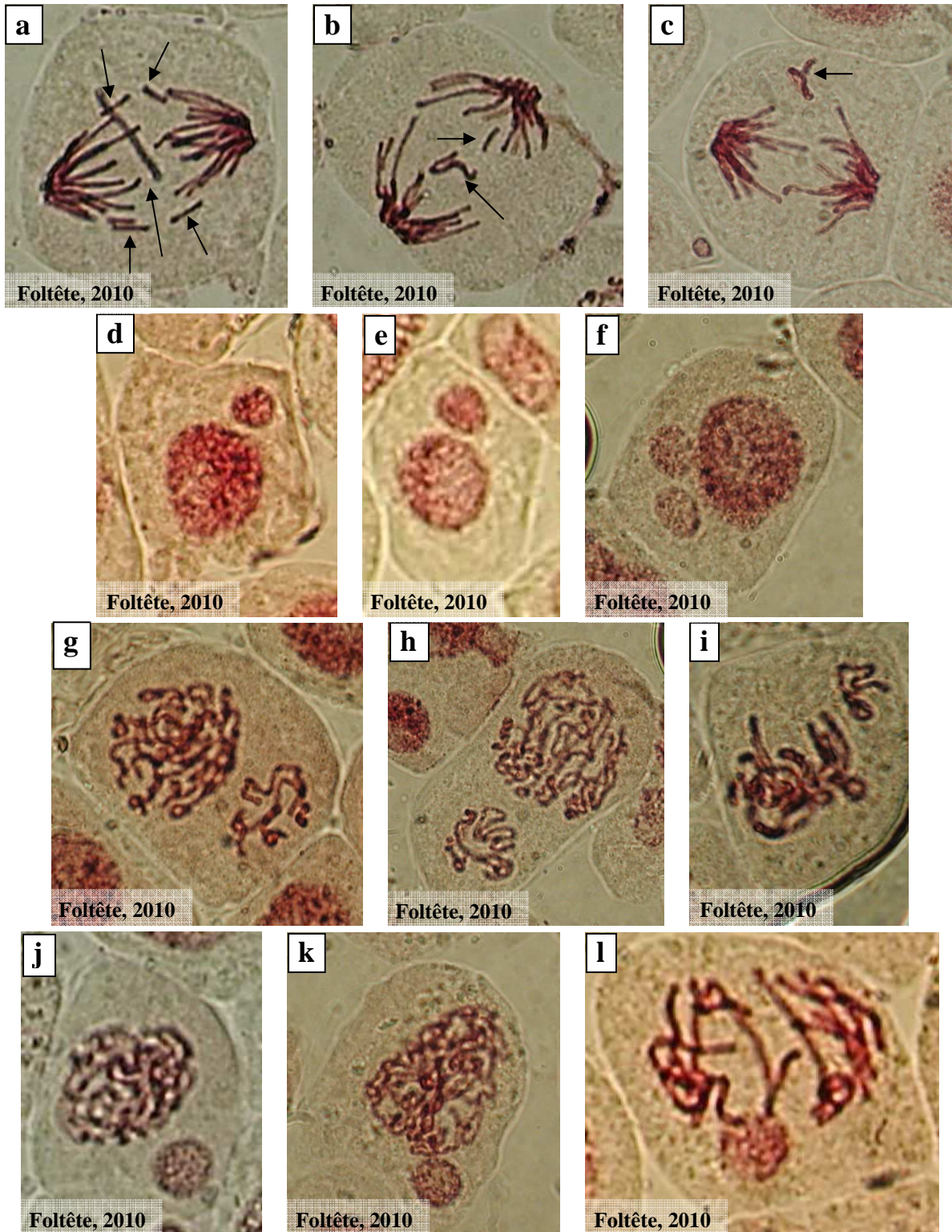


Figure 13 : Effets de l'hydrazide maléique sur les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba*, visibles au microscope optique X1000. [a], [b] : Effet clastogène : cassures des chromosomes (flèches) visible durant l'anaphase (48h d'exposition, milieu solide) . [c] : Flèche : morceaux de chromosome évacués dans le cytoplasme (10 $\mu$ M d'HM, 48h, milieu liquide). [d] (10 $\mu$ mol/kg d'HM, 48h, milieu solide), [e](10 $\mu$ mol/kg d'HM, 5j, milieu solide) : Cellule fille interphasique avec micronoyau. [f] : Cellule fille interphasique présentant deux micronoyaux (20  $\mu$ mol/kg d'HM, 5j, milieu solide). [g] (5 $\mu$ mol/kg d'HM, 48h, milieu solide), [h] (20 $\mu$ mol/kg d'HM, 5j, milieu solide) : noyau et micronoyau en fin de prophase. [i] (20 $\mu$ mol/kg d'HM, 5j, milieu solide) : noyau principal et micronoyau en métaphase. [j](48h, milieu solide), [k] (20 $\mu$ mol/kg d'HM, 5j, milieu solide), [l] (10 $\mu$ mol/kg d'HM, 5j, milieu solide) : noyau respectivement en début, milieu et fin de prophase, micronoyau en interphase.

### 1.1.2 Action du cuivre

Le cuivre provoque des ponts chromosomiques visibles à l'anaphase (Figure 14a,b) (Souguir et al. 2008). La présence de ces ponts provoque une rupture des chromosomes lors de leur séparation en fin d'anaphase. Le cuivre est donc un agent clastogène (Figure 14a). Il peut également montrer des propriétés aneugènes, c'est-à-dire se montrer capable de désorganiser le fuseau mitotique, avec à la clef l'exclusion d'un ou plusieurs chromosome(s) à la fin de l'anaphase (Figure 14c) (Souguir et al. 2008). Les micronoyaux qu'il provoque sont souvent atypiques, semblables à des bourgeonnements (Figure 14d) ou à des étirements du noyau (Figure 14e), ou restent liés au noyau principal (Figure 14f). Décrits chez *Allium cepa* exposé à d'autres toxiques (Fernandes et al. 2007; Leme et al. 2008; Leme and Marin-Morales 2009) ou à d'autres métaux (Liu et al. 1992; Liu et al. 1994), ils sont appelés « bourgeons nucléaires » ou « déformations nucléaires ». Abdel Migid et al. (2007) les décrit sur *Allium cepa* et *Vicia faba* exposés à une matrice multicontaminée, les attribuant à l'effet du cuivre. Avec ce métal, nous avons observé très peu de « vrais » micronoyaux, complètement séparés du noyau principal.

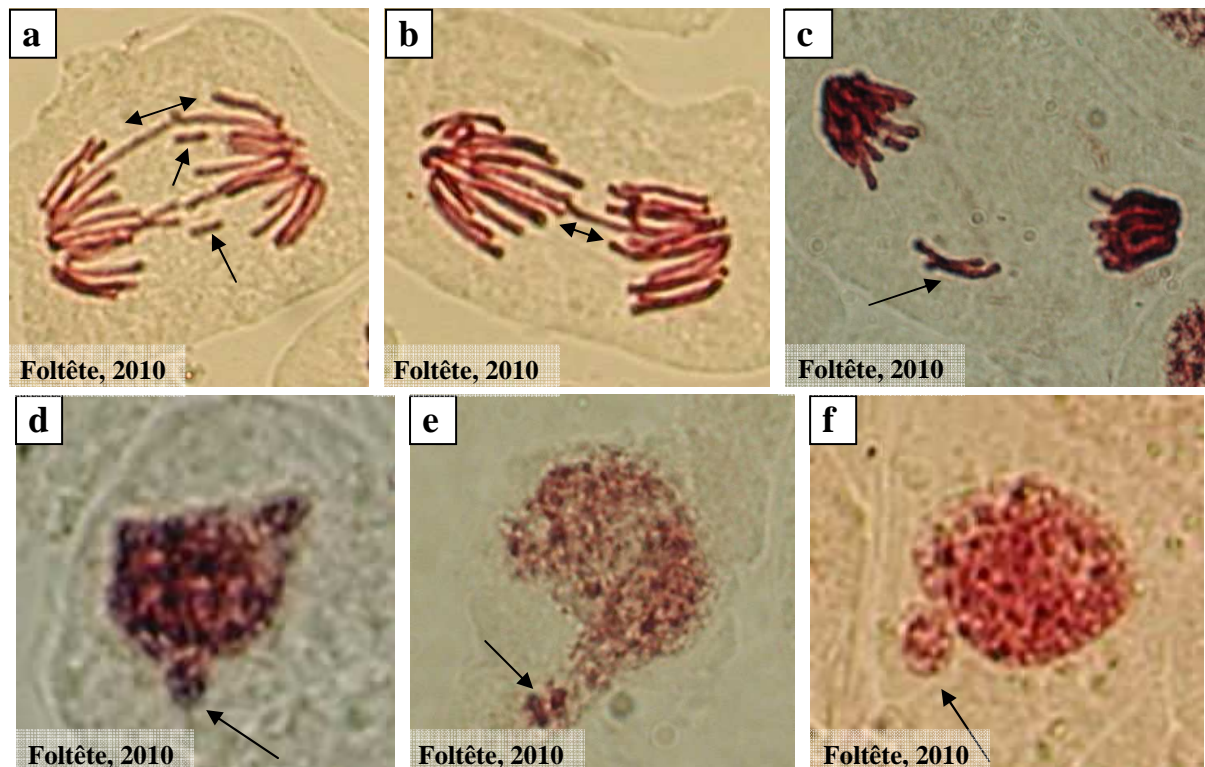


Figure 14 : Effets du sulfate de cuivre sur les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba*, visibles au microscope optique X1000. [a], [b] : Cassures chromosomiques (flèches simples) et présence de « ponts » chromosomiques (doubles flèches) à l'anaphase (2mmol/kg de  $\text{CuSO}_4$ , 48h, milieu solide). [c] : Exclusion d'un chromosome entier en fin d'anaphase (2mmol/kg de  $\text{CuSO}_4$ , 48h, milieu solide). [d] (8mmol/kg de  $\text{CuSO}_4$ , 48h, milieu solide), [e] (éluatriat d'un sédiment contenant 2g/kg de  $\text{CuSO}_4$ , 48h, milieu liquide), [f] (8mmol/kg de  $\text{CuSO}_4$ , 48h, milieu solide) : micronoyaux dits « atypiques », désignés par certains auteurs comme « bourgeons nucléaires » ou « déformations nucléaires ».

## 1.2 Micronoyaux en milieu liquide

### 1.2.1 Effets de l'hydrazide maléique

Un test micronoyaux a été réalisé dans les conditions décrites par la norme NF T90-327 en utilisant l'une des molécules de référence employées pour sa validation, l'hydrazide maléique. L'hydrazide maléique est un antigerminatif, ce qui signifie qu'il est capable d'inhiber la formation de racines et de bourgeons. En revanche, il est beaucoup moins actif sur les racines déjà formées et inhibe peu leur élongation. Aux concentrations testées, en effet, aucune diminution de l'élongation racinaire n'a été observée (Figure 15). En revanche, la Figure 16 montre une élévation très significative du nombre de micronoyaux à partir d'1  $\mu\text{M}$  d'HM. Comme observé dans les résultats publiés dans la norme, un pic a été atteint à 10  $\mu\text{M}$ , et dès 20  $\mu\text{M}$ , le nombre de micronoyaux diminue. A cette concentration, l'indice mitotique se situait aux alentours de 2%, seuil en dessous duquel la norme indique que le nombre de micronoyaux n'est plus un indicateur fiable. En effet, lorsque l'indice mitotique diminue de manière trop drastique, signe de cytotoxicité marquée, le nombre de micronoyaux est artificiellement diminué du fait de la diminution du nombre de mitoses, au cours desquelles se forment les micronoyaux.

Il est intéressant de constater que cette chute du nombre de mitoses n'a absolument pas affecté l'élongation racinaire correspondante. En effet, l'allongement des racines en cas de diminution de la division cellulaire se fait par l'allongement des cellules elles-mêmes. Il n'existe donc étrangement aucune corrélation entre l'élongation racinaire et l'indice mitotique, mais dans nos conditions expérimentales, il est difficile de comparer ces deux indicateurs car ils ne sont pas forcément mesurés sur les mêmes racines de chaque individu.

Nous devons préciser que nos témoins négatifs comportent une fréquence de micronoyaux (3‰) supérieure à celle normalement provoquée par les phénomènes de mutation spontanée (<1‰). Nous l'attribuons à un manque d'expérience de lecture lors des premiers essais, la discrimination entre micronoyaux et taches ou impuretés (e.g. cristaux d'orcéine) nécessitant un certain entraînement.

D'après le site [<http://www.pesticideinfo.org>], la LOEC de l'HM observée sur le riz *Oryza sativa* en milieu liquide au bout de 10 jours (croissance, stress oxydatif, concentration en phénols) se situe entre 1 et 2  $\mu\text{M}$  d'HM, alors que nous observons un effet génotoxique très

significatif pour 1  $\mu$ M. Notre test et/ou notre modèle biologique est donc plus sensible que ceux décrits sur le riz.

**Conclusions :**

- **Nous retrouvons les propriétés de l'HM vantées par les fabricants de produits phytosanitaires : inhibition de la formation de racines mais peu d'effet sur les racines préexistantes et diminution drastique de la division cellulaire au niveau des méristèmes (cf. Analyse Bibliographique, § 3.1.3).**
- **Nous avons vérifié que nous obtenons des résultats comparables à ceux de la norme en terme de pic de génotoxicité et de significativité : ce protocole pourra donc servir de base pour optimiser le test en phase solide en vue de sa normalisation ISO.**
- **En accord avec les résultats figurant dans la norme, nous avons trouvé une diminution du nombre de micronoyaux pour les indices mitotiques inférieurs à 2%, ce qui confirme le bien-fondé de ce critère de validité.**
- **L'élongation racinaire semble être un biomarqueur beaucoup moins sensible que le nombre de micronoyaux ou que l'indice mitotique.**

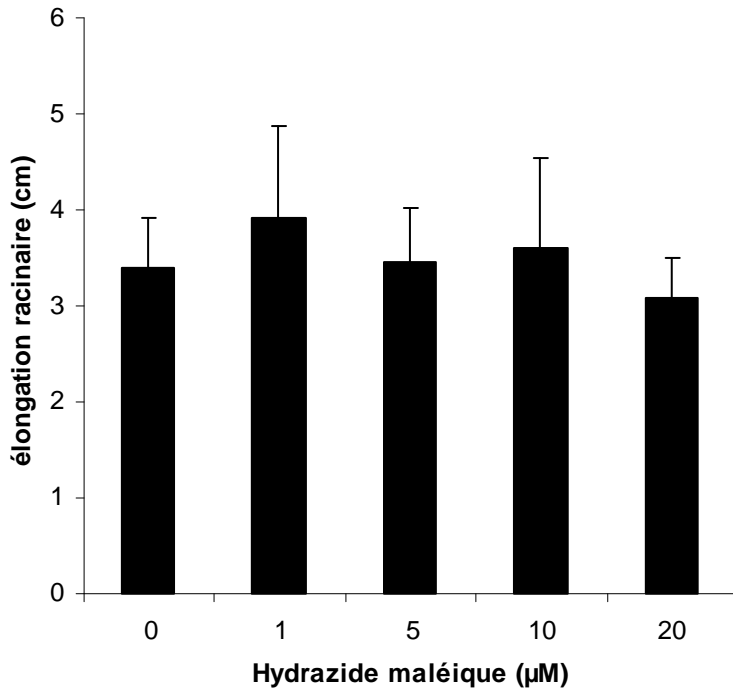


Figure 15 : Elongation racinaire mesurée sur les racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différentes concentrations d'hydrazide maléique (moyenne +/- écart-type, 3 fèves, n = 9 racines). Aucune différence statistiquement significative par rapport au témoin (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

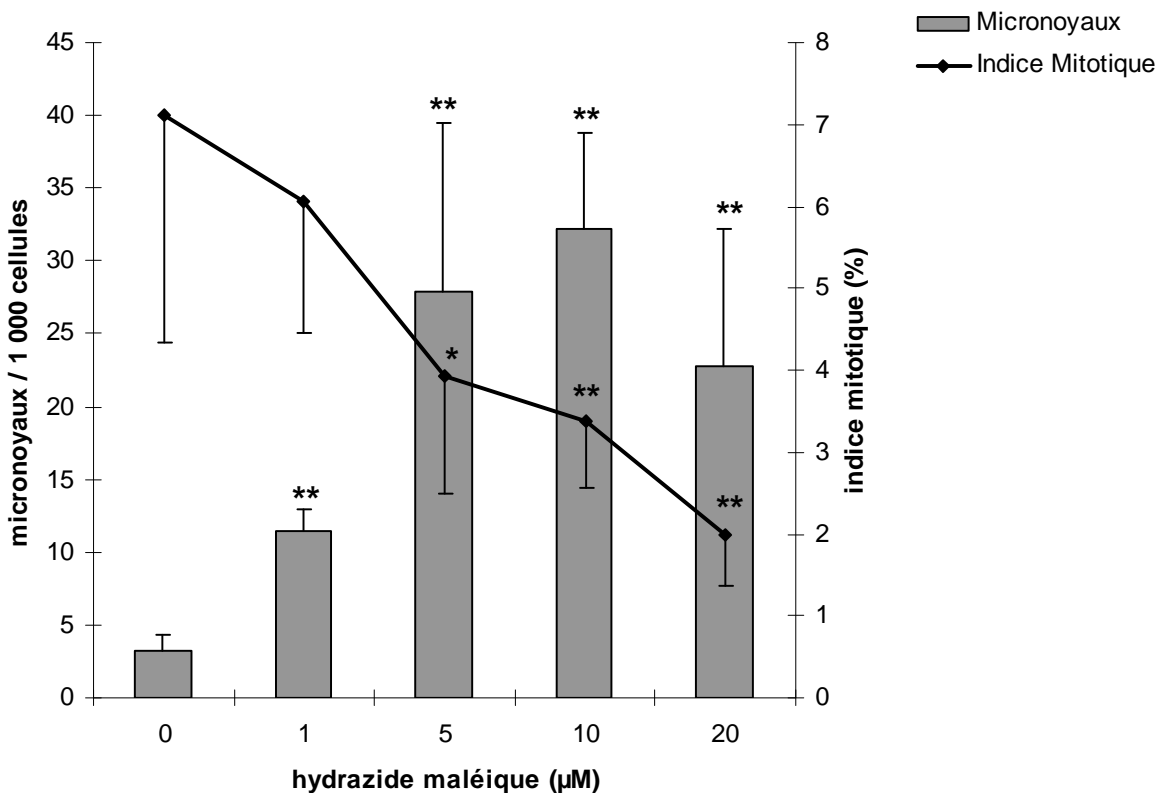


Figure 16 : Fréquence de micronoyaux pour 1 000 cellules et indice mitotique (%) retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différentes concentrations d'hydrazide maléique (moyenne +/- écart-type, 3 fèves, n = 6 racines). Kruskal-Wallis suivi du test U de Mann-Whitney : \* $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , significativité statistique par rapport au témoin.

### 1.2.2 Applications : programme GISFI

Le test micronoyaux a été appliqué aux percolats des sols de Neuves-Maisons (parcelles d'Homécourt) prélevés durant l'année 2007.

En date des 21/05/2007 et 11/09/2007, il était tombé peu de précipitations et l'eau avait été retenue par la végétation. Les seules parcelles où nous avons pu récupérer des percolats étaient donc logiquement celles comportant le moins de plantes, c'est à dire les parcelles de terre nue (TN), et celles plantées avec *Thlaspi caerulescens* (TC), car cette espèce ayant mal poussé, les parcelles concernées étaient assimilables à de la terre nue. Le 11/09/2007, nous avons également pu obtenir des percolats à partir des parcelles laissées à la végétation spontanée (VS), mais aucune autre parcelle ne nous a fourni de percolat à ces dates.

Tout d'abord, il faut signaler une observation restée sans explication : après hydrolyse, la pointe des racines ayant été exposées aux percolats montrait une étrange coloration bleu-vert, alors qu'habituellement les racines sont blanchâtres.

La fréquence des micronoyaux et l'indice mitotique pour les deux dates susmentionnées sont représentés dans la Figure 17. En date du 21/05, la fréquence des micronoyaux est significativement augmentée par rapport au témoin pour les deux types de parcelles étudiées. En revanche, le 11/09, même si on constate également une augmentation de cette fréquence, l'écart-type est trop important pour pouvoir dégager une quelconque significativité. Nous ne disposons que de la concentration en HAP totaux pour les prélèvements du 11/09. L'indice mitotique est très augmenté pour les parcelles TC à la date la plus précoce alors qu'il se trouve réduit quatre mois plus tard pour les parcelles TC et VS. Sur la Figure 18, on peut voir que les plantes exposées aux percolats montrent une élongation racinaire supérieure au témoin, constitué de milieu de Hoagland. Cette différence est significative pour toutes les parcelles le 21/05 mais elle n'est plus qu'une très légère tendance le 11/09. En effet, même si les percolats renferment un cocktail de polluants à des concentrations non négligeables, ils sont aussi plus riches en matière organique et en nutriments que le milieu de Hoagland utilisé comme témoin négatif.

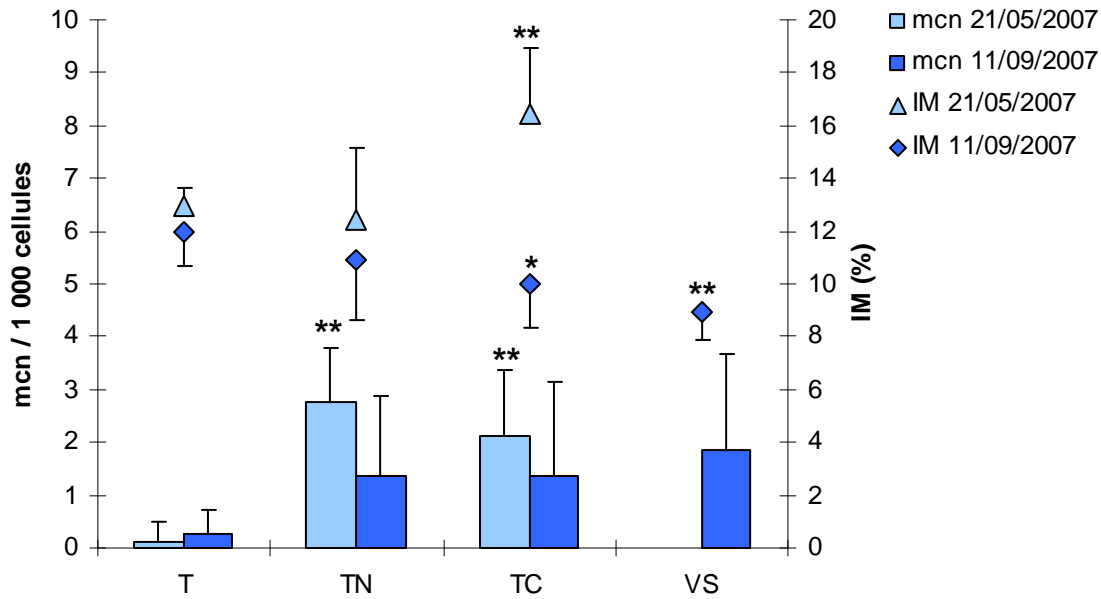


Figure 17 : Fréquence de micronoyaux pour 1 000 cellules et indice mitotique (%) retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différents percolats issus de parcelles de sol de Neuves-Maisons plantées de différentes végétations : T=témoin (milieu de Hoagland), TN=terre nue, TC=*Thlaspi caerulescens*, VS=végétation spontanée (moyenne +/- écart-type, 4 fèves, n = 8 racines). Kruskal-Wallis suivi du test U de Mann-Whitney : \* p<0,05 ; \*\*p<0,01, significativité par rapport au témoin.

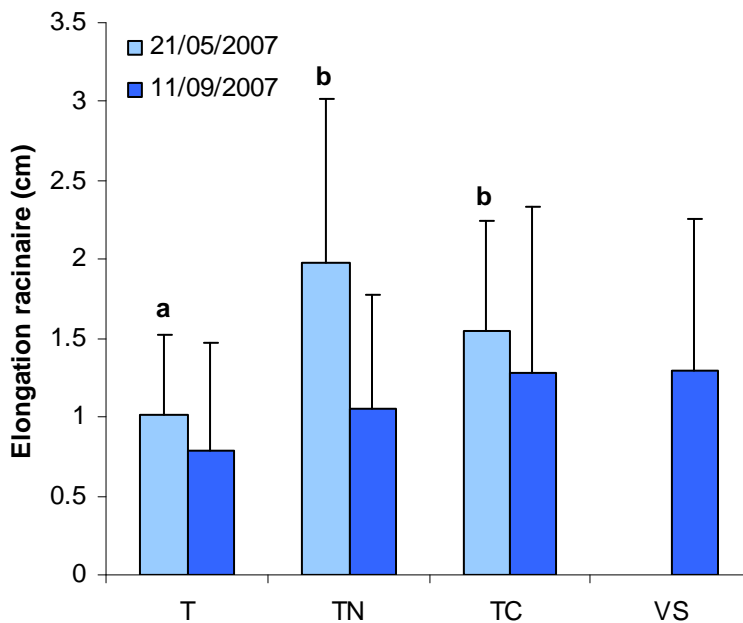


Figure 18 : Elongation des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différents percolats issus de parcelles de sol de Neuves-Maisons plantées de différentes végétations : T=témoin (milieu de Hoagland), TN=terre nue, TC=*Thlaspi caerulescens*, VS=végétation spontanée (moyenne +/- écart-type). 21/05 : 8 fèves, 24 racines, transformation en log ; 11/09 : 4 fèves, 12 racines. a, b : significatifs entre eux, ANOVA suivie du test HSD de Tukey, p<0.05.

D'après les analyses du sol des parcelles (voir annexe 1), on peut déduire que les percolats sont peu riches en métaux, car les concentrations en métaux dans les sols restent relativement stables entre avril 2007 et avril 2008. Par contre, les concentrations des percolats en HAP totaux ont tendance à augmenter avec le temps. Les nutriments et oligo-éléments, surtout le Ca, K et Mg, augmentent beaucoup dans les sols à partir du 7/04/2008, ce qui fait que vraisemblablement les percolats deviennent également plus nutritifs. En effet, les percolats du 6/12/07 et du 7/04/08, sur lesquels nous avons uniquement réalisé des tests de croissance racinaire (non montré), induisent une élongation racinaire très augmentée par rapport aux deux premières dates. Seuls les percolats issus des sols TD montrent une croissance racinaire diminuée.

Cette étude est complétée par celle conduite sur les sols par exposition directe exposée ci-dessous. Les conclusions seront communes.

### **1.3 Micronoyaux en milieu solide**

#### **1.3.1 Sol de Neuves-Maisons (Parcelles d'Homécourt)**

Les premières applications du test des micronoyaux en milieu solide ont été pratiquées sur les prélèvements du sol des parcelles d'Homécourt effectués durant l'année 2007. En avril 2008, seule l'élongation racinaire a été mesurée mais le décompte des micronoyaux n'a pas été réalisé.

Pour les prélèvements de 2007, une inhibition de la longueur maximale des racines est observée sur la Figure 19 pour presque toutes les parcelles. Par contre, le 7/04/2008, la croissance racinaire se trouve être équivalente voire légèrement supérieure au témoin pour toutes les parcelles, sauf celle ayant subi un traitement de thermodésorption (TD), mais cette dernière constitue un cas particulier dont nous reparlerons. A la vue de cette cinétique, il est clair que la qualité du sol vis-à-vis des plantes tend à s'améliorer avec le temps dans toutes les parcelles. La Figure 20 montre qu'aucune induction significative de micronoyaux n'a eu lieu dans les parcelles testées. Par contre, l'indice mitotique est significativement voire très significativement diminué en date du 11/09 pour toutes les parcelles, alors qu'il n'est diminué que pour les parcelles TN en date du 23/04 si l'on exclut les parcelles TD. La cytotoxicité des sols a donc augmenté entre ces deux dates.



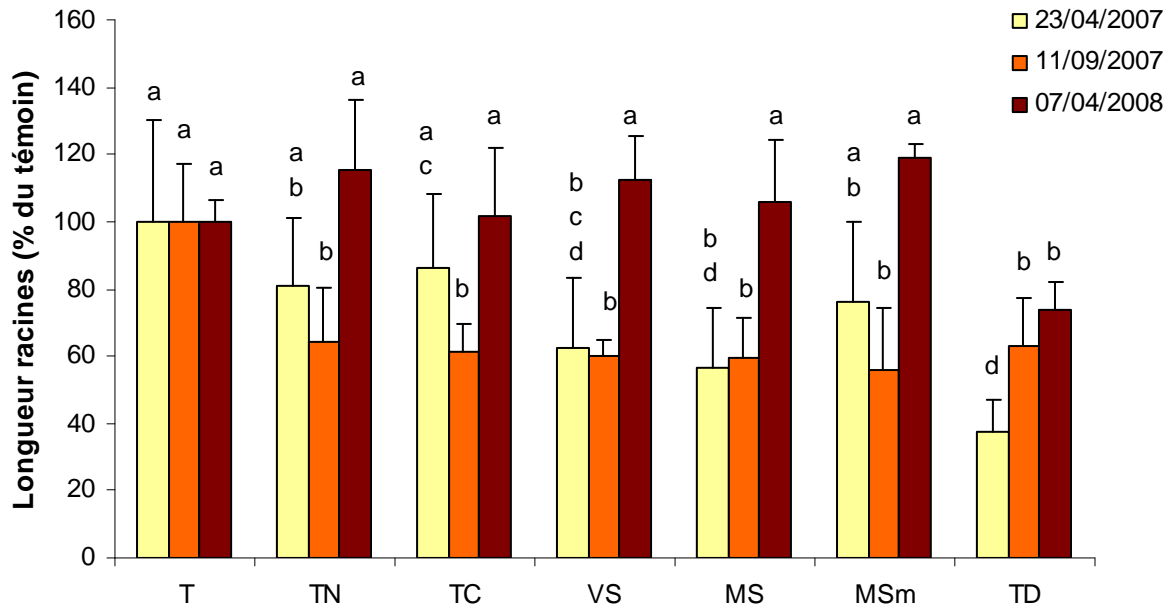


Figure 19 : Longueur maximale des racines secondaires de *Vicia faba* après 5 jours de contamination dans des sols issus de parcelles de sol de Neuves-Maisons plantées de différentes végétations : T=témoin (sol LUFA 2.2), TN=terre nue, TC=*Thlaspi caerulescens*, VS=végétation spontanée, MS=*Medicago sativa*, MSm=*Medicago sativa* mycorhizée, TD=traitement de thermodésorption (moyenne +/- écart-type). 4 fèves, 12 racines. a, b : significatifs entre eux, ANOVA suivie du test HSD de Tukey,  $p < 0.05$ . 07/04 : changement de variable,  $1/x^3$

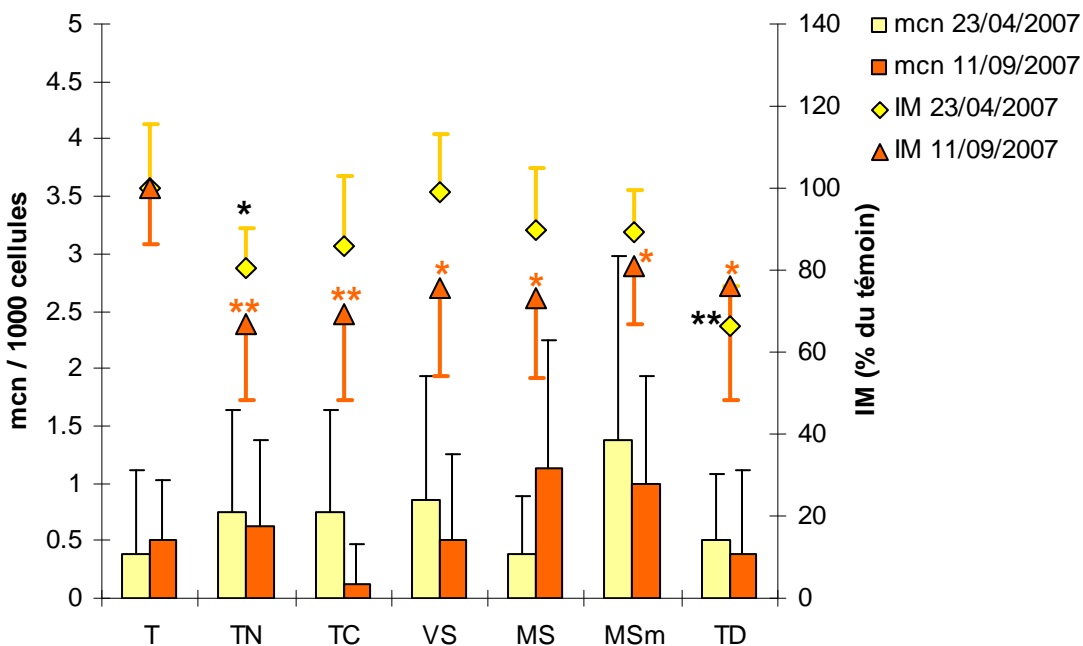


Figure 20 : Fréquence de micronoyaux pour 1000 cellules et indice mitotique (%) retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba* après 5 jours de contamination dans des sols issus de parcelles de sol de Neuves-Maisons plantées de différentes végétations : T=témoin (sol LUFA 2.2), TN=terre nue, TC=*Thlaspi caerulescens*, VS=végétation spontanée, MS=*Medicago sativa*, MSm=*Medicago sativa* mycorhizée, TD=traitement de thermodésorption (moyenne +/- écart-type, 4 fèves, n = 8 racines). Kruskal-Wallis suivi du test U de Mann-Whitney : \*  $p < 0,05$  ; \*\* $p < 0,01$ , significativité par rapport au témoin.

Les analyses physico-chimiques des sols (annexe 1) montrent que les propriétés des différentes parcelles sont assez proches, sauf pour le sol TD. Ce dernier a un contenu relativement faible en HAP, Ca, Mg, Fe, Mn. Le pH est plus élevé, et la concentration en métaux lourds (Zn, Pb) est souvent supérieure à celle des autres parcelles sauf pour le mercure qui, de par son caractère volatil, a sans doute été éliminé en grande partie par le traitement de thermodésorption. Par contre, les concentrations en carbone organique et en matière organique sont équivalentes aux autres parcelles. L'élongation racinaire pour les parcelles TD est toujours inférieure au témoin et également le plus souvent à celle retrouvée pour les autres parcelles, que ce soit en milieu liquide ou solide. L'indice mitotique est également toujours diminué, ce qui n'est pas forcément évident car indice mitotique et élongation racinaire ne sont que très rarement corrélés. La thermodésorption n'est donc pas le traitement idéal ; il peut même augmenter la toxicité des polluants restants (surtout métaux) vis-à-vis des organismes du sol en les rendant plus biodisponibles (Bonnard et al. 2010). Après un processus de bioremédiation qui avait permis d'éliminer plus de 98% des HAP, Song et al. (2006) voient la fréquence de micronoyaux chez *Vicia faba* passer de 3 à plus de 75 pour 1000 cellules, et en attribuent la raison à des produits de dégradation de ces HAP.

L'évolution de la composition des sols dans les parcelles sur nos trois dates peut expliquer les différences d'élongation racinaire retrouvées dans la Figure 19. Cette composition a peu varié entre le 23/04 et le 11/09/2007 ; seuls les HAP les plus légers ont connu une diminution de leur concentration. L'élongation racinaire reste en effet comparable entre les deux dates, mais l'indice mitotique est diminué par rapport au témoin dans toutes les parcelles pour le 11/09 (Figure 20), ainsi que pour les parcelles TC et VS dans les percolats de la même date (Figure 17). Ceci pourrait être dû à l'augmentation de l'activité bactérienne durant les mois d'été, qui a pu effectuer une biotransformation des HAP, les rendant ainsi plus mobiles. Au mois d'avril de l'année d'après (7/04/2008), le sol a été enrichi en Ca, Mg, K et Mn, ce qui explique que l'élongation racinaire soit bien supérieure à celle de 2007 (Figure 19) tandis que la concentration en HAP a encore diminué.

## Conclusions

- **Aucun des 16 HAP n'a eu d'effet sur la croissance, l'indice mitotique ou l'induction de micronoyaux dans les racines de *Vicia faba*.**
- **En date du 11/09, la diminution de l'indice mitotique peut être le signe de la présence d'un composé non dosé, vraisemblablement issu de la décomposition des HAP.**
- **L'impact positif des substances nutritives contenues dans les sols ou les percolats contrebalance largement l'inhibition de croissance qui pourrait être causée par la présence de substances toxiques.**
- **Le sol met beaucoup plus de temps à retrouver sa fertilité lorsqu'il a subi un traitement de thermodésorption que lorsqu'il est laissé à son cycle naturel.**

### 1.3.2 Optimisation du protocole en milieu solide : Elaboration de la norme

#### 1.3.2.1 Effet de la lumière durant la phase de pré-germination

Avant exposition, une étape de pré-germination en phase liquide (milieu de Hoagland, annexe 2) est nécessaire pour initier la croissance des racines secondaires. Afin de savoir s'il est possible que des racines secondaires ayant poussé sous lumière puissent avoir été stressées (Ojima et al. 2009) et avoir de ce fait développé des défenses susceptibles de diminuer leur sensibilité aux toxiques, nous avons comparé la sensibilité de plantules poussées sous lumière avec celle d'autres plantules dont les racines se sont développées à l'obscurité.

La Figure 21 montre que l'hydrazide maléique provoque la même fréquence de micronoyaux pour les deux groupes de plantules. Tous deux montrent une augmentation très significative du nombre de micronoyaux dès 1  $\mu\text{M}$  d'HM et une nette diminution de l'indice mitotique à partir de 10  $\mu\text{M}$ . La seule différence significative que l'on peut observer entre les deux groupes concerne la concentration de 1  $\mu\text{M}$  d'HM, où les plantules dont les racines ont été exposées à la lumière se révèlent les plus sensibles.

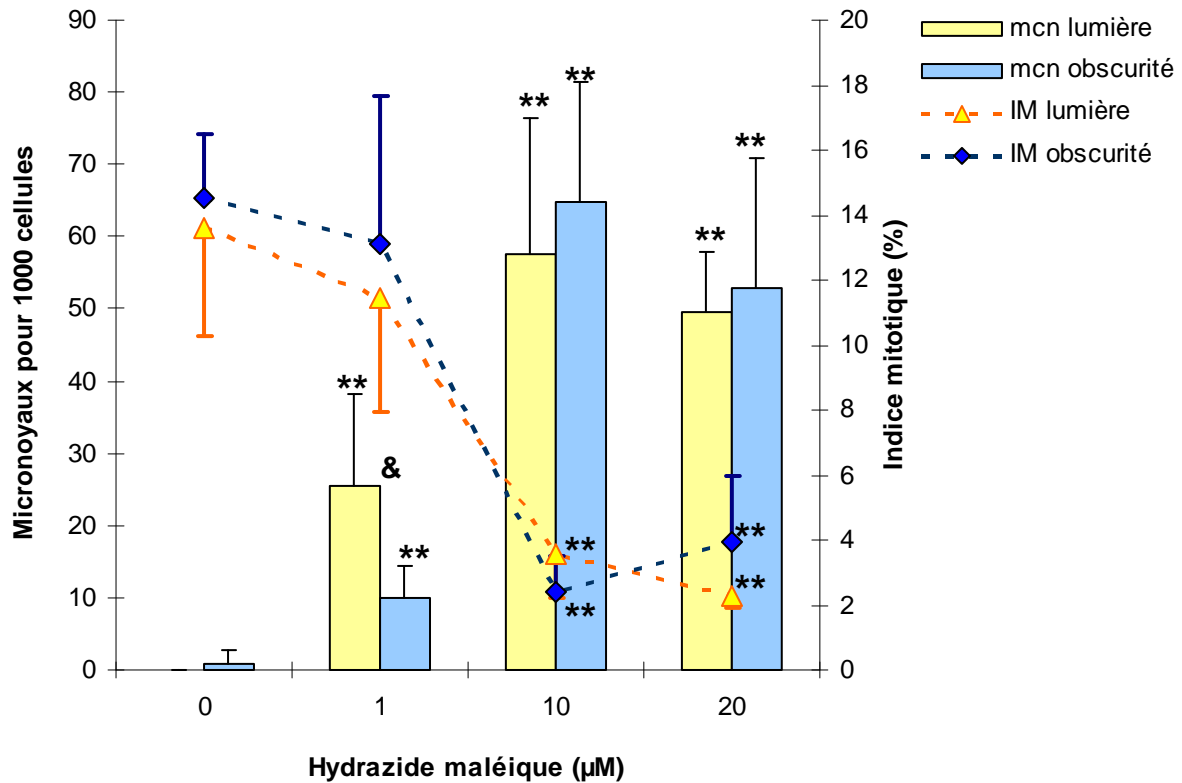


Figure 21 : Fréquence de micronoyaux pour 1 000 cellules et indice mitotique (%) retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différentes concentrations d'hydrazide maléique (moyenne +/- écart-type, 3 fèves, n = 6 racines). Kruskal-Wallis suivi du test U de Mann-Whitney : \* p<0,05 ; \*\*p<0,01, significativité par rapport au témoin. & : Significatif entre les modalités « lumière » et « obscurité » pour une concentration donnée, test U de Mann-Whitney, p<0,05.

**Conclusions :**

- En ce qui concerne l'hydrazide maléique, le fait que les plantes aient été ou non exposées à la lumière durant leur pousse ne semble pas influencer sur la significativité statistique des résultats par rapport au témoin.
- Pour la normalisation, nous conseillerons malgré tout de conserver les racines à l'obscurité dans la mesure du possible, d'autant plus que nous avons remarqué une meilleure pousse des racines secondaires dans ces conditions.

### ***1.3.2.2 Temps d'exposition et origine des graines***

Après avoir testé le protocole « 5 jours » sur les parcelles de sol de Neuves-Maisons, nous avons décidé de tenter d'améliorer sa sensibilité et sa praticité. Nous avons donc voulu le comparer avec le protocole « 48h ». La sensibilité des deux méthodes vis-à-vis de deux toxiques de référence, l'HM et CuSO<sub>4</sub>, est comparée dans la publication suivante, ainsi que le type d'agriculture dont sont issues les graines de fèves employées pour les tests (« biologique » ou « conventionnelle »). En effet, la sensibilité des plantes peut différer selon leur provenance (Duan et al. 2000).

## **Improvement of *Vicia*-micronucleus test for assessment of soil quality: a proposal for international standardization**

Manuscrit soumis à *Environmental and Molecular Mutagenesis*

Anne-Sophie Foltête, Adrien Dhyèvre, Jean-François Férard, Sylvie Cotelle

Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (**LIEBE**), Université Paul Verlaine-Metz, CNRS UMR 7146, Campus Bridoux, Avenue du Général Delestraint, 57070 Metz, FRANCE

### **Abstract**

The *Vicia faba* root tip micronucleus test is one of the most employed plant genotoxicity assays, and has been used on various types of contaminated materials. This test has been standardized by AFNOR, the French member organization of ISO. However, this test is usually performed with a water extraction step but soil genotoxicity assessment would be more relevant when performed directly in the soil itself. In order to harmonize these protocols, an ISO standard for the *V. faba* micronucleus test in both liquid phase (exposure of plants to different liquid matrix, including soil water extracts) and solid phase (direct exposure of plants to the soil) would be very useful. In this context, we compared two exposure durations (48h and 5 days) for the *V. faba* micronucleus test with two different well-known genotoxicants, maleic hydrazide and copper sulphate. We concluded that these two durations induced equivalent sensitivity: the micronucleus frequency was significantly increased with 5  $\mu\text{mol}$  maleic hydrazide per kg dry soil and with 2 mmol copper sulphate per kg dry soil with both exposure durations. However, exposing roots to soil to be tested during 48h is more practical. Moreover, organically and conventionally cultured seeds were employed to determine whether the seed provenance influenced the test sensitivity. Organic seeds were less sensitive to copper, possibly because copper-based treatments are permitted, and often applied, in this type of agriculture. Therefore, in the absence of completely non-treated seeds, the use of conventional commercial seeds is more suitable and gives reliable results.

Keywords: genotoxicity, organic culture, *Vicia faba*, solid phase exposure, copper, maleic hydrazide

## Introduction

The *Vicia faba* micronucleus test is a well-known and widely used genotoxicity test. It has been employed in a wide range of applications including water testing (Degrassi and Rizzoni 1982; Duan et al. 1999; Miao et al. 1999; Monarca et al. 2003; Zhong et al. 2001), evaluation of leachate or other water extracts (Cotelle et al. 1999; Radetski et al. 2004; Sang and Li 2004; Wang 1999), chemical toxicity studies in artificially prepared solutions (Cordova Rosa et al. 2003; Yi and Meng 2003) and even demonstrating the deleterious action of radioactivity on DNA (Minouflet et al. 2005). The *Allium/Vicia* micronucleus assay was standardized under the IPPB/UNEP program through a collaborative study of international laboratories (Ma et al., 1995) but surprisingly, no ISO standard describes the *V. faba* micronucleus test in spite of its widespread use for environmental monitoring. There is only a French standard which describes this test, but this is specifically for the liquid phase (AFNOR NF T90-327, 2004), and even for soil quality assessment, the *V. faba* micronucleus test is currently conducted in the liquid phase, with leachates or water extracts. However, higher plant toxicity tests are of greater ecological relevance in soil quality assessment when performed in the solid phase. Due to the lack of an ISO standard, the few authors who perform the micronucleus test on the solid phase apply a variety of protocols and hence their results are not comparable.

With a view to ISO standardization of the *Vicia faba* micronucleus test for application to both solid and liquid phases, we tested two different well-known genotoxicants: a heavy metal, copper (Steinkellner et al. 1998) and a commercial antigerminative and herbicidal molecule, maleic hydrazide (Marcano et al. 2004) using two different protocols of solid phase exposure. Also, since the seed origin (in terms of the agricultural practice applied) can modify the sensitivity of the laboratory model (Duan et al. 2000), we tested seeds from conventional and organic cultures.

## Material and methods

Two different parameters were tested: the exposure duration and the seed origin. All of the experiments were performed on the basis of the micronucleus test described by Ma et al. (1995) modified by Cotelle et al. (1999).

### 1. Soil spiking

The standard soil LUFA 2.2 (Speyer, Germany; see characteristics in table III) was used for the exposure experiments. Maleic hydrazide (MH) and copper sulfate (pentahydrated) were diluted in deionised water and appropriate volumes were mixed into the standard soil sample to obtain the following concentrations: 5, 20 and 80  $\mu\text{mol}$  MH/kg dry soil and 2, 8 and 30 mmol Cu/kg dry soil. Deionised water was added until 85% of the water holding capacity was reached.

**Table III: Basic characteristics of the LUFA 2.2 soil.**

<b>Physico-chemical characteristics</b>	
<b>Organic Carbon (%)</b>	2.16 +/- 0.40
<b>pH (0.01M CaCl<sub>2</sub>)</b>	5.4 +/- 0.1
<b>Cation Exchange Capacity (meq/100g)</b>	10 +/- 1
<b>Particle Sizes According to USDA (%)</b>	
<b>Clay (&lt; 0.002 mm)</b>	6.4 +/- 0.9
<b>Silt (0.002 - 0.05 mm)</b>	12.2 +/- 0.6
<b>Sand (0.05 – 2.0 mm)</b>	81.4 +/- 1.2



## ***2. Plant culture***

Organic and conventional *Vicia faba* (broad bean) seeds (Aguadulce variety, Fabre, France) were stored at 4°C under dry conditions until use. Seeds were soaked overnight in distilled water and then allowed to germinate between two moistened, vertically positioned pieces of cotton for three days at room temperature. The primary-rooted seedlings obtained were used for the tests.

Every test described below took place in a phytotron at 23°C under a light specifically designed for plant growth (125 W, Envirolite<sup>®</sup>, 6400°K, 16:8h light:dark photoperiod).

## ***3. Exposure duration***

### **3.1. 48-h protocol**

After removing the primary root tips (approx. 5 mm) of the seeds to promote secondary root growth, the seedlings were transferred to aerated Hoagland solution and left for 4 days with daily renewal of the solution. After this period, secondary roots had appeared and 3 young plants were placed in 200 g of test soil for 48 h. Deionised water was added every day to maintain the soil moisture content at 85% of the water holding capacity.

Three secondary roots were measured at the beginning and at the end of the exposure and the difference gave the root elongation measurement.

### **3.2. 5-day protocol**

After removing the primary root tips to promote the development of secondary roots, four of the primary-root seedlings were directly placed in 200 g samples of the test soils for 5 days. Deionized water was added every day to maintain the soil moisture content at 85% of the water holding capacity.

At the end of the experiment, only the three largest plantlets were retained for the tests. The 3 longest secondary roots of each plantlet were measured to assess the root growth.

## ***4. Seed origin***

To assess whether the seed origin can affect the response of the plants, broad beans from organic and conventional cultures (Aguadulce variety, Fabre, France) were tested under the conditions of the 48h protocol with copper and maleic hydrazide.

### ***5. Micronucleus test***

At the end of the exposure period, the roots were carefully extracted from the soil. They were then cleaned with deionised water and the last two cm of the secondary roots (around ten roots per seed, randomly chosen) were sampled and fixed overnight at 4°C in Carnoy solution (25 % acetic acid : 75 % ethanol, v:v). These root tips were stored on a long-term basis in 70 % ethanol at 4°C for future observations.

After fixing, the secondary root tips were rinsed for 10 min in deionised water and hydrolyzed in 1N HCl at 60°C for 6 min. It is important to remove the root cap and the first mm corresponding to the meristematic region and to retain only the second mm which is made up of the daughter cells (Ma et al. 1995). The staining of the DNA was carried out by crushing the root tips after addition of a drop of 1% aceto-orcein. Micronuclei and cells in division were scored from 1,000 cells per root tip under a 400 X magnification. Two slides were prepared for each of the three replicates. A total of 6,000 cells in interphase from six separate slides per experimental group were observed under blindfold conditions. The percentage of mitotic cells, called the mitotic index (MI), was calculated at the same time. Only the roots with an MI greater than 2% were taken into account for scoring micronuclei in cells (AFNOR, 2004).

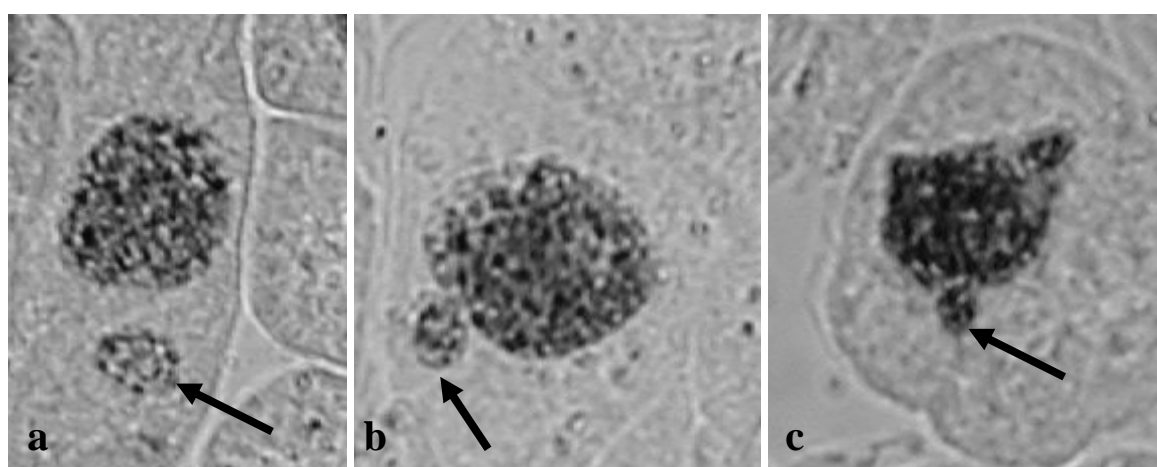
### ***6. Statistical analysis***

Data were analyzed using StatSoft Statistica 7.0. Since some of our data presented a non-normal distribution and/or were not homoscedastic, we used Kruskal-Wallis multiple comparison test followed by the Mann-Whitney U test ( $p < 0.05$ ).

## Results

### 1. Aspect of the micronuclei

Fig. 22a shows that the micronuclei induced by MH were well separated from the main nucleus. In contrast, in the presence of copper, as in the case of other heavy metals, the majority of micronuclei had irregular shapes, with bud-shaped excrescences on the main nucleus (Figs. 22b & 22c). These irregularly-shaped micronuclei were never observed in the negative controls.



**Figure 22:** Aspect of micronuclei (arrows) obtained in secondary root meristematic daughter cells of *Vicia faba* after 5 days exposure to: (a) 20  $\mu\text{mol}$  MH / kg dry soil; (b) 8 mmol  $\text{CuSO}_4$  / kg dry soil; (c) 8 mmol  $\text{CuSO}_4$  / kg dry soil, irregularly shaped micronucleus. Optical microscope, X 400 magnification.

### 2. Comparison between 48-h and 5-day protocols

In the presence of MH, 48-h elongation of pre-existent secondary roots was not significantly inhibited (Fig. 23a), while root length was significantly reduced in a concentration-dependent manner in the 5-day protocol (Fig. 23b). The number of roots observed after 5 days was not significantly modified by MH, except for the highest concentration (80  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ) which completely prevented the sprouting of any secondary roots (Fig. 23b). In contrast, copper caused a significant growth inhibition at the two highest concentrations whatever the protocol employed (Fig. 24). For the 5-day protocol (Fig. 24b), the Kruskal-Wallis test did not indicate any significant difference in the number of roots, however, this number was considerably reduced for 30 mmol/kg Cu.

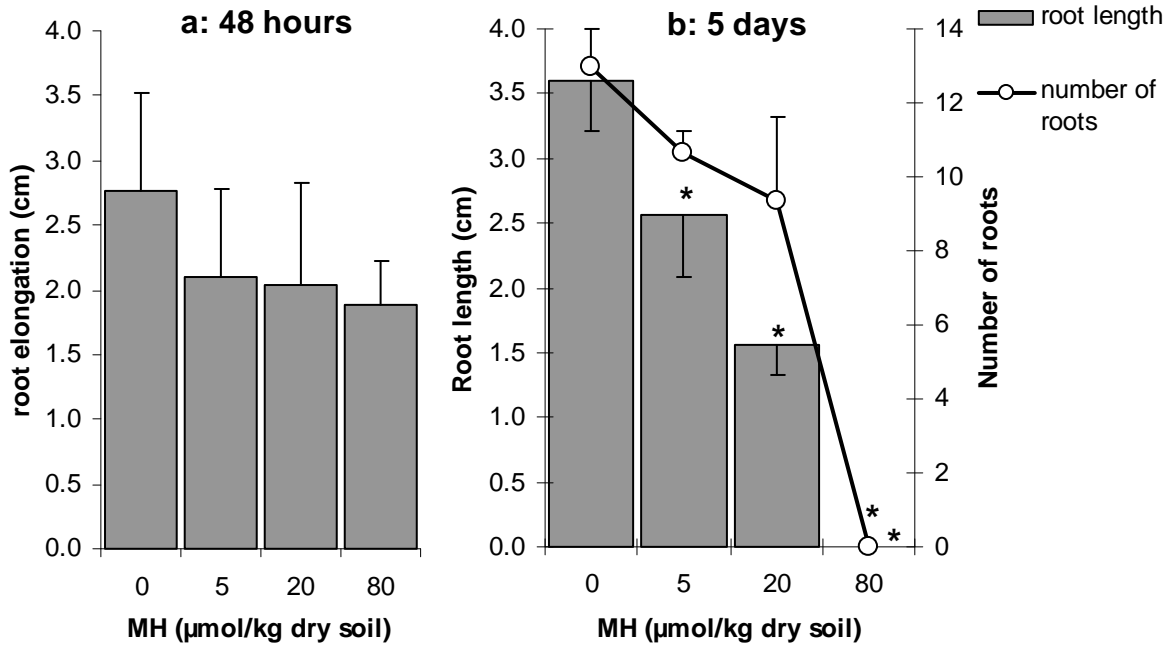


Figure 23: Root elongation (48-h protocol) and maximal root length (5-day protocol) of secondary roots of *Vicia faba* after 48 h (a) or 5 days (b) of exposure to maleic hydrazide (mean  $\pm$  SD). N = 3 roots x 3 individuals. The curve is the number (mean and SD) of secondary roots which appeared on the primary root (N = 3). \* statistically significant difference from corresponding controls (Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ).

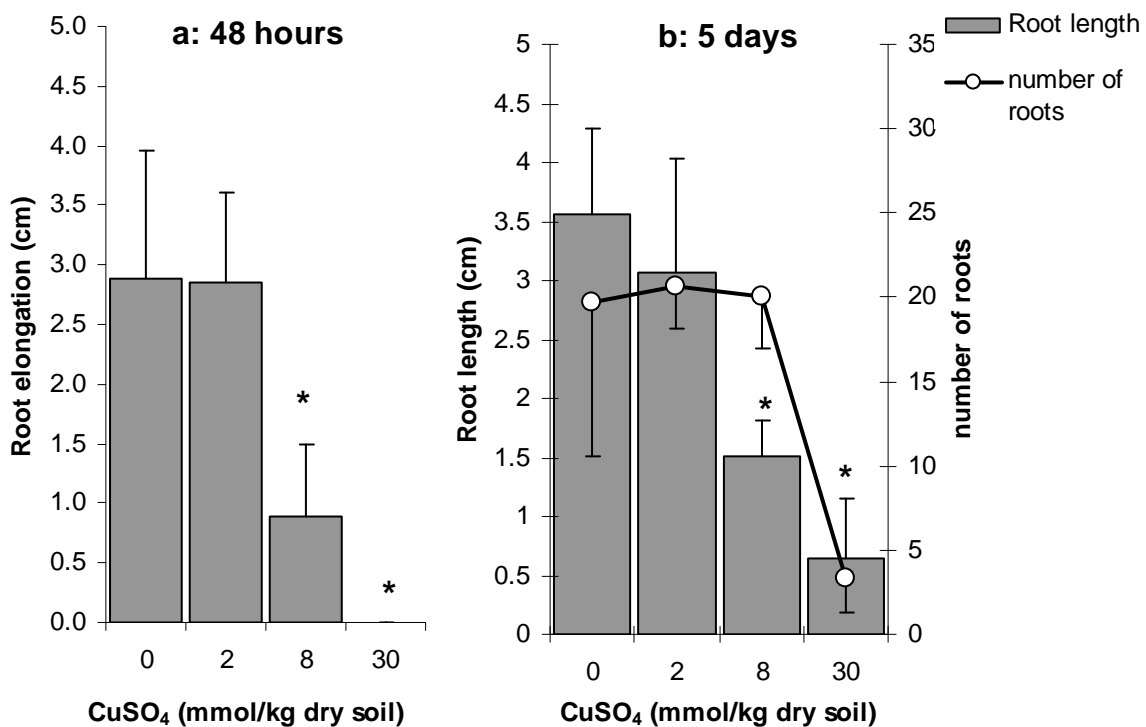


Figure 24: Root elongation (48-h protocol) and maximal root length (5-day protocol) of secondary roots of *Vicia faba* after 48 h (a) or 5 days (b) of exposure to copper sulphate (mean  $\pm$  SD). N = 3 roots x 3 individuals. The curve is the number (mean and SD) of secondary roots which appeared on the primary root (N = 3). \* statistically significant difference from corresponding control (Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ).

Micronuclei were significantly induced for 5 and 20  $\mu\text{mol/kg}$  MH for both exposure durations (Fig. 25a). Nevertheless, for 5  $\mu\text{mol/kg}$  the number of micronuclei observed after 48 h of exposure was nearly twice that after 5 days.

After copper exposure, the number of micronuclei was significantly increased at 2 and 8  $\text{mmol/kg}$  for both protocols. Using a concentration of 8  $\text{mmol/kg}$ , after 5 days this number was around half that obtained after 48 h of exposure (Fig. 25b).

For both toxicants, the highest concentration (i.e. 80  $\mu\text{mol/kg}$  for MH and 30  $\text{mmol/kg}$  for copper) induced considerable cytotoxicity (MI < 2%) and the micronucleus frequency was consequently reduced but these data are therefore not shown in the figure.

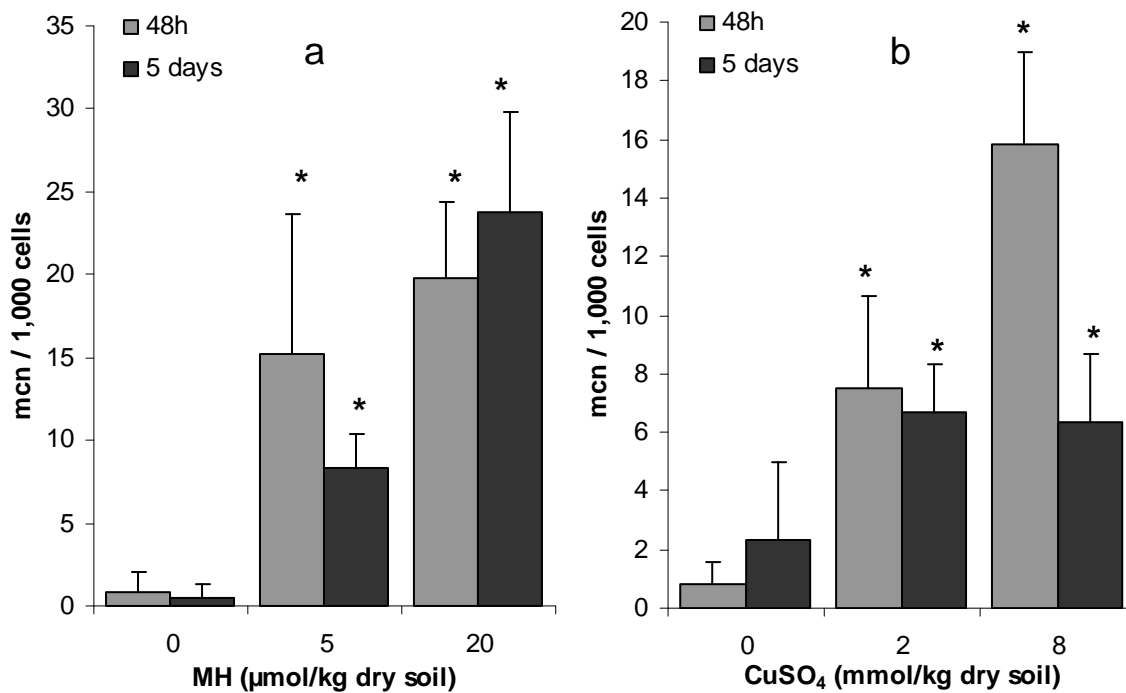
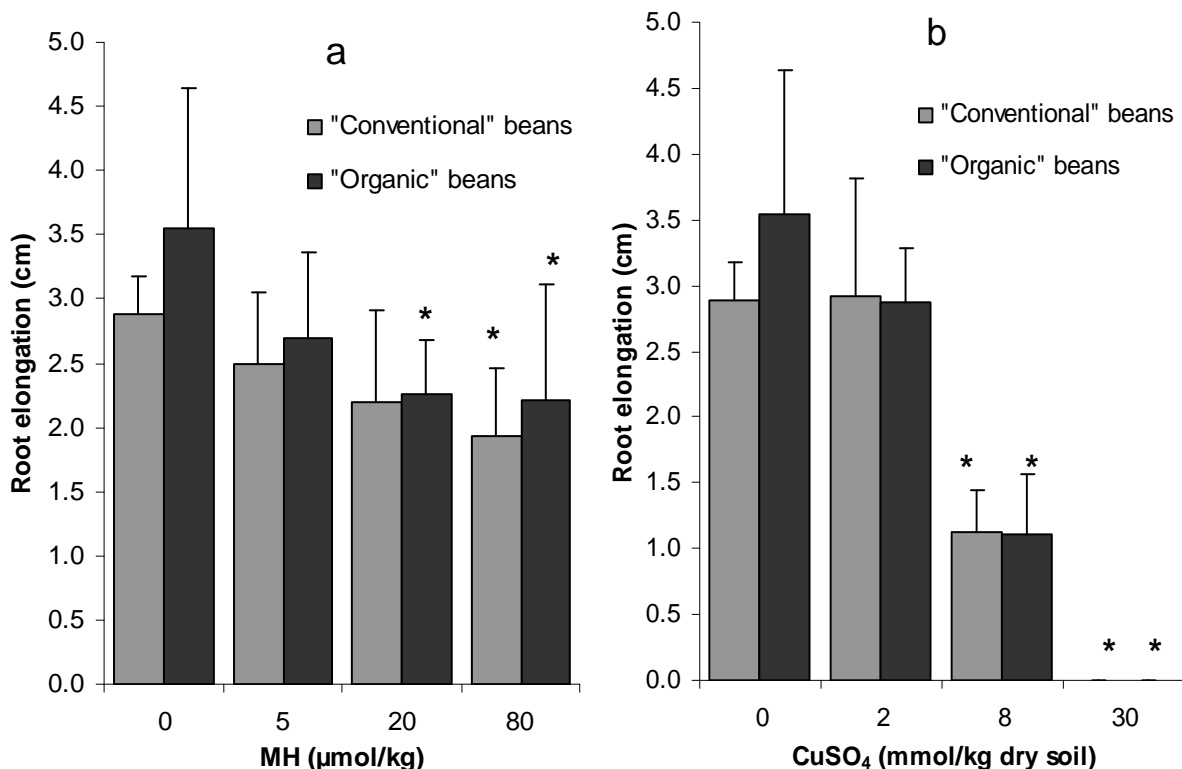


Figure 25: Micronuclei (mcn) in the secondary roots of *Vicia faba* after 48 h or 5 days of exposure to maleic hydrazide (a) or copper sulphate (b) (mean  $\pm$  SD), N = 2 slides x 3 individuals. \* statistically significant difference from corresponding controls (Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ).

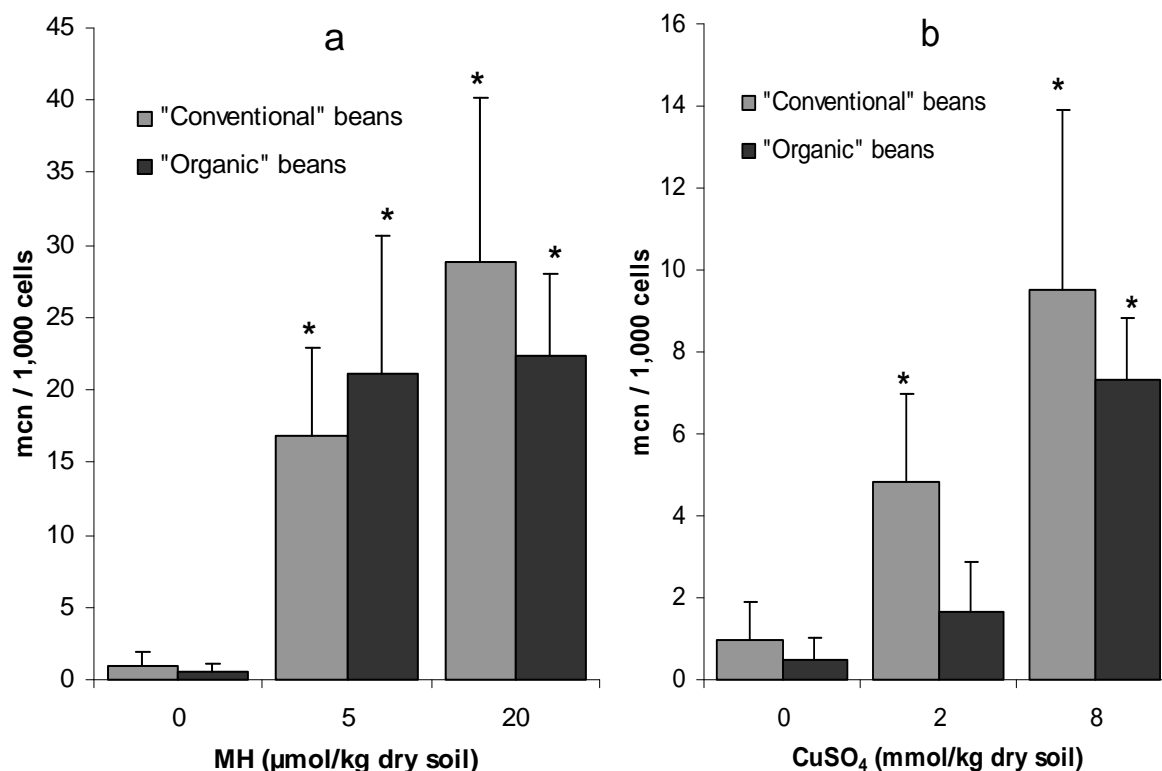
### 3. Comparison of sensitivity of plants from organic and conventional culture

In the controls, the organic beans seemed to grow slightly faster than the conventional ones (Fig. 26). After exposure (48 h) to MH, the organic beans showed an increased sensitivity since their root growth was significantly inhibited starting at concentrations of 20  $\mu\text{mol/kg}$  MH while the conventional bean growth was significantly reduced at 80  $\mu\text{mol/kg}$  (Fig. 26a). The observed difference in the statistics is due to the fact that the control group of organic beans grew faster than that of the conventional beans. Nevertheless, the copper exposure did not reveal any difference in the sensitivity of the two different bean types (Fig. 26b).

The micronucleus frequency after exposure to MH did not differ for the two bean types (Fig. 27a). In contrast, differences were observed for the genotoxicity of copper for the two different types of beans (organic and conventional). In conventional beans, micronuclei were significantly increased for 2 and 8  $\text{mmol/kg}$  Cu, while the organic beans showed a significant genotoxicity only for the highest Cu concentration (Fig. 27b). Thus, for this parameter, the organic beans showed lower sensitivity than the conventional beans.



**Figure 26: Root elongation of secondary roots in *Vicia faba* after 48 h of exposure to maleic hydrazide (a) or copper sulphate (b) (mean  $\pm$  SD). N = 3 roots x 3 individuals. \* statistically significant difference from corresponding controls (Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ).**



**Figure 27:** Micronuclei (mcn) in the secondary roots of *Vicia faba* after 48 h or 5 days of exposure to maleic hydrazide (a) or copper sulphate (b) (mean  $\pm$  SD). N = 2 slides  $\times$  3 individuals. \* statistically significant difference from corresponding controls (Mann-Whitney U test,  $p < 0.05$ ).

## Discussion

MH is a well-known clastogenic and cytotoxic chemical (Marcano et al. 2004). Although its mechanism of action is still not completely understood (Gichner 2003; Patra et al. 1997), this molecule induces numerous large micronuclei that are very easily observable, thus it is often used as a positive control in micronucleus tests (Marcato-Romain et al. 2009; Souguir et al. 2008). In contrast to MH, Cu induced irregularly-shaped micronuclei. These structures were similar to those known as “nuclear buds”, found in *Allium cepa* by other authors (Fernandes et al. 2007; Leme et al. 2008; Leme and Marin-Morales 2009). These nuclear buds, attributed to the action of Cu ions (Abdel Migid et al. 2007), may be the result of a polyploidization process (Fernandes et al. 2007). Irregularly shaped nuclei and micronuclei linked to the main nucleus have been previously observed in *Allium cepa* after exposure to  $Pb^{2+}$  and  $Cr^{3+}$  (Liu et al. 1992; Liu et al. 1994).

MH inhibits cell division but not cell extension. Therefore, this antigerminative chemical does not prevent elongation of previously existing roots (Noodén 1969). Thus, the root length

decreased only in the case of the 5-day protocol. Indeed, in the case of the 48 h protocol secondary roots were pre-existing while in the 5-day protocol, they had to sprout in the spiked soil. Cu is a well-known growth inhibitor (Upadhyay and Panda 2009; Wang et al. 2004) and, as expected, it prevented root elongation in both protocols. In the 5-day protocol, the most sensitive and pertinent growth indicator for both pollutants was the maximal root length rather than the number of roots. This indicator can thus be recommended for the standard. Micronucleus frequency was for both toxicants a more sensitive biomarker than root length or elongation. This is in agreement with numerous authors (Cordova Rosa et al. 2003; da Rosa Corrêa et al. 2006; Dorn et al. 1998) which displayed a better relevance of the genotoxic biomarkers compared with the classical endpoints because of their predictive potential in risk assessments for soil at sublethal concentrations.

Micronuclei were induced by both toxicants and in both tested protocols, but they tended to be more numerous in the 48-h protocol. A time-dependent decrease in the micronucleus frequency has previously been observed in *V. faba* secondary roots exposed to soils contaminated with MH or heavy metals (Marcato-Romain et al. 2009). To explain this result, it should be noted that the plant defence system may become more efficient over time: in the case of Cu, the activity of oxidative stress enzymes increases (Wang et al. 2004) and phytochelatinins are synthesized to chelate Cu ions (Hall 2002; Zenk 1996). The MH clastogen mechanism is partially unknown, but some studies indicate that antioxidant enzymes or molecules can prevent, at least partially, its toxicity (Patra et al. 1997; Ruiz Flores et al. 2003). Hence, similarly to Cu, a longer exposure time may have activated a more efficient defence arsenal in the plant. Also, passive defence mechanisms can be reinforced, for example root excretions or suberin synthesis.

Another explanation for the time-dependent decrease of micronucleus frequency is the metabolization of the instable molecule of MH by the soil bacteria, and a loss of the bioavailability of the Cu ions in soil due to chelating by organic constituents (Warne et al. 2008).

Surprisingly, the plants from the organic culture did not show greater sensitivity than those from the conventional culture. In fact, the organically-cultured plants showed a lower sensitivity to Cu. This may be due to the routinely used “burgundy mix”, a copper-based treatment against a great number of plant diseases that is authorized in organic cultures. In fact, organic does not mean “non treated”, and successive generations of plants regularly exposed to copper may lead to organic plants which are more tolerant to Cu or other



chemicals (*via* cross-tolerance) than their chemically-treated counterparts. However, MH sensitivity was equivalent for both seed origins.

## **Conclusion**

The *Vicia faba* micronucleus test showed a comparable sensitivity to both tested chemicals for both exposure durations, although it was noted that the micronuclei number decreased over time. Thus, both exposure protocols are applicable, but since a 48-h exposure is more rapid and practical, it is recommended for the standardization of this test.

Organically-cultured seeds did not appear to offer any advantages over conventional seeds.

## **Acknowledgements**

The authors thank the French Agency for the Environment and Energy Management (ADEME, Paris, France) for financial support.

### 1.3.2.3 Influence de la concurrence entre les plantes

Etant donné qu'il a été montré que la fève est moins sensible à l'HM lorsque les plantes sont placées trop près les unes des autres (De Marco et al. 2005), nous avons cherché à savoir si planter les trois fèves dans trois pots séparés pouvait augmenter la sensibilité du test des micronoyaux. La Figure 28 nous montre que même si, comme nous l'avons déjà précisé au §1.2.1, l'HM a peu d'influence sur l'élongation racinaire, celle-ci se trouve significativement diminuée pour 5  $\mu\text{mol/kg}$  et très significativement pour 80  $\mu\text{mol/kg}$  dans le cas où les fèves sont placées seules dans chaque pot. Etrangement, cette diminution n'est pas significative pour la concentration de 20  $\mu\text{mol/kg}$ . En revanche, lorsque les trois fèves sont réunies dans le même pot, l'élongation racinaire n'est significativement diminuée que pour 80  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM. Ces différences statistiques sont en partie dues à l'écart-type moins important dans le cas où les fèves sont isolées, car la concurrence entre trois jeunes plantes occupant le même pot a tendance à induire la domination d'un individu sur les deux autres, d'où de plus grands écarts de croissance entre les individus.

Même si on peut en déduire qu'il serait préférable d'exposer les plantes dans des pots séparés, ne serait-ce que pour obtenir des statistiques plus précises en diminuant les écarts-types, la différence entre nos deux conditions d'exposition n'est pas clairement tranchée pour la concentration de 20  $\mu\text{mol/kg}$ . De plus, la concentration de 5  $\mu\text{mol/kg}$  est la seule pour laquelle on peut voir une différence significative entre les deux modalités. Qui plus est, ni la fréquence de micronoyaux, ni l'indice mitotique ne semblent affectés par les modalités d'exposition (Figure 29).

### Conclusions

- **L'exposition en pots séparés pourrait éventuellement augmenter la sensibilité de l'élongation racinaire, surtout en améliorant sa répétabilité.**
- **Le nombre de plantes par pot n'affecte en aucun cas l'indice mitotique ou la fréquence de micronoyaux.**
- **Dans la mesure du possible, une exposition en pots séparés serait conseillée mais pas obligatoire, son intérêt tout relatif étant à mettre en balance avec les problèmes pratiques que pourrait poser la multiplication par trois du nombre de pots nécessaires.**

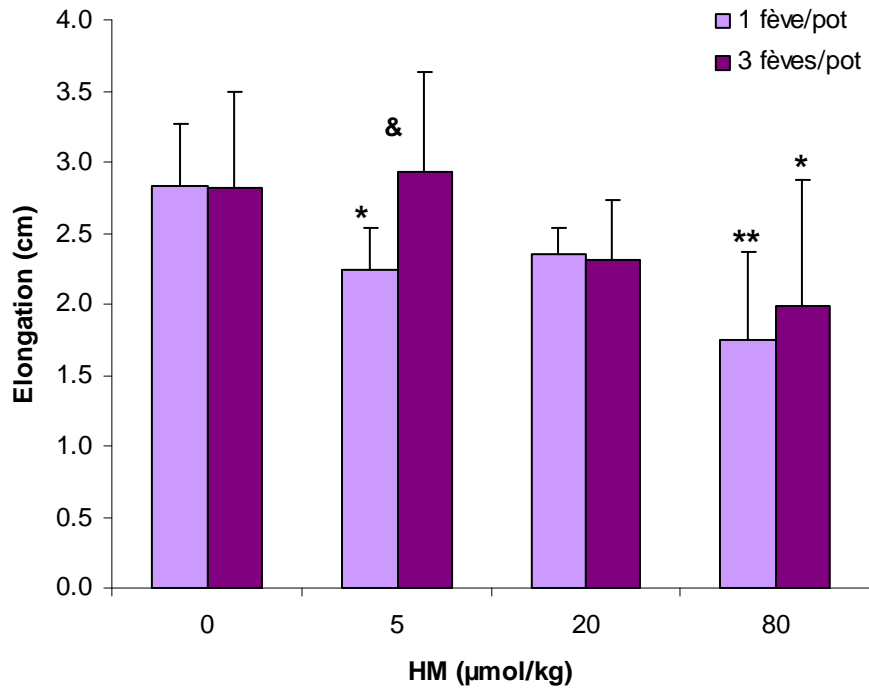


Figure 28 : Elongation racinaire mesurée sur les racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différentes concentrations d’hydrazide maléique en milieu solide (moyenne +/- écart-type, 3 fèves, n = 9 racines). ANOVA suivie du test t de Dunnett : significatif par rapport au témoin : \* p<0,05 ; \*\*p<0,01. & : Significatif entre les modalités « 1 fève/pot » et « 3 fèves/pot » pour une concentration donnée, test t de Student, p<0,05.

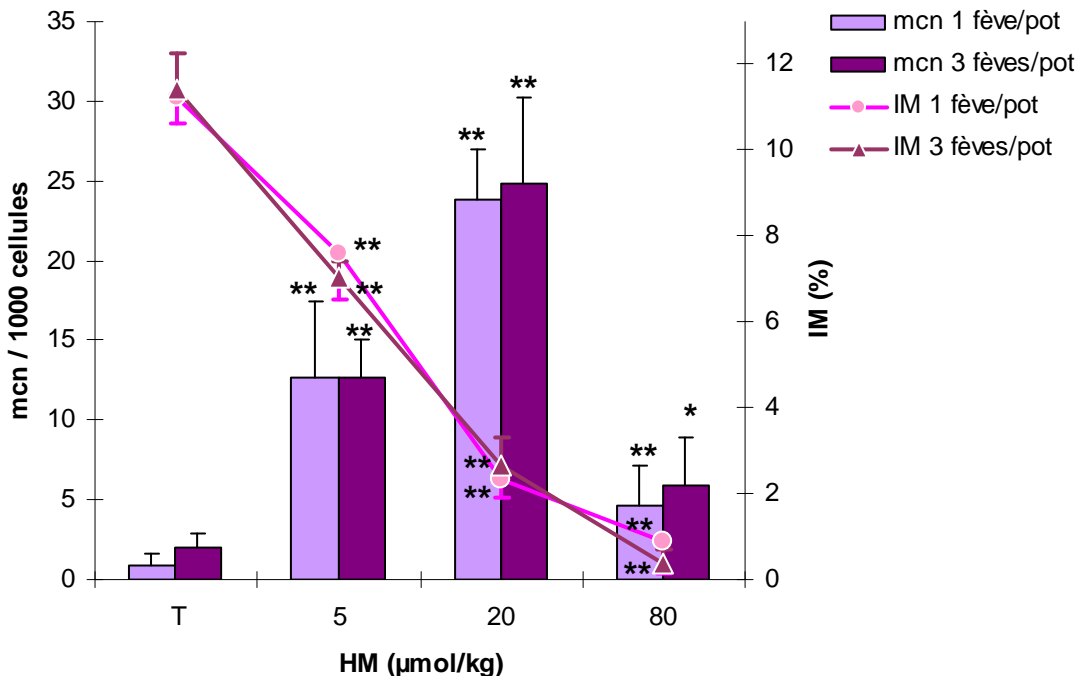


Figure 29 : Fréquence de micronoyaux pour 1000 cellules et indice mitotique (%) retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination dans différentes concentrations d’hydrazide maléique en milieu solide (moyenne +/- écart-type, 3 fèves, n = 6 racines). Kruskal-Wallis suivi du test U de Mann-Whitney : \* p<0,05 ; \*\*p<0,01. Aucune différence significative entre les modalités « 1 fève/pot » et « 3 fèves/pot », test U de Mann-Whitney, p<0,05.

## **2 Test des comètes**

### **2.1 Ajustement du protocole**

#### **2.1.1 Première couche d'agarose**

Aucune différence n'a été mise en évidence entre les lames recouvertes de 70 $\mu$ L d'agarose à point de fusion normal (environ 90°C) à 0,8% dans de l'eau ultrapure et celles recouvertes de 70 $\mu$ L d'agarose à bas point de fusion (environ 70°C) à 0,5% dans du PBS. Nous adopterons cette seconde méthode pour des raisons pratiques, cette solution étant la même que celle utilisée pour la troisième couche.

#### **2.1.2 Nombre de racines à utiliser**

Il s'agit d'obtenir un nombre suffisant de noyaux pour trouver sans peine 50 noyaux à lire sur chaque lame, mais sans que ces derniers ne soient trop serrés. Une dizaine de racines d'1 cm de long est idéale.

#### **2.1.3 Tampon à utiliser pour la découpe des racines**

Dans la bibliographie, certains auteurs utilisent le tampon Tris à 400 mM pH 7,5 (Gichner and Mühlfeldová 2002), d'autres un tampon de Sørensen (Pincheira et al. 2003). Nous n'avons testé que le tampon PBS utilisé par Cotelle dans sa thèse (Cotelle 1999). Par contre, nous avons augmenté la concentration de Na<sub>2</sub>EDTA de 1 mM à 5 mM pour mieux protéger l'ADN.

#### **2.1.4 Scalpel ou lame de rasoir ?**

Nous avons préféré les lames de rasoir à usage unique au scalpel réutilisable qui perdait de son tranchant. En cassant une lame de rasoir en deux dans le sens de la longueur (une simple torsion suffit), nous pouvions utiliser les deux côtés alternativement.

#### **2.1.5 Temps de séjour des noyaux dans le PBS**

Les noyaux sont très fragiles. Plus ils séjournent dans le tampon, plus ils risquent de se dégrader. Réduire le plus possible le temps écoulé entre la découpe des racines et le coulage de la lame est donc crucial. Nous nous sommes fixé 3 min maximum, mais certains expérimentateurs s'autorisent à peine 30 secondes.

### 2.1.6 Filtration ?

Après avoir filtré systématiquement à 50  $\mu\text{m}$  les suspensions nucléaires dans le PBS avant de les mélanger à l'agarose, nous avons fini par supprimer cette étape qui augmente le temps de séjour des noyaux dans le PBS sans être réellement utile. En effet, même sans filtration, on retrouve peu de débris sur les lames, et la lecture ne s'en trouve pas gênée.

### 2.1.7 Lyse

Destinée au départ à détruire la membrane plasmique des cellules animales, cette étape nous a semblé facultative, puisque dans le cas des cellules végétales, nous travaillons sur des noyaux isolés et non sur des cellules entières (Cotelle 1999; Cotelle and Férard 1999). Les premiers essais sans lyse ont donné des résultats ininterprétables, avec des cellules apoptotiques (Figure 11, p 62) ou nécrosées (Figure 30a, b), voire, exceptionnellement, des noyaux ayant conservé leur membrane nucléaire (Figure 30c).

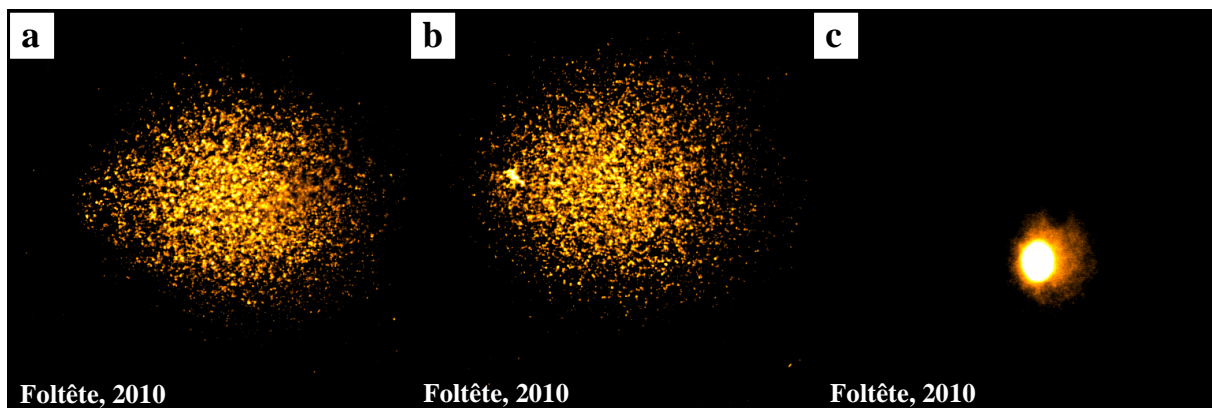


Figure 30 : (a), (b) : type de structures parfois retrouvées à la place des comètes même dans les témoins négatifs, souvent avec les protocoles sans lyse. (c) : noyau ayant subi le test des comètes sans lyse, et qui semble avoir conservé sa membrane nucléaire (grossissement x 400).

Il s'est alors avéré que 20 min de lyse permettait d'obtenir de très bons témoins négatifs (tail DNA ~5%), mais uniquement si la solution de lyse ne contenait ni DMSO ni Triton X-100. Ce résultat est en accord avec Mancini et al. (2006), qui constatent que cette étape permet d'améliorer la qualité de l'observation microscopique. Singh et al. (1988), pour leur part, n'ont constaté aucun effet de la présence ou de l'absence de lyse sur le tail moment de noyaux de *Nicotiana tabacum* traités à l'EMS.

La Figure 31 illustre les résultats obtenus pour deux protocoles de test des comètes différents, avec ou sans lyse, et pour des lames issues de racines exposées à  $\text{CdCl}_2$  (5 à 100  $\mu\text{M}$ ) durant 24h. Afin de minimiser les disparités dues aux différences interindividuelles, les noyaux sont tous issus du même individu pour chaque traitement. Les deux couples de lames « a » et « b » ont subi exactement le même protocole de test. Pour le protocole sans lyse, nous avons réussi à obtenir des lames lisibles en diminuant le plus possible le temps de séjour des noyaux dans le tampon PBS (§ 2.1.5). La lyse rend les résultats très homogènes d'une lame à l'autre, mais diminue drastiquement la sensibilité du test et la différence entre les témoins négatif et positif. Par contre, l'absence de lyse dans le protocole permet d'obtenir une plus grande différence entre le témoin et les individus traités au cadmium ou au peroxyde d'hydrogène, mais il existe de grandes disparités d'une lame à l'autre : en effet, à 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{CdCl}_2$ , on voit nettement que la lame « a » affiche un tail DNA inférieur à 10% tandis que la lame « b » atteint les 35%. Les témoins négatifs sont également de moins bonne qualité que ceux ayant subi une lyse.

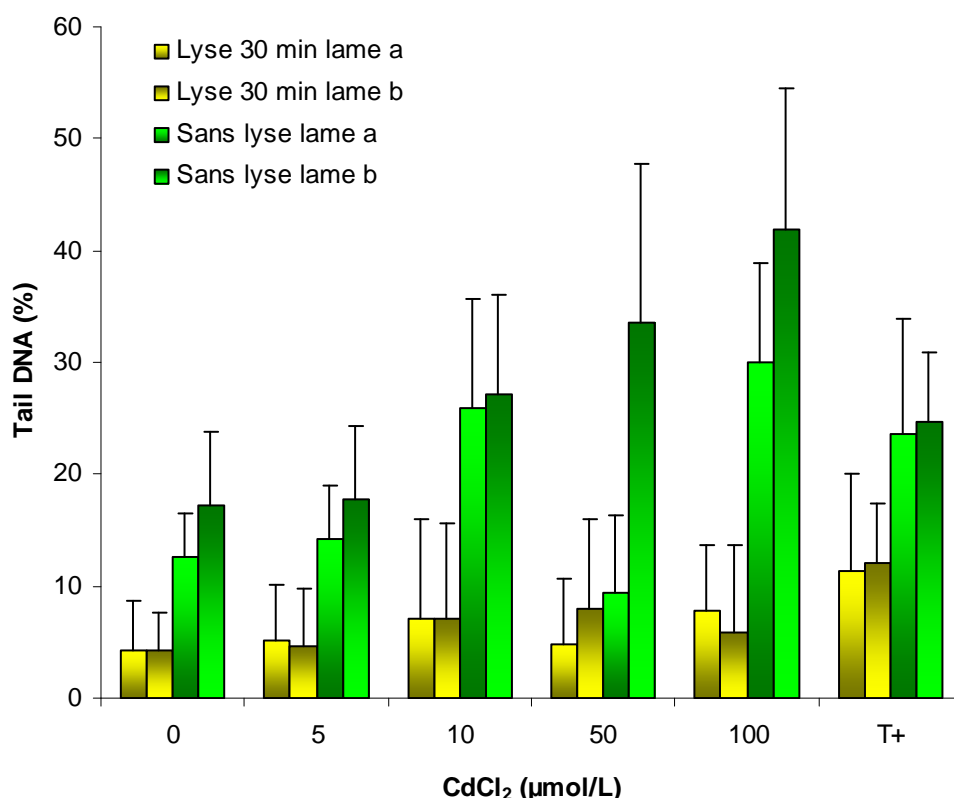
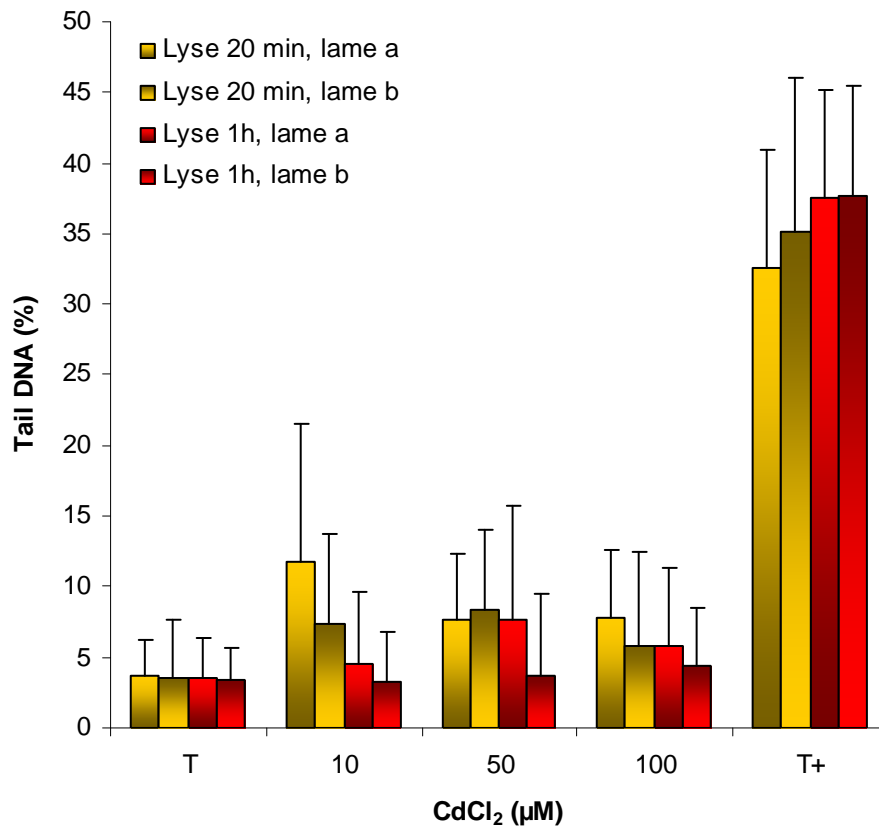


Figure 31 : Tail DNA (moyenne  $\pm$  écart-type) obtenu avec le test des comètes sur racines secondaires de *Vicia faba* après 24h d'exposition au dichlorure de cadmium en milieu liquide (milieu de Hoagland). Protocole : Une même suspension nucléaire issue d'une seule plante par concentration a été répartie entre 4 lames. Deux ont subi une lyse > 30 min (lames a et b), deux n'ont pas été lysées (lames a et b). Electrophorèse dans 1,5 L de tampon, à 20V, 500 mA. T+ (témoin positif) : lames immergées dans une solution d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 100  $\mu\text{M}$  pendant 20 min.

Nous avons ensuite fait varier le temps de lyse en sélectionnant un temps plus court (20 min) et plus long (60 min). La Figure 32 permet d'observer que le temps de lyse n'influence quasiment pas le tail DNA.

La seule explication que nous pourrions trouver à cette différence de résultat entre protocole incluant ou non une étape de lyse serait le mauvais rinçage des lames entre la lyse et l'électrophorèse. En effet, la solution de lyse contient des substances, dont NaCl, capables d'empêcher la migration de l'ADN dans le champ électrique. Le protocole « habituel » prône un bref et unique rinçage dans une partie de la solution d'électrophorèse. Nous avons tenté de rincer les lames dans deux bains de PBS, mais sans changer les résultats.



**Figure 32 : Tail DNA (moyenne +/-écart-type) obtenu avec le test des comètes sur racines secondaires de *Vicia faba* après 24h d'exposition au dichlorure de cadmium en milieu liquide (milieu de Hoagland). Protocole : 3 individus par concentration 3 racines par individu mélangées ensemble, puis cette solution nucléaire déposée sur 2 lames (a et b). Electrophorèse dans 1,5 L de tampon, à 20V, 500 mA. T+ (témoin positif) : lames immergées dans une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 50 mM pendant 50 min.**

### **2.1.8 Electrophorèse**

La tension et l'intensité sont interdépendants. On ne peut fixer que l'un des deux paramètres, l'autre variant selon le volume et la résistivité du tampon. Ainsi, avec 1 L de tampon, le générateur étant réglé à 20 V, l'intensité était de 300 mA, alors qu'avec 1,5 L de tampon, l'intensité était de 500 mA.

Nous avons travaillé avec deux cuves différentes, l'une n'acceptant que 10 lames avec 1 L de tampon et l'autre 24 lames avec au moins 1,2 L de tampon.

Dans cette dernière qui pouvait contenir 24 lames, nous nous sommes posé la question de l'homogénéité de la migration selon la place que la lame occupe dans la cuve. Selon nos tests, cette place n'a pas d'influence sur le tail DNA.

L'allongement du temps d'électrophorèse de 15 à 30 min, dans le cas d'un protocole avec lyse, a permis d'accentuer les différences entre les concentrations de toxique, mais a eu pour effet de diminuer la qualité des témoins négatifs.

### **2.1.9 Fixation**

Cinq minutes de fixation dans l'éthanol pur permet d'obtenir des lames encore parfaitement lisibles au bout de plusieurs mois.

### **2.1.10 Répétabilité, reproductibilité**

Les écarts-types sont toujours très larges dans le test des comètes, et tous les auteurs rencontrent ce problème. De plus, nous avons souvent constaté une différence très marquée entre deux lames où on avait coulé la même solution nucléaire, surtout lorsque le protocole ne comporte pas d'étape de lyse (Figure 31).

Nous avons aussi remarqué une grande disparité du tail DNA entre les comètes d'une même lame selon leur position sur celle-ci : sur les bords de la lame, les noyaux sont plus dégradés et le tail DNA est souvent bien supérieur à celui des comètes se trouvant au centre de la lame.

La répétabilité est donc un point faible du test des comètes. De plus, la reproductibilité laisse également à désirer, étant donné que deux tests menés dans les mêmes conditions après expositions aux mêmes concentrations de toxique peuvent donner des résultats radicalement différents (résultats non montrés).



### 2.1.11 Conservation

Toutes nos tentatives de conservation des racines dans l'azote liquide ont donné des témoins négatifs très dégradés par rapport à ceux réalisés sur racines fraîches. L'immersion des racines dans le sucrose à 10, 20 ou 30% pendant 15 ou 30 min avant congélation n'a pas donné de résultat probant. Par contre, il semble que les lames contenant les noyaux coulés dans l'agarose peuvent être conservées à +4°C à l'obscurité dans le PBS pendant au moins 48h. Leur tail DNA s'est en effet révélé comparable à celui trouvé sur des lames fraîchement préparées.

### 2.1.12 Comètes après exposition en milieu solide

Le test des comètes en milieu solide a pu être réalisé comme en milieu liquide, en obtenant chez les témoins négatifs un tail DNA comparable à celui des témoins négatifs cultivés en milieu liquide.

### 2.1.13 Témoins positifs

Les meilleurs témoins positifs sont obtenus par immersion des lames contenant une suspension nucléaire issue de racines non traitées dans une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 50 mM pendant 50 min, à +4°C et à l'obscurité (cf. Figure 32).

Møller (2006) conseillent l'utilisation des rayons X pour la calibration de l'essai des comètes, mais ceci présuppose certains équipements dont nous ne disposons pas.

## 2.2 Synthèse sur l'essai des comètes

Au cours de notre tentative d'optimisation, nous avons rencontré de nombreux problèmes.

Le premier et le plus sérieux d'entre eux concerne les témoins négatifs. En effet, dans la bibliographie, les auteurs obtiennent généralement des témoins négatifs avec moins de 5% d'ADN dans la queue (Mancini et al. en 2006 sur feuilles de *Nicotiana tabacum* : 2,98 +/- 1,59%).

Pour notre part, si nous avons très vite obtenu des témoins négatifs de qualité correcte, affichant des tail DNA aux environs de 5% de manière très répétable et reproductible grâce à l'étape de lyse, il s'est avéré que cette étape « gommait » également les différences entre les témoins négatifs et positifs, et que notre test n'était pas sensible.

En supprimant l'étape de lyse, nous avons augmenté radicalement la sensibilité du test, mais au détriment des témoins négatifs, qui affichaient un tail DNA souvent compris entre 20 et 40%. Afin de tenter de diminuer cette valeur, nous avons exploré un grand nombre de pistes.

Malheureusement, le test des comètes comprenant de nombreuses étapes qui peuvent toutes potentiellement causer une altération des noyaux, il est très difficile d'isoler la source d'un problème.

Il nous semble par expérience que le test des comètes sur cellules végétales est plus difficile à optimiser que celui sur cellules animales. En effet, ces dernières n'étant pas protégées par une paroi, la suspension cellulaire est directement incluse dans l'agarose et plongée dans la solution de lyse pour détruire les membranes. Ce n'est qu'à partir de ce moment que les noyaux deviennent vulnérables à la lumière et à la température. Sur cellules végétales, en revanche, l'étape la plus délicate, et probablement responsable des problèmes sus-cités, est la découpe des tissus et l'isolement des noyaux extrêmement fragiles dans le tampon.

En ce qui concerne les problèmes de répétabilité et de reproductibilité, ils sont souvent inhérents au test des comètes et lui sont reprochés par ses détracteurs. Sa grande variabilité inter-laboratoire, inter-individuelle ou même inter-expérimentations a été décrite dans la revue de Dhawan et al. (2009). Ces auteurs recommandent une harmonisation des protocoles et appellent à leur normalisation.

Des propositions en ce sens ont été émises par Bauch et al. (1999) et Olive et Banath (2006).

La pertinence écologique du test est parfois mise en doute. En effet, on sait que presque 80% des dommages génotoxiques visibles par le test des comètes causés par les rayons X dans les racines de *Vicia faba* sont réparés en moins de 2h (Koppen and Angelis 1998) ; ceux dûs à une irradiation aux rayons gamma disparaissent en 24h dans les feuilles de *Nicotiana tabacum* (Gichner et al. 2000b).

De même, Gichner et al. (2007) trouvent une légère génotoxicité avec le test des comètes mais pas de mutations dans les feuilles de *Nicotiana tabacum* exposé à un sol pollué aux PCBs, et expliquent ce résultat par le blocage de la mitose.

Enfin, citons le cas très particulier de l'hydrazide maléique, un agent qui de façon encore inexpliquée ne provoque aucun dommage visible par le test des comètes alors qu'il possède des propriétés hautement clastogènes, aneugènes et mutagènes pour les cellules végétales (cf. analyse bibliographique, § 3.1.6).

En revanche, la pertinence écologique du test prend tout son sens en ce qui concerne les agents alkylants. En effet, les lésions provoquées après exposition à l'EMS ou à l'ENU restent encore détectables par le test des comètes dans les feuilles de *Nicotiana tabacum* pendant plus de 4 semaines après exposition sans que ces altérations soient dues à la persistance du produit dans les tissus. Même les feuilles néoformées présentent des dommages génotoxiques (Gichner et al. 2000b). Les lésions détectées par le test des comètes ne sont donc pas toujours transitoires. Nous ajouterons que même dans le cas de lésions simples brins vite réparées comme le sont celles causées par les irradiations, toute réparation implique un risque d'erreur et de mutation génétique.

De plus, la corrélation entre la fréquence de mutations somatiques et le tail moment retrouvés dans les feuilles de *Nicotiana tabacum* exposée à des agents alkylants (éthyl methanesulfonate, méthyl methanesulfonate, N-éthyl-N-nitrosourée et N-méthyl-N-nitrosourée) est très significative (Gichner et al. 1999).

S'il n'est pas parfait, et aucun test ne l'est, le test des comètes sur plantes ou autres organismes est donc pertinent et peut révéler un risque génotoxique à étudier plus en détail.

Il a donc tout à fait sa place dans une batterie de tests de criblage pour apprécier les risques génotoxiques de matrices polluées (Dhawan et al. 2009).

Malgré les nombreux problèmes que nous avons rencontrés en optimisant le test des comètes, nous restons convaincus qu'il s'agit d'un test très utile voire irremplaçable dans l'évaluation de la génotoxicité des matrices polluées, entre toutes ses autres applications possibles. Sa pertinence écologique ne nous semble pas à mettre en question.

### 3 Dosage des thiols par HPLC

Le Tableau IV donne un ordre d'idée du temps de rétention (TR) moyen des différents thiols qui nous intéressent. Ce temps peut varier d'une à deux minutes en fonction surtout de la concentration en acétonitrile de la phase mobile.

On remarque que le GSH est retenu moins longtemps dans la colonne que la  $\gamma$ GC, alors que cette dernière est une molécule de poids moléculaire (PM) plus faible et donc sans doute d'un encombrement stérique inférieur. Ceci est sans doute dû à une affinité supérieure du GSH avec l'acétonitrile. Mise à part cette exception, toutes les autres molécules affichent des TR d'autant plus grands que leur PM est élevé.

La force du signal fluorescent est très variable et dépend d'un grand nombre de facteurs inhérents au type de matériel utilisé. On remarque dans la Figure 33 qu'elle varie également beaucoup selon la nature de la molécule. On pourrait pourtant s'attendre à une certaine homogénéité du signal en ce qui concerne les molécules à un seul groupement thiol (Cys,  $\gamma$ GC, GSH), puisque le marqueur fluorescent utilisé ne se fixe normalement que sur ces groupements. Au lieu de cela, il semble que plus la molécule a un PM élevé, plus elle émet une forte fluorescence.

L'ampleur du signal fluorescent des phytochélatines n'est pas toujours proportionnelle au nombre de groupements thiols. En effet, ceci n'est vrai que pour les PC2 et 3. La PC4 se caractérise par une fluorescence moins puissante que la PC3, et la PC5 fluoresce moins que le GSH. Nous pouvons supposer que l'encombrement stérique peut causer un affaiblissement du signal fluorescent.

**Tableau IV : Temps de rétention (TR) moyen des différents thiols dosés par HPLC.**

Molécule	Cys	GSH	$\gamma$ GC	PC2	PC3	PC4	PC5
TR (min)	16	22	24	34	38	42	44

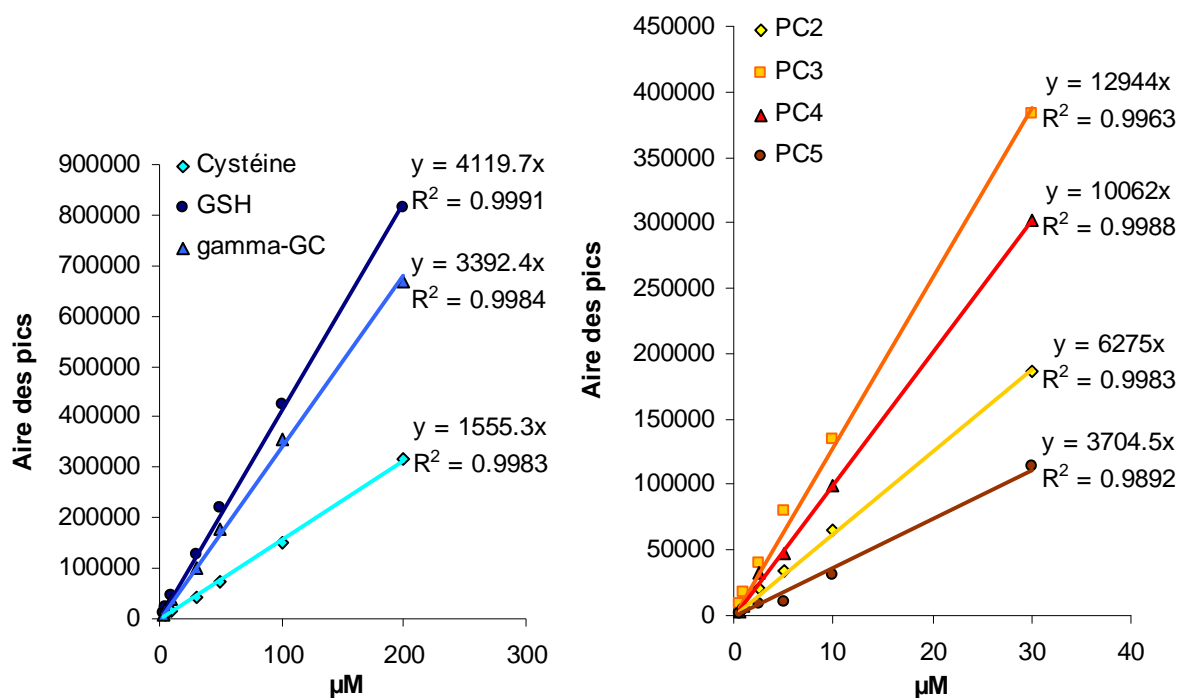


Figure 33 : Courbes d'étalonnage des différents thiols dosés par HPLC.

La Figure 34 montre des exemples de tracés obtenus par dosage HPLC dans des racines secondaires de *Vicia faba* témoins et exposées au dichlorure de cadmium. Sur le tracé témoin (haut de la figure) sont visibles les pics correspondant au GSH et à la PC2 et un pic avec un TR de 27 min que nous n'avons pas pu identifier. Sur le tracé obtenu après induction par le cadmium apparaissent en plus ceux correspondant aux PC3 et 4. Un artefact dû au solvant est retrouvé sur tous les tracés aux alentours de 9 min. A la fin de chaque analyse, l'augmentation de la concentration en acétonitrile dans la phase mobile provoque une augmentation du niveau basal, qui revient à la normale lorsque la concentration d'acétonitrile retombe à 10%.

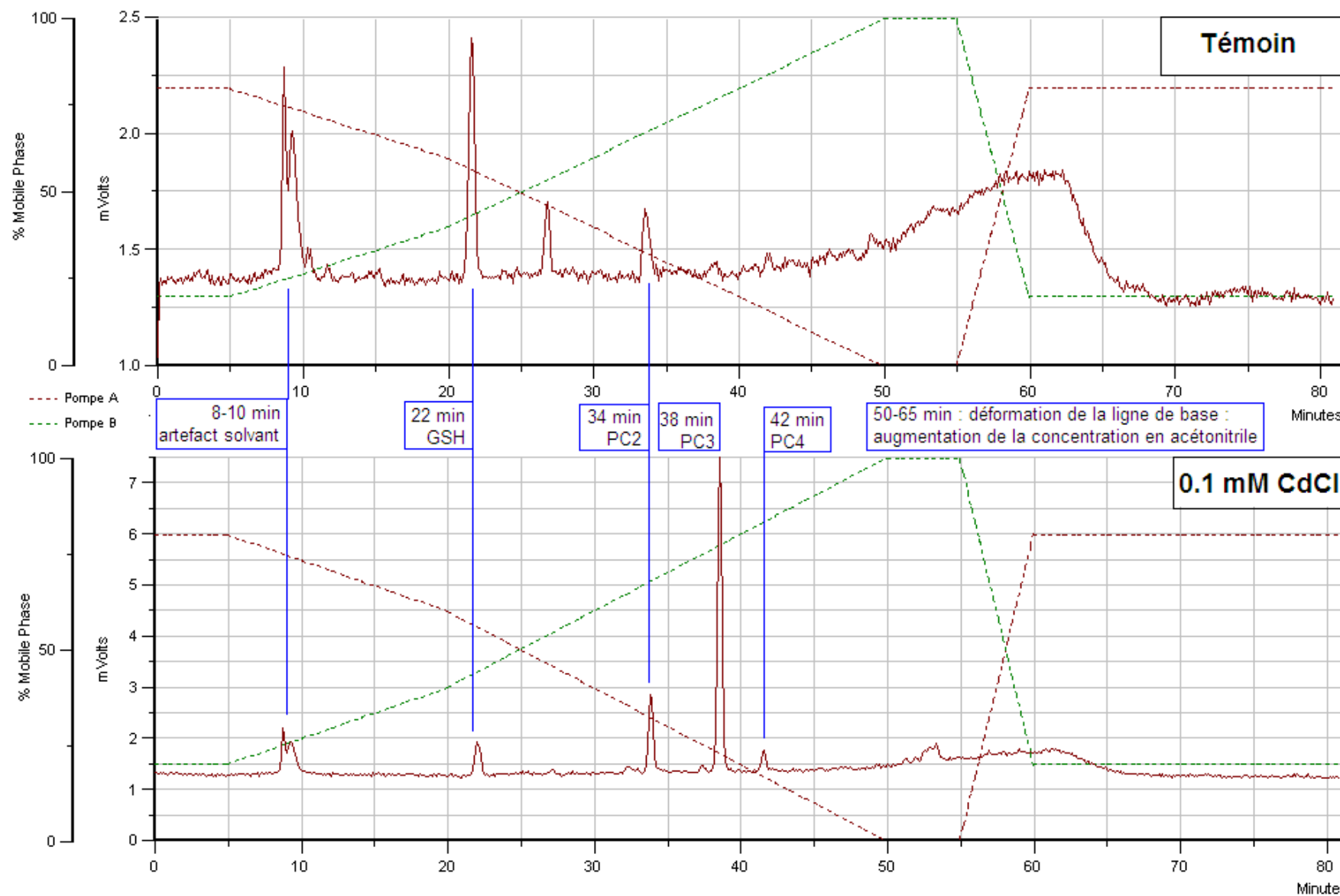


Figure 34 : Tracé obtenu par dosage HPLC des thiols dans les racines secondaires de *Vicia faba*. Haut : Témoin, 50% Evian, 50% eau mQ. Bas : exposition 48h à 0,1mM CdCl<sub>2</sub> en milieu liquide, dilué dans la même matrice. Pompe A : eau + 0,1% TFA ; Pompe B : 50% eau, 50% acétonitrile, 0,1% TFA.

Dans le cadre du programme Nanoalter (cf. publication ci-dessous), nous avons détecté une concentration en glutathion total de  $110 \pm 29$  nmol/g de poids frais (moyenne  $\pm$  écart-type) dans les racines secondaires de fèves âgées de 10 jours. Ce résultat est en concordance avec celui publié par Matamoros et al. (1999), qui trouvent  $96 \pm 1$  nmol/g de poids frais (moyenne  $\pm$  erreur standard) dans les racines de fèves âgées de 30 à 35 jours. Dans les feuilles, ces auteurs trouvent  $383 \pm 27$  nmol/g de poids frais (moyenne  $\pm$  erreur standard). Pour notre part, le dosage du glutathion total dans les jeunes pousses de 10 jours (jeunes feuilles et bourgeons) donne  $761 \pm 201$  nmol/g de poids frais (moyenne  $\pm$  écart-type). Ce résultat, proche du double de celui trouvé dans la littérature, peut s'expliquer par le fait que les jeunes pousses sont logiquement plus riches en antioxydants que les feuilles plus âgées.

Les individus contaminés 48h à 0,1 mM de  $\text{CdCl}_2$  affichent une induction très nette de PC2, 3 et 4 dans les racines (cf. publication ci-dessous) et une induction non significative dans les jeunes pousses (non montré). Les résultats de ce dosage sont difficilement comparables à ceux de la littérature. En effet, le taux de PC y est souvent exprimé en équivalent glutathion (Béraud et al. 2007) et les conditions expérimentales diffèrent.

### Conclusion

- **Les concentrations de glutathion trouvées dans les tissus de nos témoins négatifs sont en accord avec les résultats publiés dans la littérature.**
- **Notre témoin positif  $\text{CdCl}_2$  provoque une induction très marquée de trois PC dans les racines au bout de 48h d'exposition.**
- **Le dosage des thiols dans les feuilles et racines de *Vicia faba* est correctement optimisé.**

## 4 Nanoalter

L'étude que nous avons menée dans le cadre du projet Nanoalter a fait l'objet d'un manuscrit (voir ci-après) en attente des corrections de certains co-auteurs.

**Environmental impact of sunscreen nanomaterials: ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO<sub>2</sub> nanocomposites on *Vicia faba***

Anne-Sophie Foltête<sup>1</sup>, Jean-François Masfaraud<sup>1</sup>, Emilie Bigorgne<sup>1</sup>, Johanne Nahmani<sup>1</sup>, Perrine Chaurand<sup>2,3</sup>, Céline Botta<sup>2,3</sup>, Jérôme Labille<sup>2,3</sup>, Jérôme Rose<sup>2,3</sup>, Jean-François Féraud<sup>1</sup>, Sylvie Cotelle<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), Université Paul Verlaine-Metz, CNRS UMR 7146, Campus Bridoux, Avenue du Général Delestraint, 57070 Metz, FRANCE

<sup>2</sup> Centre Européen de Recherches et d'Enseignement des Géosciences de l'Environnement (CEREGE), CNRS-Aix Marseille Université UMR 6635, Europole de l'Arbois, BP80, 13545 Aix-en-Provence cedex 04, France

<sup>3</sup> iCEINT, international Consortium for the Environmental Implications of Nanotechnology, F-13545 Aix-en-Provence cedex 04, France.



## Abstract

Toxicity and genotoxicity of Altered TiO<sub>2</sub> Nanocomposites (ATN) used in sunscreen have to our knowledge never been evaluated on plant material. Mineral sunscreen nanocomposites, based on a TiO<sub>2</sub> core, coated with aluminium hydroxide and dimethicone films, were submitted to an artificial ageing process. The resulting Altered TiO<sub>2</sub> Nanocomposites (ATN) were then tested in liquid phase on a plant model, the broad bean *Vicia faba*, which was exposed for 48 h to 3 nominal concentrations: 5, 25 and 50 mg ATN/L at pH 6.5. Plant growth, photosystem II maximum quantum yield (Fv/Fm ratio), genotoxicity (micronucleus test) and phytochelatins levels showed no change compared to controls. Oxidative stress biomarkers remained unchanged in shoots while in roots, glutathione reductase activity decreased at 50 mg ATN/L and ascorbate peroxidase activity decreased for 5 and 25 mg ATN/L. Nevertheless, despite the weak response of biological endpoints, high Ti and Al concentrations in roots were revealed by ICP-MS, each being proportional to metal concentration in the exposure suspension. This was confirmed by X-ray fluorescence micro-spectroscopy, which revealed ATN internalization in superficial root tissues.

Keywords: higher plant, rutile, nanoparticles, alteration, titanium dioxide, oxidative stress, risk assessment

## Introduction

With the fastly growing number of commercial products incorporating or made of manufactured nanoparticles (MNPs), the dispersion of MNPs in the environment is not science fiction but already occurring. Indeed first measurements from Kaegi et al. (2008) represent the first direct evidence of the release of synthetic nanoparticles from MNPs applications into the environment. They showed the leaching of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles from house facades treated with paint containing nano-TiO<sub>2</sub> under the influence of atmospheric conditions. TiO<sub>2</sub> nanoparticles are also more and more included in sunscreen creams for their good UV filter properties (AFSSET 2010). Like other cosmetic products, sunscreen components are likely to end up in surface waters, wastewaters and waste disposals.

The photocatalytic properties of TiO<sub>2</sub> nanoparticles are really problematic once these particles released into the environment. Indeed, they are powerful reactive oxygen species (ROS) producers when exposed to UV (Reijnders 2008). In plants, bare TiO<sub>2</sub> nanoparticles can show either positive or negative effects (Brar et al. 2010; Ma et al. 2010). Seeger et al. (2009) do not notice warning signs in acute exposure of willow trees to TiO<sub>2</sub> nanoparticles, while Asli and Neumann (2009) conclude to a clogging of these particles in *Zea mais* isolated roots, leading to an impairment of water flow. In *Allium cepa*, 15 nm sized TiO<sub>2</sub> nanoparticles induce neither root growth change nor genotoxicity, but enhance or inhibit the mitotic activity of root meristems in a concentration- and exposure duration-dependant manner (Klančnik et al. 2011). Surprisingly, many authors describe positive effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles towards higher plants. Thus, these nanoparticles could enhance seed germination and plant growth (Zheng et al. 2005), increase plant resistance towards oxidative stress (Zheng et al. 2008), enhance photosynthesis efficiency (Zheng et al. 2007a; Zheng et al. 2007b) and nitrate reductase efficiency, leading to an acceleration of nitrogen assimilation (Yang et al. 2006; Yang et al. 2007). The three latter positive effects seem to be related to nano-TiO<sub>2</sub> photocatalytic properties.

In sunscreens, nano-TiO<sub>2</sub> particles are surface modified to inhibit ROS generation (Reijnders 2006; Wakefield et al. 2004) and prevent toxic effects, but the stability of the protective layers and the effects of such altered structures on ecosystems remain largely unknown.

Auffan et al. (2010) and Labille et al. (2010) have artificially mimicked the natural expected alteration of T-Lite SF (BASF), a nanocomposite entering in sunscreen formula. T-Lite are based on a nano-TiO<sub>2</sub> core coated with aluminium hydroxide Al(OH)<sub>3</sub> and polydimethylsiloxane (PDMS) films. In the continuity of these studies, we investigated the biological effects of their Altered Titanium Nanocomposites (ATN) on a plant model, the broad bean *Vicia faba*. This model was chosen for its well-known sensitivity to pollutants. Indeed it has been used by numerous authors to assess the ecotoxicity, and particularly the genotoxicity of substances, radiations, or liquid or solid polluted matrix (Cotelle et al. 1999; Manier et al. 2009; Minouflet et al. 2005; Radetski et al. 2004; Ünyayar et al. 2006).

After exposing *Vicia faba* to ATN suspensions, ecotoxicological and genotoxicological endpoints were assessed. Titanium and aluminium concentrations were determined in roots, and titanium internalization was studied by X-ray fluorescence micro-spectroscopy.

## Materials and methods

### *1. Nanocomposites artificial ageing*

Mineral sunscreen nanocomposites, based on a TiO<sub>2</sub> core (10 nm x 50 nm), coated with aluminium hydroxide and polydimethylsiloxane layers, were submitted to an alteration process detailed by Labille et al. (2010). Briefly, 100 mg nanocomposite powder (provided by the manufacturer) were introduced in 250 mL ultrapure water and kept agitated (690 rpm) under a white light (400 W Philips® Master HPI-T Plus) to mimic solar spectrum during 48 h. The pH was free, the volume was constant. After alteration, the resulting mixture was rested for 48 h and the supernatant of stable altered TiO<sub>2</sub> nanocomposites (ATN) was used for the tests.

## **2. ATN dilution and size characterization**

ATN suspension (120 mg/L) was diluted in a water mix (50% Evian<sup>®</sup> french mineral water : 50% ultrapure water, v:v) to the following concentrations: 5, 25 and 50 mg ATN/L. Evian<sup>®</sup> is a weakly mineralized water. The predominant ions are Ca<sup>2+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. The 50% dilution provided a mix with low ionic strength (4.8 mM) minimizing ATN aggregation, but sufficiently mineralized to ensure an acceptable plant physiological state. At the beginning of the experiment, the pH was adjusted to 6.5 with HNO<sub>3</sub>. The medium was not buffered because of the rapid ATN aggregation in every tested buffer.

Laser diffraction was used to measure ATN size distribution in the mixture of ultrapure and mineral waters (50:50, v:v) at 25 mg/L during the first 5 hours. The apparatus used was a Malvern Mastersizer S (Malvern Instruments, Malvern, UK) displaying a measuring range from 50 nm to 900 µm. Two separate particle groups were specifically studied: particles below 700 nm, considered as stable colloidal suspension, and particles over 10 µm, considered as aggregates undergoing rapid settling.

Turbidity measurements were used to determine the limit conditions for colloidal stability of the ATN dispersion as a function of their concentration. The suspension was diluted from 5 to 50 mg/L in the mixture of ultrapure and mineral waters (50:50, v:v), and left 24 h in the dark to allow settling of particles. The supernatant turbidity was then measured using a Hach 2100 AN turbidimeter.

## **3. Plant germination and treatment**

Commercial dry seeds of *Vicia faba* (var. Aguadulce, Fabre<sup>®</sup>) were used for the experiments. Seeds were soaked in deionized water for 24 h, allowed to germinate between two layers of wet cotton at 22°C for 3 days. After removing the primary root tips, the seedlings were suspended in aerated Hoagland's solution at 22°C for 4 days to promote the development of secondary roots.

Each *Vicia faba* plantlet was placed in an individual pot (Wheaton<sup>®</sup> glass) containing 100 mL of the diluted suspension. During exposure, plant roots and ATN suspension were protected from light while leaves were placed under plant growth lights (125W, Envirolite<sup>®</sup>, 6400°K). Four individuals were used per concentration, randomly disposed to balance a potential unequal light distribution. Exposure lasted 48h without renewing

exposure medium. The pots were briefly agitated 2 times a day to resuspend the particles. Experiments were conducted in a glove box, at 20°C +/- 1.

The dilution medium was used as a negative control. Maleic hydrazide 10 µM (MH; CAS No. 123-33-1) was used as a positive control for genotoxicity. CdCl<sub>2</sub> 0.1 mM (CAS No 10108-64-2) was used as a positive control for root elongation and as a reference metal for thiol levels in tissues and oxidative stress biomarkers (Béraud et al. 2007; Lin et al. 2007).

#### ***4. Plant harvesting***

After 48 h exposure, secondary roots were carefully rinsed twice with ultrapure water and elongation of three secondary roots per plant was assessed by the difference between their length before and after exposure.

For micronucleus test, root tips were excised and fixed overnight in Carnoy solution (25 % glacial acetic acid : 75 % ethanol, v:v) at +4°C and then stored in 70 % ethanol at +4°C.

Photosystem II maximum quantum yield was assessed in leaves through Fv/Fm ratio using a portable Handy PEA (Handy-Plant Efficiency Analyser, Hansatech Instruments, Norfolk, UK). Fv/Fm ratio is commonly used as an indicator of overall plant physiological status.

Fresh weight of shoots was determined. Shoots and roots were divided into 2 groups: the first group was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for glutathione, phytochelatin and oxidative stress biomarker measurements, the second group was frozen at -20°C for Ti and Al determinations.

#### ***5. Metal analyses***

Al and Ti concentrations in roots were determined. After drying at 105°C and mineralization in HF-HClO<sub>4</sub>, metal concentrations in tissues were measured by ICP-MS.

## ***6. Element location in plants***

In order to localize the metal (Ti) in the plant tissues, X-Ray Fluorescence microspectroscopy ( $\mu$ -XRF) analysis was performed on secondary roots exposed to 50 mg ATN/L, fixed in Carnoy solution and kept at +4°C in 70% ethanol. To distinguish between Ti trapped in the mucilage from Ti included in the root tissues, the remaining mucilage was removed from certain roots following the protocol of Brams (1969) after slight adaptation. Roots conserved in 70% ethanol were rinsed 10 min in ultrapure water, and then immersed in 1M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (pH 4.15) for 10 min. After that, they were rinsed 2x10 min in ultrapure water before being put back in 70% ethanol.

Resulting “with mucilage” and “without mucilage” roots were then embedded in resin and cross sections were obtained with a diamond wire saw.  $\mu$ -XRF measurements were carried out at the lab-scale on a microscope (XGT<sup>7000</sup>, Horiba Jobin Yvon) equipped with an X-ray guide tube producing a finely focused beam with a 10  $\mu\text{m}$  spot size (Rh X-ray tube, accelerating voltage of 30 kV, current of 1 mA).

## ***7. Biochemical analyses***

Activities of superoxide dismutase (SOD, EC 1.15.1.1), catalase (CAT, EC 1.11.1.6), guaiacol peroxidase (GPX, EC 1.11.1.7), ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) and glutathione reductase (GR, EC 1.6.4.2) were measured according to Dazy et al. (2008).

Lipid peroxidation was evaluated by the thiobarbituric assay of Aravind and Prasad (2003). Briefly, 900  $\mu\text{L}$  of a 0.5% TBA in 20% TCA (w/v) solution were added to 100  $\mu\text{L}$  of plant extract. The mixture was incubated at 95°C for 30 min and the reaction was stopped by transferring tubes on ice. The non-specific absorbance at 600 nm was subtracted from the 532 nm absorbance and  $\epsilon = 155 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$  was used for the calculation of malondialdehyde (MDA) level.

Phytochelatin (PC) 2, 3, 4, 5 and glutathione contents in plant extracts were measured by HPLC according to the derivatization method of Courbot et al. (2004). PC standards were commercially provided (Anaspec, San Jose, USA). Protein contents were determined according to Bradford (1976) using bovine serum albumin as a standard.

### ***8. Micronucleus frequency***

The excised root tips were hydrolyzed in 1 N HCl at 60°C for 6 min, squashed between a slide and its coverslip and stained with 1% aceto-orcein solution. Micronucleus frequencies were scored from 1,000 cells per root tip under a 400x microscope magnification. Two slides were prepared for each of the 4 replicates and a total of 8,000 mitotic cells from 8 separate slides per experimental group were observed under blindfold conditions.

### ***9. Statistical analyses***

Before comparisons were run, care was taken to check for normality of variable distributions (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variances (Levene test). A One-way ANOVA was performed between ATN exposed samples and negative controls, followed by Dunnett's t-test, risk level 5 %.

Student t-test was performed between negative controls and MH or CdCl<sub>2</sub> treated plants. Root metal concentrations showed no homoscedasticity, that is why a logarithmic transformation was performed before testing. Data were analysed using Statistica 7.0 software (StatSoft).

## **Results and Discussion**

### ***1. ATN physico-chemical properties***

Al and Ti concentrations in 100 mg/L ATN mother suspension were respectively 3.44 and 52.29 ppm (+/-5%), as determined by ICP-AES after acid digestion. These concentrations correspond to 1.09 mmol/L +/- 0.055 of Ti and 0.127 +/- 0.006 mmol/L of Al.

Physico-chemical properties of ATN were detailed by Labille et al. (2010) and Auffan et al. (2010). These authors display that the original nanocomposites are not completely degraded: the PDMS outer coating is significantly altered and desorbed, leaving aluminium hydroxide at the surface of the TiO<sub>2</sub> nanoparticles constituting the ATN. Moreover, no dissolved aluminium is detectable in solution. Labille et al. (2010) show that the ATN are constituted of aggregates characterized by a size larger than 100 nm

and an isoelectric point around 7.3 typical for Al(OH)<sub>3</sub> surface coating. These properties confer to the residues a weakly positive surface charge at environmental pH and a tendency to aggregate in most common surface waters.

Our results were in accordance with their observations: during the first 5 hours after dilution (25 mg ATN/L), ATN tended to form aggregates larger than 10 µm in size. The volume fraction of particles over 10 µm increased from 17 to 88%, while the volume fraction of particles below 700 nm decreased from 14 to 3% (figure 35). We can also see that the relative turbidity of the suspension dramatically decreased when ATN concentration increased (Table V). ATN size and turbidity measurements showed therefore that ATN suspensions aggregated very rapidly, and the higher ATN concentration was, the more rapidly aggregation and sedimentation occurred.

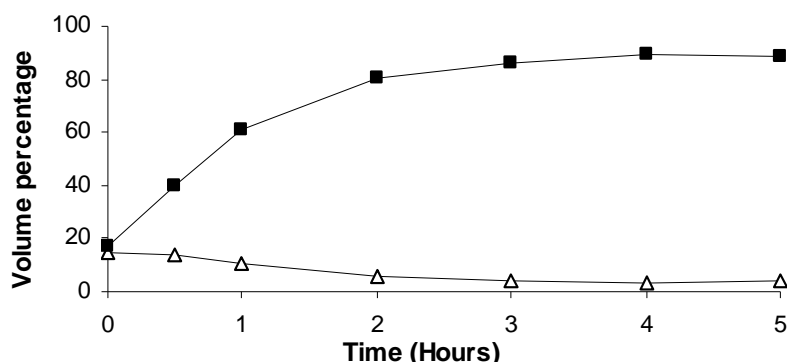


Figure 35 : Time evolution of particles size in the 5 first hours after dilution of ATN mother suspension to 25 mg ATN/L in the mixture of ultrapure and mineral waters (50:50, v:v). White triangles: particles below 700 nm; Black squares: particles over 10 µm.

Table V: Supernatant relative turbidity according to ATN concentration after 24 h settling following dilution of ATN mother suspension to 25 mg ATN/L in the mixture of ultrapure and mineral waters (50:50, v:v).

ATN (mg/L)	Relative turbidity
5	35.39
25	16.47
50	3.73



This tendency of ATN to self aggregation is certainly due to a pH close to the isoelectric point of the ATN, favouring screening of the interparticle electrostatic repulsions. Concerning ionic strength, Labille et al. (2010) find a critical coagulation concentration for ATN suspension of 20 mM NaCl or 8 mM MgCl<sub>2</sub>. Nevertheless, according to these authors, a slow coagulation is initiated by 5 mM NaCl or 2 mM MgCl<sub>2</sub>, corresponding to ionic strengths of 5 and 6 mM, respectively. In comparison, our exposure matrix bore an ionic strength of 4.8 mM. Hence, to our sense, ionic strength played a minor role in ATN aggregation.

Besides, the kinetics of this aggregation mechanism is also determined by the ATN concentration, which controls their collision frequency, favouring faster aggregation and sedimentation at higher concentration. This effect is evidenced by the supernatant turbidities reported in Table V as a function of the ATN concentration. The turbidity after 24h settling indeed decreases when the particle number increases. This implies different potential exposure routes and/or bioaccessibilities of the ATN according to their concentration. However turbidity measurements gave direct evidence of colloids remaining in suspension.

Another factor is that root exudates could also have exerted an action on ATN physico-chemical properties, probably accelerating ATN aggregation.

## ***2. Ti and Al contents in tissues***

Titanium and aluminium concentrations in plant roots are represented in figure 36. Titanium concentrations were highly significantly different from controls whatever ATN concentration. Aluminium concentrations were significantly different only for 25 and 50 mg ATN /L. A strong positive linear correlation exists between Ti ( $r = 0.9661$ ,  $p < 0.001$ ) or Al ( $r = 0.6707$ ,  $p = 0.004$ ) concentrations in the ATN suspension and their respective concentrations in plant roots. Figure 37 shows that whatever ATN concentration, every individual contained a Ti/Al ratio smaller than the one existing in the exposure suspension. This implies that Al was internalised in a relatively larger extent than Ti into plant roots. This may be due to the higher dissolution constant of Al(OH)<sub>3</sub> coating compared to TiO<sub>2</sub> core in the ATN, which favoured more soluble and bioavailable Al species.

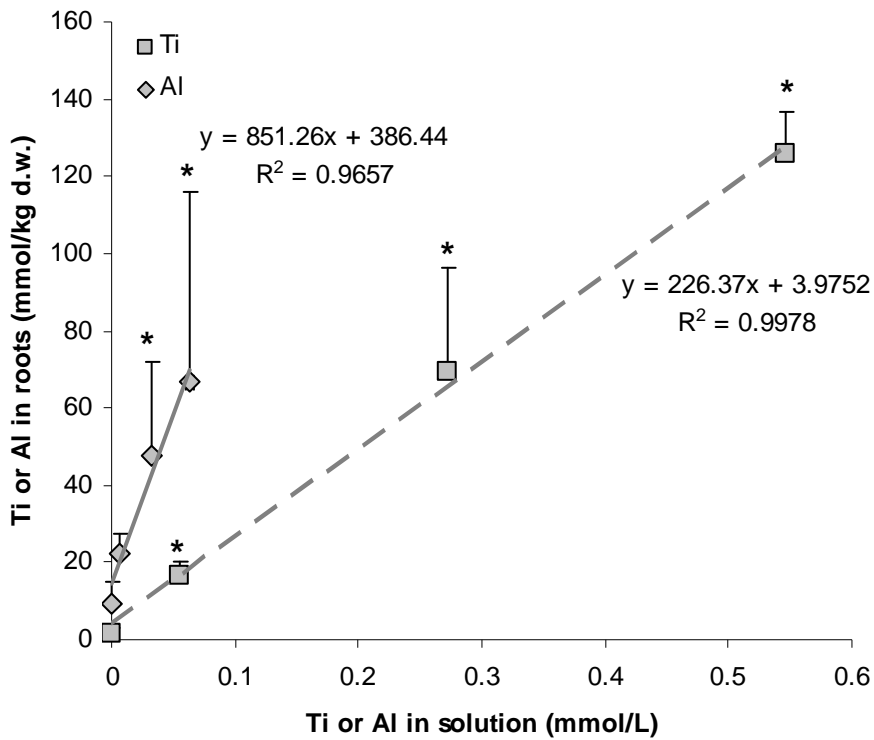


Figure 36: Ti or Al concentrations in *V. faba* secondary roots after 48h exposure with respect to their concentrations in exposure suspensions. \* Statistically significantly different from corresponding controls after logarithmic transformation, Dunnett's t-test,  $p < 0.05$ .

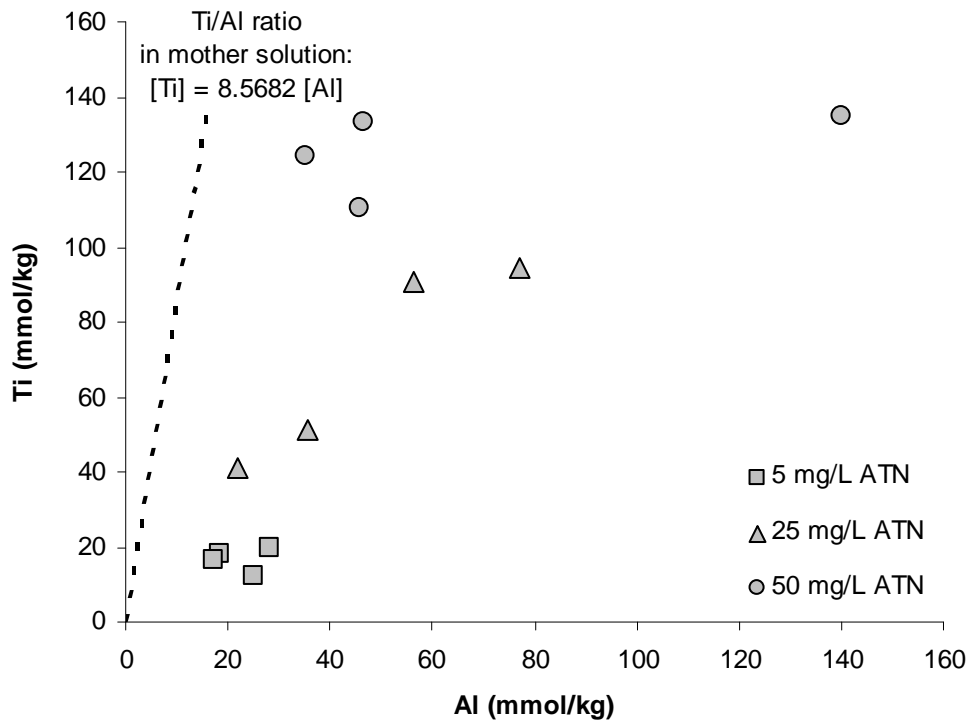


Figure 37: relationship between Ti and Al in *Vicia faba* secondary roots after 48h exposure to different ATN concentrations. Dotted line: Ti/Al ratio in exposure suspension.

Figure 38a shows the spatial distribution of Ti along an entire root exposed to 50 mg ATN/L. Since the X-ray beam penetrates through the sample, Ti retention at the root surface (probably in the mucilage) or Ti included in the root tissues cannot be discriminated. Nevertheless, the chemical images of cross sections show high Ti concentrations, particularly in root periphery (figure 38b.) Moreover Ti seems to have been internalized in the peripheral tissues, at least in the 100 outermost micrometers of the root tissues (figure 38c). But it is difficult, from these chemical images, to precisely identify the interface between the mucilage and the root tissues: an additional treatment was performed on the roots in order to totally remove the mucilage.  $\mu$ -XRF mapping of this treated root (cross section) revealed the remaining presence of Ti (figure 38d). From these results, partial Ti penetration in root tissues can be validated.

We just showed through  $\mu$ -XRF analysis performed on roots exposed to 50 mg ATN/L that high titanium concentrations existed in root peripheral tissues. Yet, ATN particles, principally under the form of aggregates over 10  $\mu$ m, were not likely to penetrate into the roots. In fact, nanoparticles with a diameter greater than 6 or 7 nm have few chances to pass through the cell wall pores (Andrew et al. 1997; Asli and Neumann 2009; Baron-Epel et al. 1988; Carpita et al. 1979; Proseus and Boyer 2005). *Vicia faba* root cell wall pores have an average diameter of 10-14 nm that can reach 20 nm (Hylmö 1955; Hylmö 1958). Such coating could result from the adsorption of the ATN onto the external tissues of the root and/or their trapping by mucilage. This phenomenon could reasonably be expected considering the opposite surface charges of ATN (+) (Labille et al. 2010) and cell walls (-) at pH = 6.5, enabling electrostatic attractions. Such root “clogging” was already supposed by Asli and Neumann (2009) on maize primary roots exposed to 30 nm TiO<sub>2</sub> nanoparticles colloidal suspension. This coating could explain the huge titanium concentrations we observed in *V. faba* roots (Figure 36). It also could increase the smallest ATN particles intake by endocytosis *via* root hair (Ovečka et al. 2005).

Note. Major elements (P, S, Ca and K) were also detected by  $\mu$ -XRF and images of their spatial distribution were obtained. Aluminium mapping was not possible because of the low  $\mu$ -XRF sensitivity for light element detection

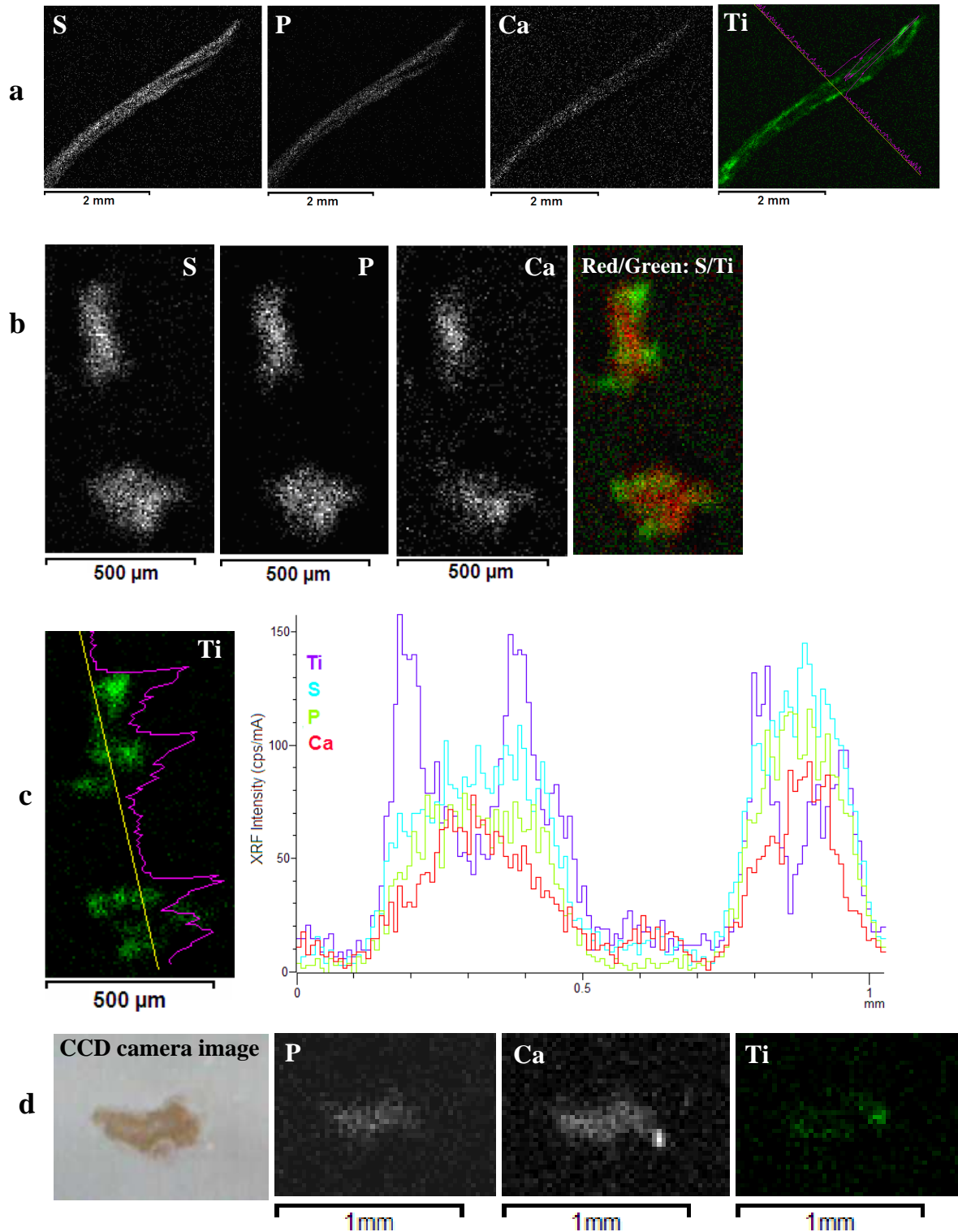
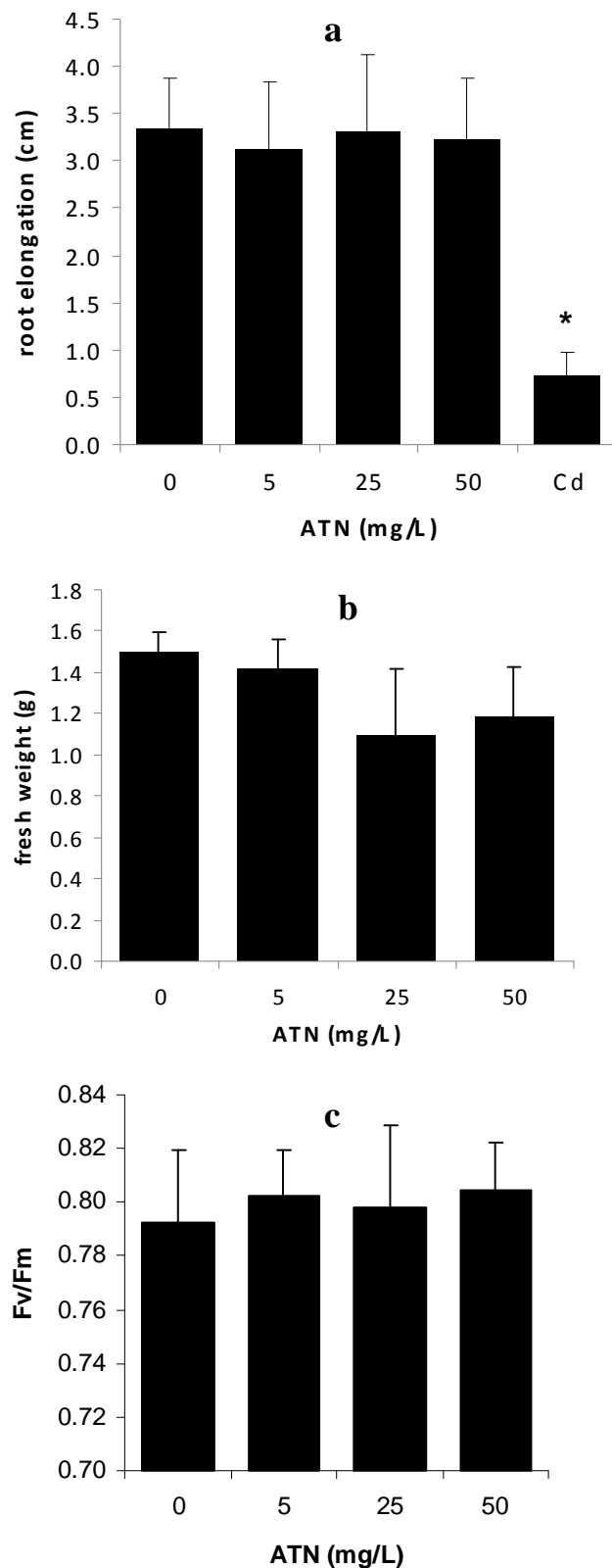


Figure 38:  $\mu$ -XRF analyses of roots after 48H exposure to 50 mg ATN/L. (a) S, P, Ca and Ti distribution in entire root (total counting time of  $15 \times 600$  s,  $512 \text{ px}^2$ ,  $1 \text{ px} = 8 \text{ }\mu\text{m}$ ). (b) S, P, Ca and combined image distribution in two cross sections (total counting time of  $15 \times 600$  s,  $256 \text{ px}^2$ ,  $1 \text{ px} = 4 \text{ }\mu\text{m}$ ) and S/Ti combined image. (c) Integration curves (following the yellow line) of titanium (dark blue), sulphur (light blue), phosphorus (green) and calcium (red). (d) P, Ca and Ti distribution in cross section of the treated root (mucilage removed) (total counting time of  $20 \times 600$  s,  $512 \text{ px}^2$ ,  $1 \text{ px} = 10 \text{ }\mu\text{m}$ ). S was not detected.

## ***2. Biological effects of ATN on the plants***

Both rutile and anatase nano-TiO<sub>2</sub> (4-6 nm diameter) can promote growth in spinach (Gao et al. 2008; Ma et al. 2010; Yang et al. 2006; Zheng et al. 2005). Nevertheless, in our study using nano-rutile, root elongation was not changed by ATN (figure 39a), and shoot biomass showed a slight tendency to decrease for 25 and 50 mg/L ATN (figure 39b). Besides, nano-anatase with 4-6 nm diameter have been proven to increase photosystem II efficiency in spinach after spraying on the leaves (Su et al. 2007; Zheng et al. 2007a). In that case, nanoparticles were shown to have been internalized in the chloroplast and bound to photosystem II (Zheng et al. 2007b). Once again, in our work, Fv/Fm ratio did not change under ATN exposure (figure 39c).

Shoot MDA levels and antioxidant enzyme activities were not modified following exposure to ATN comparatively to control group. In Cd-exposed plants similar results were obtained (table VI). Thiol concentrations in shoots were neither modified by ATN nor by Cd (data not shown). In roots, lipid peroxidation, MDA levels significantly increased in Cd-exposed individuals but not in ATN-exposed individuals (table VII). CAT, SOD and GPX enzymes responded similarly to MDA levels (table VII). On the contrary, GR enzyme and total proteins decreased in Cd-exposed roots. In ATN-exposed plants, GR activity decreased significantly at 50 mg ATN/L (ANOVA  $p = 0.0037$ ). Nevertheless, APX activity significantly decreased (ANOVA  $p = 0.0433$ ) only for 5 and 25 mg ATN/L. In other studies, anatase and rutile nano-TiO<sub>2</sub> enhanced superoxide dismutase, catalase and peroxidase activities and decreased malonedialdehyde in chloroplasts exposed to UV (Hong et al. 2005a; Zheng et al. 2008). To the contrary, our study showed that in shoots, none of oxidative stress biomarker was affected by ATN. Even when exposed to Cd, anti-oxidative stress biomarkers in shoots remained unchanged, suggesting a limited transfer from the root tissue. In roots exposed to ATN, none of these biomarkers was either increased, but roots remained hidden from light during exposure and, to our knowledge, no element in the literature deal with a similar case.



**Figure 39:** (a): Secondary root elongation (mean  $\pm$  SD) in *V. faba* exposed for 48h to ATN (3x4 individuals). (b): Shoot fresh weight (4 individuals, mean  $\pm$  SD). (c): Fv/Fm ratio in leaves (4 individuals, mean  $\pm$  SD). Differences are not statistically significant (ANOVA,  $p < 0.05$ ) except for positive control Cd. (\* Student t-test,  $p < 0.05$ ).

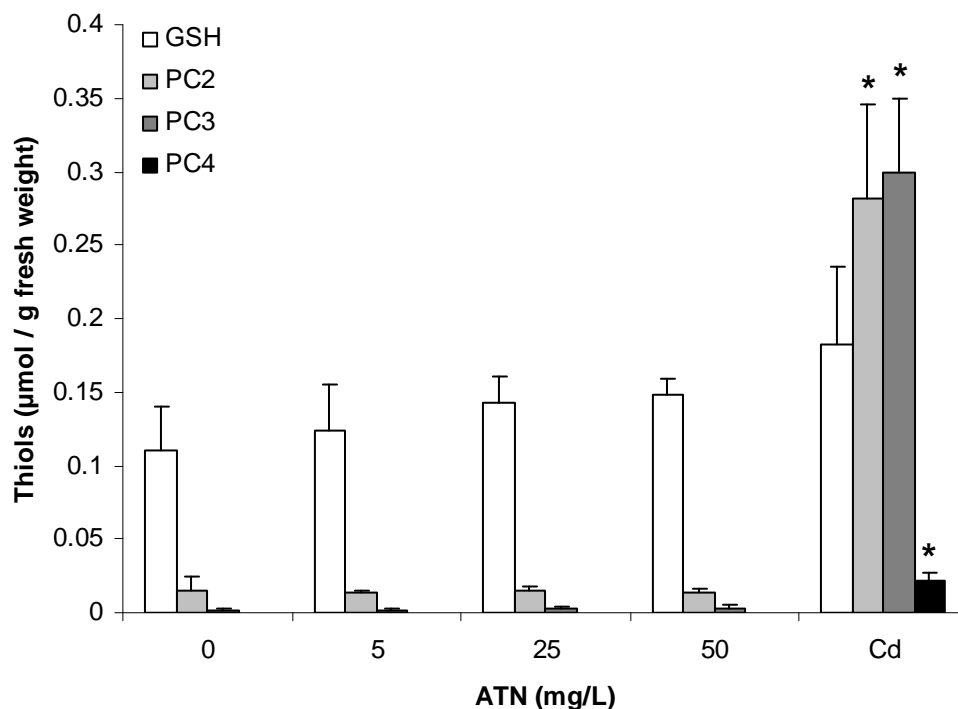
**Table VI: Malonedialdehyde and oxidative stress enzymes activities in shoot tissues of *Vicia faba* plantlets after 48h exposure to ATN (mean +/- SD). SOD units are U/g fw, where 1 U stands for the activity that inhibits nitro blue tetrazolium photoreduction by 50% compared with tubes lacking enzyme extract. No statistically significant difference from controls, ANOVA,  $p < 0.05$ . Cadmium treated plants not statistically significantly different from controls, Student t-test,  $p < 0.05$**

		Control	5 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	CdCl <sub>2</sub>
MDA	$\times 10^{-3}$ (mol/g fw)	4.93 +/- 2.02	4.69 +/- 0.84	5.56 +/- 2.07	4.65 +/- 1.29	5.69 +/- 1.21
CAT	$\times 10^{-4}$ (mol/min/g fw)	8.40 +/- 3.48	2.49 +/- 1.37	4.74 +/- 5.48	4.38 +/- 2.82	7.48 +/- 4.66
SOD	(U/g fw)	27.00 +/- 7.87	16.17 +/- 2.32	20.80 +/- 9.33	17.39 +/- 4.16	29.86 +/- 13.72
GR	$\times 10^{-5}$ (mol/min/g fw)	3.60 +/- 1.09	2.61 +/- 0.38	2.93 +/- 0.57	3.09 +/- 0.53	2.76 +/- 0.71
GPX	$\times 10^{-5}$ (mol/min/g fw)	0.915 +/- 0.176	0.884 +/- 0.157	0.928 +/- 0.205	0.848 +/- 0.120	1.024 +/- 0.310
APX	$\times 10^{-5}$ (mol/min/g fw)	3.90 +/- 1.97	2.72 +/- 0.45	3.46 +/- 0.96	4.23 +/- 0.00	3.59 +/- 0.86
Proteins	(mol/g fw)	1.89 +/- 0.78	2.74 +/- 0.43	2.00 +/- 1.16	2.57 +/- 0.59	1.93 +/- 0.79

**Table VII: Malonedialdehyde and oxidative stress enzyme activities in root tissues of *Vicia faba* plantlets after 48h exposure to ATN (mean +/- SD). SOD units are U/g fw, where 1 U stands for the activity that inhibits nitro blue tetrazolium photoreduction by 50% compared with tubes lacking enzyme extract. \*: statistically significantly different from controls, ANOVA followed by Dunnett's t-test,  $p < 0.05$ . # Cadmium treated plants statistically significantly different from controls, Student t-test,  $p < 0.05$**

		Control	5 mg/L	25 mg/L	50 mg/L	CdCl <sub>2</sub>
MDA	$\times 10^{-3}$ (mol/g fw)	2.26 +/- 0.27	2.41 +/- 1.82	3.39 +/- 1.32	2.85 +/- 0.51	5.50 +/- 1.55 #
CAT	$\times 10^{-7}$ (mol/min/g fw)	3.56 +/- 0.94	3.11 +/- 0.53	3.44 +/- 0.95	3.77 +/- 0.49	5.81 +/- 1.07 #
SOD	(U/g fw)	13.83 +/- 2.57	12.84 +/- 2.73	15.47 +/- 6.74	13.44 +/- 2.58	34.38 +/- 13.91 #
GR	$\times 10^{-5}$ (mol/min/g fw)	1.177 +/- 0.131	1.157 +/- 0.131	0.846 +/- 0.476	0.243 +/- 0.424 *	0.674 +/- 0.303 #
GPX	$\times 10^{-5}$ (mol/min/g fw)	1.717 +/- 0.125	1.748 +/- 0.227	1.681 +/- 0.561	1.787 +/- 0.229	3.053 +/- 0.415 #
APX	$\times 10^{-5}$ (mol/min/g fw)	5.388 +/- 0.868	3.711 +/- 0.517 *	3.689 +/- 0.315 *	4.062 +/- 1.294	7.741 +/- 3.704
Proteins	(mol/g fw)	0.729 +/- 0.166	0.606 +/- 0.225	0.539 +/- 0.265	0.547 +/- 0.200	0.340 +/- 0.120 #

Total GSH in roots was not affected in ATN-treated individuals (figure 40). GSH/GSSG ratio remained constant (data not shown). PC2, PC3 and PC4 synthesis was stimulated in Cd-treated roots but not in ATN-treated ones.

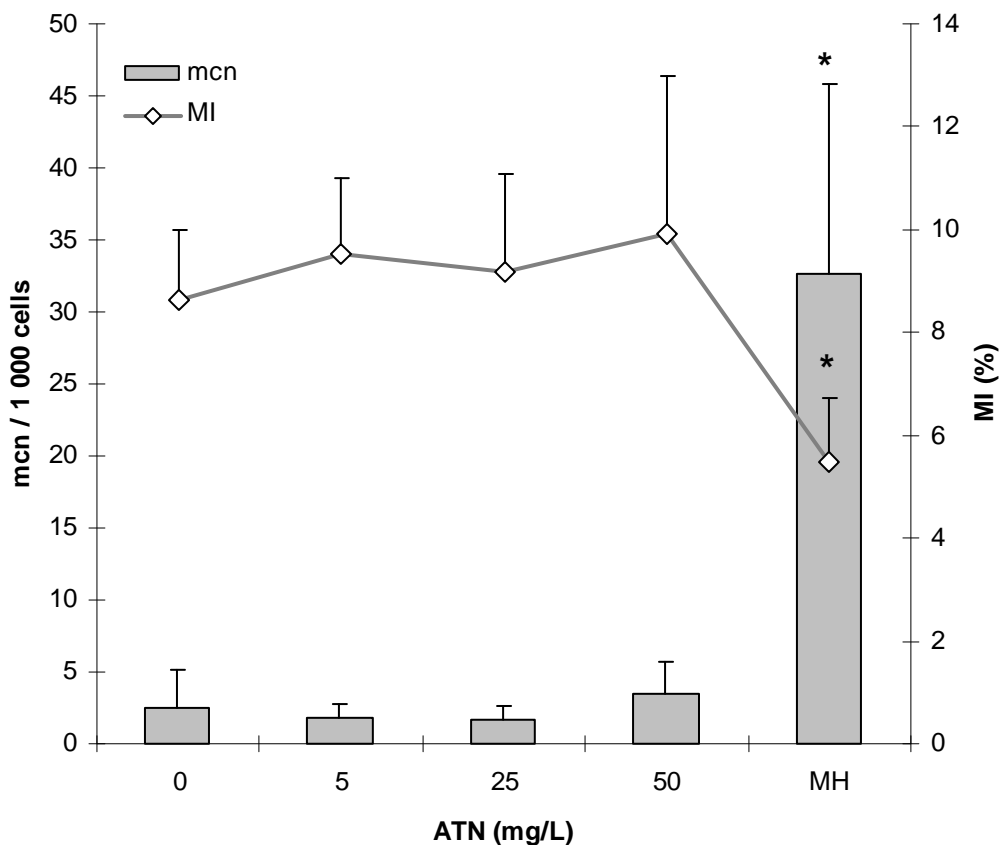


**Figure 40: Thiol concentrations (GSH and PCs, mean  $\pm$  SD) in roots of *V. faba* exposed 48h to ATN (4 individuals). Differences between ATN treated and control individuals are not statistically significant, ANOVA,  $p < 0.05$ . Cd: reference metal. \* Statistically significant from controls (Student t-test,  $p < 0.05$ ).**

Not surprisingly, positive control (MH) induced a 13-fold increase of micronucleus frequency and a decrease of mitotic index (8.6 and 5.5% in negative and positive controls respectively). Exposure of *Vicia faba* roots to ATN did not lead to any genotoxicity (Figure 41). Cell division, assessed by mitotic index, was not modified too.

In the literature, photogenotoxicity of nano-TiO<sub>2</sub> was proven (Nakagawa et al. 1997), but in *Allium cepa*, no genotoxicity was found after exposure to nano-TiO<sub>2</sub>. Only the mitotic index was modified in root meristems (Klančnik et al. 2011).





**Figure 41:** Micronucleus frequency and mitotic index (mean  $\pm$  SD) in *V. faba* roots exposed 48h to ATN (2 x 4 individuals). Differences between ATN treated and control individuals are not statistically significant, ANOVA,  $p < 0.05$ . MH: positive control. \* statistically significantly different from controls (Student t-test,  $p < 0.05$ ).

Comparing effects in plants of bare  $\text{TiO}_2$  nanoparticles with the effects of altered nano-composites observed in this study leads us to suggest that no or very few bare nanoparticles were released from ATN during our experiment. To summarize, no biomarker was significantly modified by ATN in shoots, and only few ones in roots. Moreover, neither genotoxicity nor phytochelatin synthesis was seen in roots. Despite a high quantity of aluminium and titanium oxides in roots, the quasi-absence of neither effects nor defence reaction noticed in plants would be in accordance with the hypothesis according to which the metals internalized in the roots were still under a biologically inert form. Nevertheless, since Ti/Al ratio was always lower in tissues than in exposure suspension (Figure 37), we can think that ATN structures presented by Auffan et al. (2010) and Labille et al. (2010) were not under unchanged form in tissues, since aluminium seemed to have been partly solubilized.

Ti and Al metals remained in the root peripheral tissues (cortical parenchyma, figure 38c). We can suppose that metals found in root tissues represent a very small proportion of ATN, but

our results did not indicate whether ATN particles were effectively internalized in root cells. Perhaps they only stayed in intercellular matrix. The small part of ATN internalized in root tissues plus the high quantity of ATN agglomerated on the root surface could have exerted a mechanic action, for example by blocking cell connections or cell wall pores (Asli and Neumann 2009; Ma et al. 2010), which could explain the slight decrease of shoot biomass for 25 and 50 mg/L ATN and the decrease of GR and APX activities in roots.

## Conclusion

To our knowledge, this work is the first published study related to the effects of altered commercial sunscreen nanocomposites in plants. Metal concentrations were detected in the roots exposed to ATN, and titanium internalization was even observed in the root tissues. However no biological effect was observed as opposed to results from the literature obtained on bare nano-TiO<sub>2</sub>. Therefore, for TiO<sub>2</sub> nanoparticles risk assessment, this study showed that apparently, no bare nanoparticle was released from commercial nanocomposite, which indicate that the behaviour of the nanoparticles is strongly affected by their surface modifications. Our results were obtained for exposure concentrations fortunately far above the expected concentrations of such materials in wastewaters or surface waters. Moreover, it is noteworthy to specify that in waters with pH upper than 7.3, ATN will hold a negative charge (Labille et al. 2010), leading electronic repulsiveness with cells and possibly reducing the clogging phenomenon. Other phenomena like organic-matter adsorption could also lead to the creation of negatively charged particles playing a role in the clogging.

Therefore, sunscreen nanocomposites seem not to exert deleterious effects on our plant model in 48h, but the observed important clogging onto the roots and above all, titanium inclusion in root tissues are worrying phenomena. A deep improvement of knowledge about long-term effects of such manufactured nanocomposites towards living organisms is seriously needed.

## Acknowledgements

The authors thank the French National Program NANOALTER (INSU/EC2CO/CYTRIX), the French Agency for the Environment and Energy Management (ADEME, Paris, France) and Region Lorraine for financial support.

## 5 Pertinence du test des micronoyaux : devenir à long terme des plantes

Il est communément admis que les micronoyaux sont des lésions graves et irréversibles du génome cellulaire, sauf dans certains rares cas où ils serviraient à éliminer le matériel génétique en trop suite à une polyploïdisation accidentelle, ou éventuellement dans le cas rarissime où le matériel génétique du micronoyau pourrait être réintégré dans le noyau cellulaire.

Or, nous avons montré (§ 1.2.1, 1.3.2.2, 1.3.2.3 et 5.2) qu'une augmentation significative du nombre de micronoyaux n'était pas toujours accompagnée d'une diminution de l'élongation racinaire. La plante peut donc en théorie connaître une croissance quasi-normale alors que son génome subit de graves dommages.

Nous n'avons pas trouvé d'étude portant sur le devenir d'une racine entière exposée à un agent provoquant la formation de micronoyaux, mais en toute logique, lorsque des micronoyaux sont observés dans les cellules-filles des méristèmes, cela signifie que les cellules méristématiques elles-mêmes sont également affectées, puisque lors de la division de ces cellules, l'une des cellules-filles garde les propriétés des cellules embryonnaires et continue à se diviser tandis que l'autre se différencie (Hock and Elstner 2005). Nous avons également constaté qu'une cellule portant un micronoyau peut continuer à se diviser. Nous avons donc de bonnes raisons de penser que les dommages causés au génome des méristèmes persistent longtemps même en l'absence de nouvelles lésions.

Pourtant, il a été constaté que la fréquence de micronoyaux diminue sensiblement lorsque la durée d'exposition augmente (Marcato-Romain et al. 2009). Sur *Allium cepa*, le nombre de micronoyaux après 3h d'exposition à l'HM (5 mM) atteint un maximum après 30h de récupération mais diminue ensuite sensiblement à 36, 42 et 48h de récupération (Panda et al. 1997).

Nous pouvons donc légitimement nous demander si une plante dont les cellules ont subi des atteintes génotoxiques résultant en l'apparition de micronoyaux peut connaître par la suite un cycle de vie normal, sachant que ces micronoyaux semblent disparaître au bout de quelques

jours. Les dommages génotoxiques réflétés par une fréquence anormalement élevée de micronoyaux au cours d'un test sur un sol donné présagent-ils d'une mortalité, morbidité ou perturbation du cycle de vie (croissance, floraison, fructification...) d'une plante poussant naturellement sur le sol en question ?

Afin de connaître la réelle valeur prédictive d'un test micronoyaux conduit en milieu solide d'après le protocole 48h, nous avons exposé des fèves à trois agents génotoxiques différents depuis leur germination et pendant tout leur cycle de vie.

La première expérience à long terme portant sur  $\text{CdCl}_2$  est décrite dans la publication présentée dans le paragraphe suivant. Nous avons également réalisé le même type d'expérimentation avec l'HM et  $\text{CuSO}_4$ , décrite au § 5.2.

### **5.1 Cadmium**

Le premier toxique testé pour connaître les effets à long terme de l'induction de micronoyaux dans les cellules en division est le cadmium.

Après avoir sélectionné avec le protocole « 5 jours » une concentration de cadmium induisant un maximum de micronoyaux sans affecter la croissance racinaire, nous avons semé dix graines de *Vicia faba* dans un sol contenant cette concentration de cadmium, et nous avons suivi les différentes phases du cycle de vie « naturel » des plantes : taux de germination, temps d'émergence, croissance, aspect, floraison, fructification, sénescence, durée de vie.



## **Is there a relationship between early genotoxicity and life history traits in *Vicia faba* submitted to cadmium spiked soils?**

Publication acceptée dans *Mutation research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*

Anne-Sophie Foltête, Jean-François Masfaraud, Jean-François Féraud, Sylvie Cotelle

Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE), Université Paul Verlaine-Metz, CNRS UMR 7146, Campus Bridoux, Rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France

### **Abstract**

The *Vicia faba*-micronucleus test is usually performed to assess genotoxic potential of pure substances, effluents or soil water extracts. It is also a relevant early biological tool to detect mutagenic substances in crude soils. Nevertheless, the physiological meaning of such DNA damage for the plant in the long term remains to be elucidated. To know more about it, two experiments were carried out with the plant model *Vicia faba*. In a preliminary short-term experiment, seeds were exposed for 5 days to a soil spiked with different concentrations of CdCl<sub>2</sub> in order to identify the concentration inducing the highest number of micronuclei without affecting plant growth. Thereafter, a long term experiment was performed in the soil spiked with such a concentration (i.e. 510 µmol CdCl<sub>2</sub> per kg dry soil), in which *V. faba* seeds were directly sowed and allowed to grow during 151 days. As a result, Cd-spiked soil did not affect seed emergence time nor plant growth rate for the first two months. First signs of toxicity appeared after the 70<sup>th</sup> day of exposure. Interestingly, exposed plants produced the first flower earlier and had a longer flowering period than control ones. Nevertheless, total flower production was less abundant in exposed plants than in control plants. Moreover, fruits appeared in control plants whereas no fruit was formed in exposed plants. At last, exposed plants showed a reduced life time.

Our results suggest that micronucleus assay can be a predictive biomarker of long-term deleterious effects in plants.

**Keywords:** higher plant; micronucleus; chronic exposure-effects; soil toxicity assessment; predictive biomarker; plant assay

## Introduction

Soil ecotoxicity assessment is currently an important challenge in our society. Indeed, solid matrix management (industrial wastelands, incinerator bottom ashes...) requires precise ecotoxicity determination. To get an idea of this ecotoxicity, physico-chemical analyses are not sufficient, and biological assays are necessary to avoid over- or underestimation of the risk (Vasseur et al. 2008). Classical higher plant endpoints like germination and growth have received considerable attention and have frequently been used for soil ecotoxicity tests. In his review, Wang (1991) considers that higher plant tests (particularly root elongation) show good validity, sensitivity and reproducibility and are therefore useful for contaminated soil assessment. However, micronucleus frequency and oxidative stress biomarkers can be much more sensitive than classical endpoints, particularly in the case of metallic intoxications, but not only (Cordova Rosa et al. 2003; da Rosa Corrêa et al. 2006; Dorn et al. 1998). Moreover, *Vicia faba* micronucleus test has proven to be a relevant biological tool to detect genotoxic substances in soils (Cotelle et al. 1999; Degrassi and Rizzoni 1982; Ma et al. 1997; Ma et al. 1995).

In the cases where micronucleus induction is more sensitive than classical endpoints and allows to detect effects at sublethal concentrations, a genotoxic concentration range fatally exists that induces micronuclei without any significant change in the aspect of the plant or in classical endpoints (i.e. germination rate or time, root elongation). Thus the plant would theoretically develop “normally” in appearance.

Since micronuclei are most often considered as irreversible DNA damage, which in most cases lead to cell death (Fernandes et al. 2007), we wondered whether some physiological impairments and subsequent life history trait modifications could be expected in plants exposed to genotoxicants.

To answer this question, we studied different endpoints and life history traits in *Vicia faba* following long term exposure to cadmium. Cadmium indeed causes oxidative stress and thus provokes DNA damages like chromosomal aberrations, sister chromatid exchanges and micronuclei (Borboa and De La Torre 1996; Fusconi et al. 2006; Gómez-Arroyo et al. 2001; Szöllösi et al. 2009; Ünyayar et al. 2006; Zhang et al. 2009). Seed germination rate and emergence time were determined, and life history traits like growth, flowering and fruit production were monitored throughout plant life.

## Materials and methods

### *1. Short term micronucleus test (5 days)*

Standard soil LUFA 3A (Speyer, Germany; see characteristics in table VIII) was used for cadmium exposure experiments. A solution of 26 mM cadmium dichloride  $\text{CdCl}_2$  was prepared in deionised water and different volumes were mixed into standard soil to obtain the following concentrations: 450, 510, 625  $\mu\text{mol CdCl}_2$  or Cd per kg dry soil. Deionised water was used to complete to 85% of water holding capacity.

The micronucleus test was performed essentially as described by Cotelle et al. (1999) and AFNOR NF T90-327 (2004) with modifications to allow a solid phase exposure. *Vicia faba* seeds (Aguadulce variety, commercially provided) were stored at 4°C in dry conditions until use. Seeds were soaked overnight in distilled water and then allowed to germinate between two moistened, vertically positioned cotton pieces for 3 days at room temperature. After removing the primary root tips to promote the development of secondary roots, 4 of the obtained primary-rooted seedlings were placed in 400 g of control or cadmium-spiked soil. Deionised water was added every day to maintain the soil moisture at 85% of its water holding capacity. After 5 days, only the 3 largest plantlets were analysed. The length of every secondary root was measured (apart those measuring less than 5 mm). Secondary root tips were rinsed in distilled water, fixed overnight at 4°C in Carnoy solution (25 % acetic acid : 75 % ethanol, v:v) and finally stored in 70 % ethanol at 4 °C until further processing. The excised root tips were rinsed 10 min in distilled water, hydrolyzed in 1N HCl at 60°C for 6 min, squashed between a slide and its coverslip and stained with 1% aceto-orcein. Micronuclei and mitotic cells were scored from 1,000 cells per root tip under a X 400 magnification. Two slides were prepared for each of the 3 replicates and a total of 6,000 mitotic cells from 6 separate slides per experimental group were observed. Mitotic index (MI) is expressed as the number of dividing cells for 100 observed cells.



**Table VIII: General characteristics of the LUFA soil (mean +/- SD).**

<b>Physico-chemical characteristics</b>	
<b>Organic Carbon (%)</b>	2.2 +/- 0.1
<b>pH (0.01 M CaCl<sub>2</sub>)</b>	7.1 +/- 0.3
<b>Cation Exchange Capacity (meq/100g)</b>	19 +/- 5
<b>Particle Sizes According to USDA (%)</b>	
<b>Clay (&lt; 0.002 mm)</b>	17.6 +/- 1.5
<b>Silt (0.002 - 0.05 mm)</b>	39.1 +/- 2.4
<b>Sand (0.05 – 2.0 mm)</b>	47.3 +/- 3.3

## **2. Long term experiment (151 days)**

A water solution of CdCl<sub>2</sub> was mixed to three kg of LUFA 3A soil to obtain a single nominal concentration of 510 µmol CdCl<sub>2</sub> per kg dry soil. Deionised water was added to obtain 85 % soil water holding capacity. For control, equal moisture was obtained with deionised water.

Ten *V. faba* seeds were directly sowed into a pot containing 3 kg spiked or control soil, and placed in a phytotron at 23°C, 50 cm below neon tubes GRO-LUX 36W/120cm, Sylvania, under 16h/8h light/dark photoperiod. The sowing day corresponded to the day 0. During emergence phase, the pots were weighed every day and deionised water was added to keep constant the soil moisture.

Different life-history traits were measured in the plants: time for emergence, growth rate, flowering period extent, number of flowers and of fruits per individual, and survival time. The emergence day of each seed was noted when the young plantlet appeared on the soil surface. After emergence, deionised water was added only once a week by weighing the pots to keep the soil humidity rate to 85%. However, after a few weeks of growth, an equal volume of water was added in exposed and in control pots. The growth of each plant (9 per pot) was assessed every week through the number of lateral buds on the stem. Apical bud was not taken into account. In case of multiple-stemmed plant, the number of buds was the total number of buds on all stems.

After one month of exposure, 100 mL of Hoagland solution (Hoagland and Arnon 1950) was added in each pot every week besides deionised water to supply the soil in mineral ions.

On day 64, after two months of growth in controlled conditions, the three smallest individuals were removed in each pot, to allow a better growth of the remaining ones. Indeed, the limited volume of the soil employed (3kg) did not permit a good development of nine individuals. The pots were then transferred in a greenhouse. Plants grew there during the months of April, May and June 2008 and thus could receive natural stimuli for flowering, such as photoperiod or light spectrum. The growth of the 6 remaining plants was assessed every week until they died.

Flower and fruit production of each plant were noted 1 to 3 times a week. Visible signs of ecotoxicity (chlorosis, necrosis, leaf abscission) were checked throughout the experiment. At the end of the experiment cadmium concentrations were determined on 100 g of soil sampled in the top and in the bottom of the pots (soils were acid digested according to AFNOR NF X 31-147 (1996) before determination by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy).

### ***3. Statistical analysis***

Before multiple comparisons were run (ANOVA and Dunnett's t-test), care was taken to check for normality of variable distributions (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene test). Multiple mean comparisons were assessed by ANOVA and Dunnett's t-test, risk level 1 or 5 %. For micronucleus frequency and mitotic index, which presented a non-normal distribution, Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U test was used.

Plant growth speed was obtained by linear regression on the linear portions of growth curves. For the comparison between control and Cd exposed groups a Student t-test was performed on the regression coefficients (growth speeds, number of buds appeared per day).

For flower frequency comparisons, data were pooled to obtain numbers of flowers at least equal to 5 in each category, and Chi-square test was used.

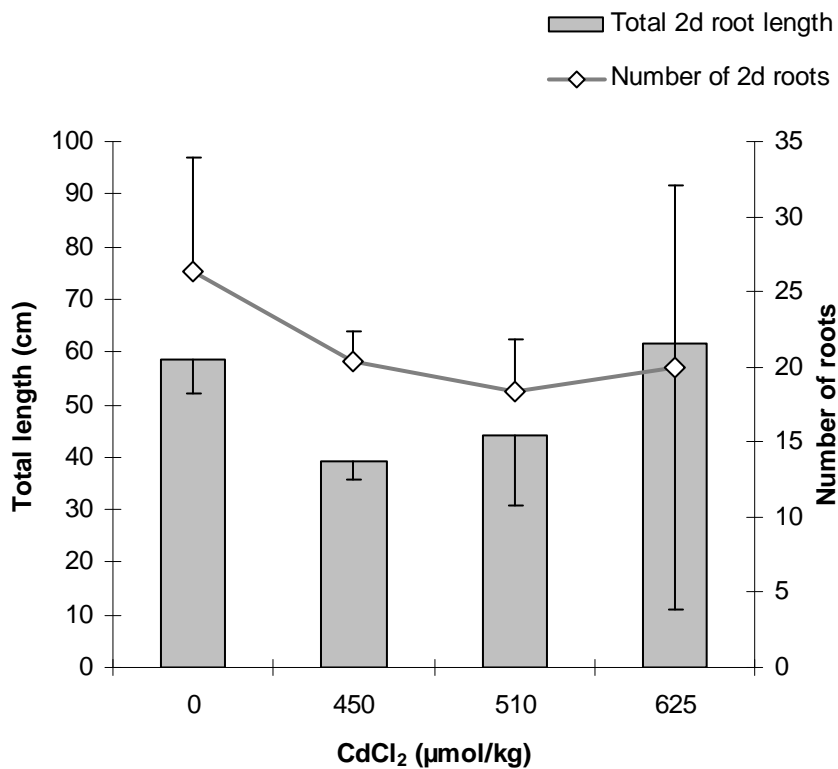
All the data were analysed using StatSoft Statistica 7.0.

## Results

### 1. Short term micronucleus test (5 days)

After 5 days exposure to CdCl<sub>2</sub>, no significant difference was seen in secondary root number or length (fig. 42). For 625 µmol/kg CdCl<sub>2</sub>, we observed that the standard deviation of both endpoints (total root length and number of secondary roots) was very high even if the mean is equivalent to control. For this concentration, inter-individual disparities were indeed very marked.

Despite no significant difference was seen in root number or length, mitotic index significantly decreased in the highest cadmium concentration (fig. 43). As expected, Cd exposure resulted in genotoxic effects which were statistically significant at 450 and 510 µmol/kg, but the number of micronuclei was not different from control for the highest concentration.



**Figure 42:** Total cumulated length of all secondary roots and number of secondary roots in *Vicia faba* after 5 days of exposure to cadmium dichloride (mean +/- SD; n = 3). No statistically significant difference (ANOVA,  $p < 0.05$ ).

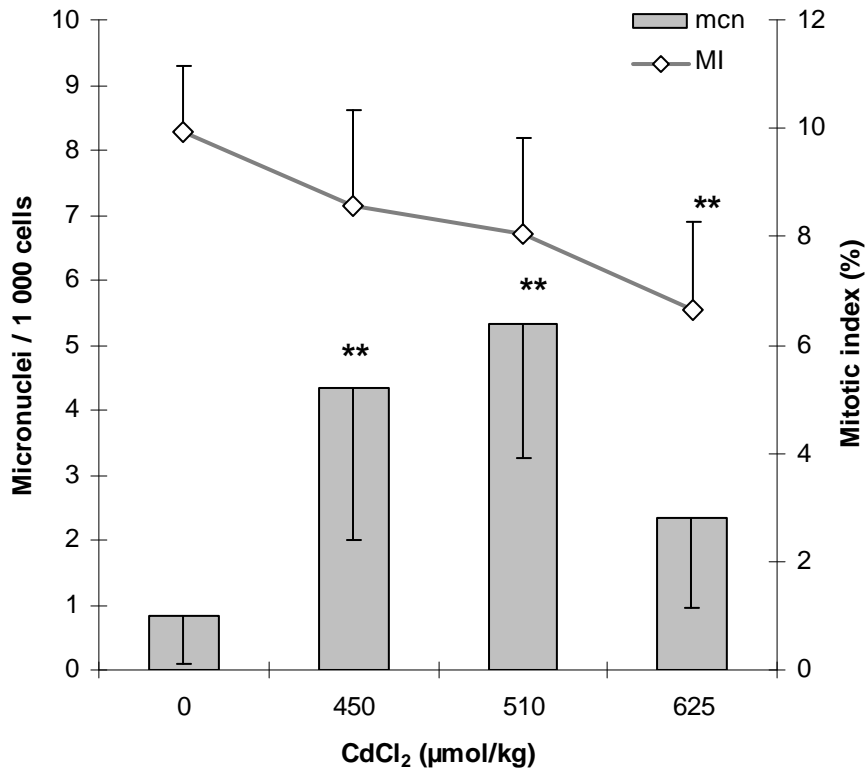


Figure 43: Micronuclei (mcn) and mitotic index (MI) in the secondary roots of *Vicia faba* after 5 days of exposure to cadmium dichloride (mean +/- SD; n = 6).

\*\* Statistically significant from control (Mann-Whitney U test,  $p < 0.01$ ).

## 2. Long term experiment (151 days)

Nine seeds out of 10 germinated in control and in Cd spiked soils, and emergence times were equivalent (means +/- SDs were respectively 7.56 +/- 0.73 days and 7.67 +/- 0.5 days). Plant growth was linear on each period, during the first one in the phytotron and during the second one in the greenhouse: determination coefficient was upper than 0.80 ( $p < 0.05$ ) in each individual. Regression coefficients were not different in the two groups during the first period of growth in the phytotron. Nevertheless, after their transfer to the greenhouse on day 64, control plants grew significantly faster than exposed ones (fig. 44). Until day 106, neither important leaf deformation nor necrosis nor chlorosis was visible in any plant.

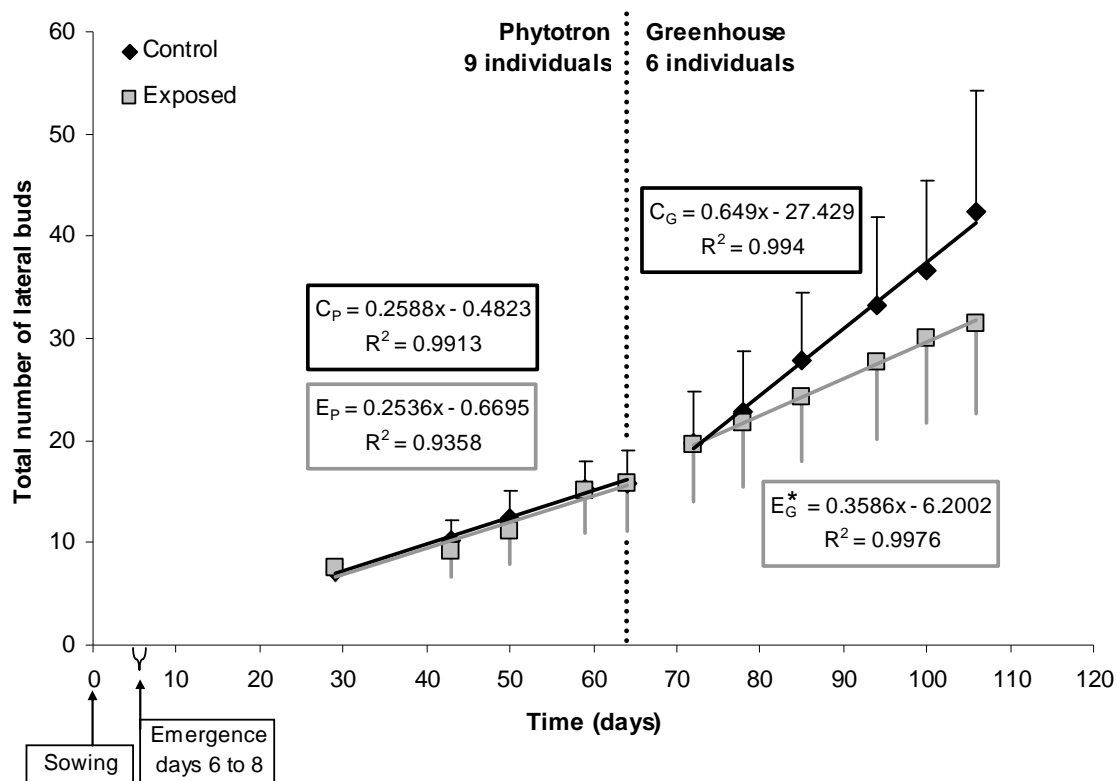
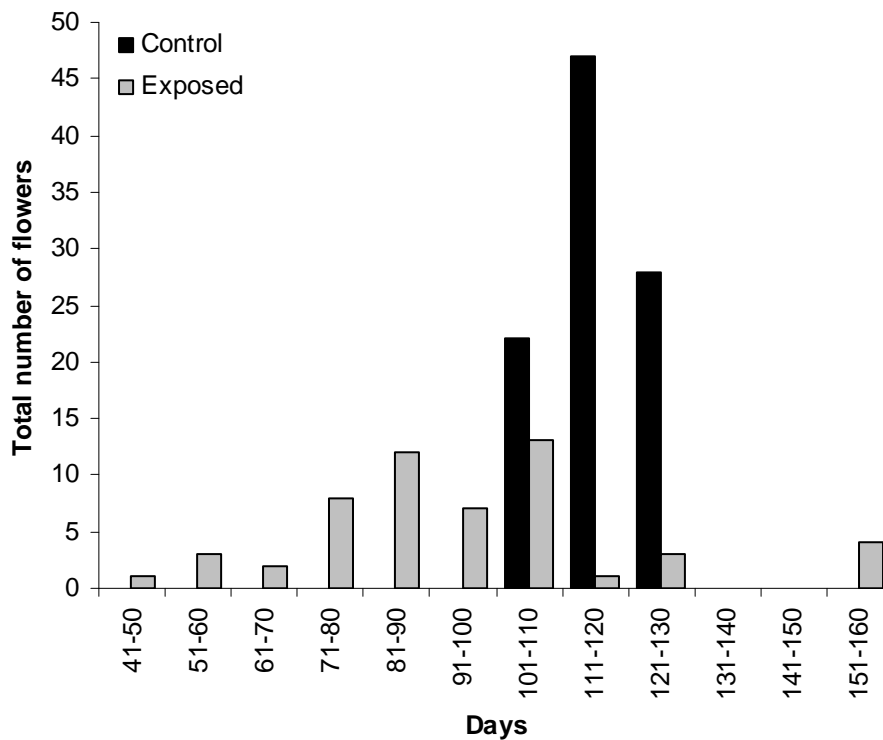


Figure 44: Total number of lateral buds in *Vicia faba* exposed or not to CdCl<sub>2</sub> (mean +/- SD). No statistically significant difference in number of buds (Student t-test for each time,  $p < 0.05$ ). C<sub>P</sub>: growth speed of control ind., in phytotron; E<sub>P</sub>: growth speed of exposed ind., in phytotron; C<sub>G</sub>: growth speed of control ind., in greenhouse; E<sub>G</sub><sup>\*</sup>: growth speed of exposed ind., in greenhouse. \* Growth speed statistically significant from control (Student t-test,  $p < 0.05$ ).

Flowering period was different between control and exposed groups. Exposed plants produced the first flower earlier and had a longer flowering period than control ones (fig. 45). Total flower production was less abundant in exposed group (54 flowers) than in control group (97 flowers). The number of flowers produced by one plant on the whole flowering period was more heterogeneous in exposed plants than in control ones: in exposed plants almost all of the flowers were produced by a single individual, whereas in control plants, all individuals produced approximately the same number of flowers (fig. 46). Some of the flowers in exposed group died before opening, a phenomenon never observed in control plants. Then, it is noteworthy that ten fruits appeared on control plants, but no fruit was formed on exposed plants.



**Figure 45: Total number of flowers in control or cadmium exposed *Vicia faba* plants (n = 6 individuals). The difference in distribution of flower production is statistically significant between the two groups (Chi-square after data pooling to obtain a number of flowers at least equal to 5 in each category,  $p < 0.01$ ).**

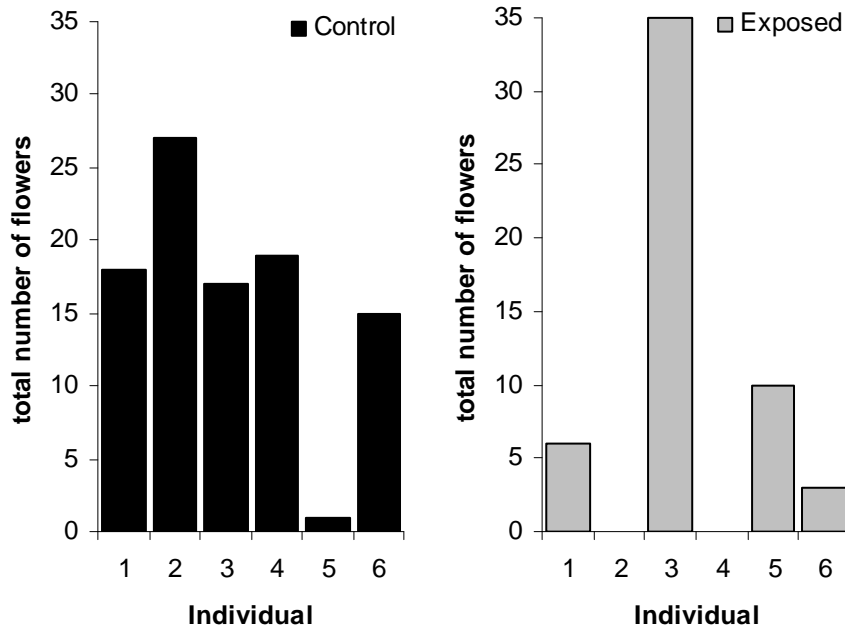


Figure 46: Total number of flowers produced by individual plant (plant number 1 to 6) throughout their whole life duration.

Finally, every plant survived at least 106 days. Since the 106<sup>th</sup> day, exposed plants successively died and only one exposed plant survived after day 116, while all the plants survived in control group (fig. 47).

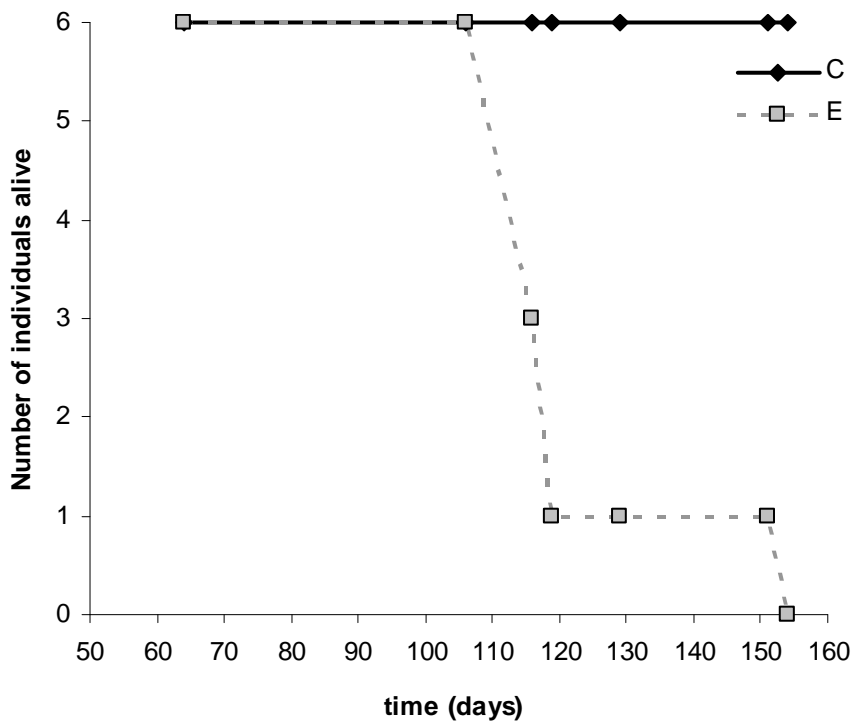


Figure 47: Survival time of control plants (C) and cadmium exposed plants (E), long-term experiment (n = 6 individuals).

At the end of the experiment, cadmium concentration in the soil had slightly decreased compared with the beginning of the experiment and had remained relatively homogeneous between the top (480  $\mu\text{mol/kg}$ ) and the bottom (454  $\mu\text{mol/kg}$ ) of the pot.

## Discussion

The aim of this study was to elucidate the ecological relevancy of micronucleus test at an early life stage to predict life cycle impairments or changes in plants.

In the 5 days experiment, micronucleus frequency increased with cadmium concentration, reached a maximum beyond which fewer micronuclei were formed. This classical concentration-effect curve is due to the decrease of mitotic index (cytotoxicity). Indeed, when mitosis is inhibited, micronuclei cannot appear (Degrassi and Rizzoni 1982). A high cadmium concentration (510  $\mu\text{mol/kg}$ ) was necessary to reach this maximal genotoxicity without any neither cytotoxicity nor growth inhibition. This concentration corresponds to rare extremely polluted dump soils (Majer et al. 2002; White and Claxton 2004). Despite these genotoxic and even cytotoxic effects, no significant difference was seen in root length or number. The lack of correlation between mitotic index (cytotoxicity) and root length can be explained by an enhanced cell elongation (Fusconi et al. 2006).

During the first 2 months of the long term experiment, emergence rate or time, growth rate, plant appearance, lateral bud number were not altered consecutively to cadmium exposure.

However, *Vicia faba* is not known as a metal tolerant plant. To the contrary, its sensitivity to pollutants justifies its use in ecotoxicity tests (Cordova Rosa et al. 2003; Ünyayar et al. 2006) and the Agudulce cultivar seems to be one of the most cadmium sensitive broad bean varieties (Rahoui et al. 2008).

Plant growth was affected by cadmium only after 72 days of exposure. This phenomenon seems not to be due to the particular greenhouse conditions, because a preliminary experiment entirely conducted in the greenhouse showed no difference in the growth rates between control and  $\text{CdCl}_2$  exposed individuals in their first month of life. As Cd ions seemed relatively homogeneously distributed in the tested soils, we can exclude cadmium avoidance by the roots as a resistance mechanism. Other possible defence mechanisms may be, according to the review of Sanità di Toppi and Gabbrielli (1999): (1) immobilization of cadmium by the root cell wall; (2) cadmium exclusion by plasma membranes; (3) compartmentalization, e.g. vacuolar accumulation of cadmium; (4) biosynthesis of thiolate molecules like phytochelatins (Béraud et al. 2007), able to sequester and to neutralize



numerous heavy metals (Mendoza-Cózatl and Moreno-Sánchez 2006; Pal and Rai 2010; Zenk 1996); (5) Ethylene-mediated defence mechanisms (Fuhrer 1982). Interestingly, this hormone is involved in flowering and may possibly be responsible for the early flowering of stressed plants (Hock and Elstner 2005; Sanyal and Bangerth 1998) while control plant flowering was regulated by natural photoperiod and light spectrum (Corbesier and Coupland 2006). Early flowering seemed therefore to be a response to stress. It has been shown that stressed plants growing in acidified soils or submitted to a lack of nutrient were reported to exhibit intense flowering (Garbey et al. 2004; Mony et al. 2007).

Besides this stress-mediated modification of the flowering period, in exposed group a single plant produced a great amount of flowers while other plants produced few flowers. The same trend was visible in plant growth speeds: in exposed plants, the individual which produced the most numerous flowers was also the individual which grew the fastest (data not shown) and was among the ones that died first. Therefore, this enhanced flowering was not due to an energetic allocation to the detriment of growing. This rather suggests the selection of a unique, probably more tolerant individual for reproduction. At last, none of the flowers produced by Cd exposed plants was able to achieve fruit formation, on the contrary of flowers from control plants.

In spite of a limited number of individuals (6 individuals were allowed to come into bloom), this study lead to observe contrasted responses between control and cadmium treated plants. It is hypothesized that, by earlier flowering and selective process, stressed plants intended to adopt a strategy, consisting in accelerating their life cycle and flowering, which was finally not successful since no fruit could be obtained before dieing.

## Conclusion

Micronucleus test has been shown in our study as an early bioassay that allows detecting soil genotoxicity whereas no classical short term endpoint (germination, root elongation, plant growth) showed any variation. Moreover, early genotoxicity is important to be detected since it can be a predictive biomarker of long term deleterious effects in plants, which can appear after a 2 months exposure (in our case) without any harbinger. Indeed, after exposure to a spiked soil with a genotoxic concentration of CdCl<sub>2</sub>, *Vicia faba* plants showed a reduced life time, an extended flowering period and infertile flowers.

Our study suggests a relationship between early micronuclei formation in *Vicia faba* secondary roots and life history traits alteration putatively significant at a population level.

Nevertheless, the predictive power of early genotoxicity on life history traits alteration and the mechanisms underlying this relationship remain to be elucidated.

## **Acknowledgements**

The authors thank the French Environment and Energy Management Agency (ADEME, Paris, France) for financial support.

## 5.2 Cuivre et Hydrazide maléique

### 5.2.1 Choix des concentrations à utiliser

En partant du même postulat que la publication présentée au §5.1, nous avons cherché à connaître le devenir à long terme de plantes exposées depuis la semence des graines à des concentrations de sulfate de cuivre et d'HM induisant un nombre significatif de micronoyaux sans bloquer l'élongation racinaire. On sait que pour le  $\text{CuSO}_4$ , cette concentration est de 2 mmol/kg dans nos conditions expérimentales (Figure 48 a, b). Pour l'HM, la concentration de 5  $\mu\text{mol/kg}$  est celle qui convient le mieux à nos critères, mais nous choisirons également la concentration de 20  $\mu\text{mol/kg}$  qui, tout en inhibant peu l'élongation racinaire, possède également la propriété d'inhiber drastiquement l'indice mitotique (Figure 48 c, d).

### 5.2.2 Pertinence écologique des concentrations choisies

#### 5.2.2.1 Hydrazide maléique

En partant du postulat que l'hydrazide maléique ne se répand que sur les dix premiers centimètres de la couche de sol, on peut calculer que l'épandage en champ des produits cités dans l'analyse bibliographique au § 3.1.3 laisserait de 20 à 48,3 mmol/m<sup>3</sup> d'HM dans le sol. Sachant que notre sol d'étude LUFA 2.2 possède une densité d'environ 1197 g/L, on arrive à une estimation de 16,7 à 40,3  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM. Les concentrations choisies pour nos tests long terme sont donc comparables ou inférieures aux contaminations attendues après épandage.

#### 5.2.2.2 Sulfate de cuivre

La concentration de cuivre dans les sols de vignobles due à l'épandage régulier de bouillie bordelaise est située entre 0,3 et 40 mmol/kg (cf. analyse bibliographique, § 3.3.2).

En comparaison, notre concentration de 2 mmol/kg est plutôt faible, même s'il faut garder à l'esprit que le sol LUFA 2.2 étant sableux et acide (voir caractéristiques annexe 4), la biodisponibilité du cuivre y est sans doute importante (cf analyse bibliographique, § 3.3.3).

Le seuil de toxicité du cuivre se situant entre 0,8 et 1,9 mmol/kg de cuivre extractible à l'EDTA (cf analyse bibliographique, §3.3.1), notre concentration de 2 mmol/kg de sol total se situe sans doute dans les plus basses concentrations toxiques du métal, même si nous n'avons pas mesuré la proportion de cuivre extractible à l'EDTA dans notre sol.

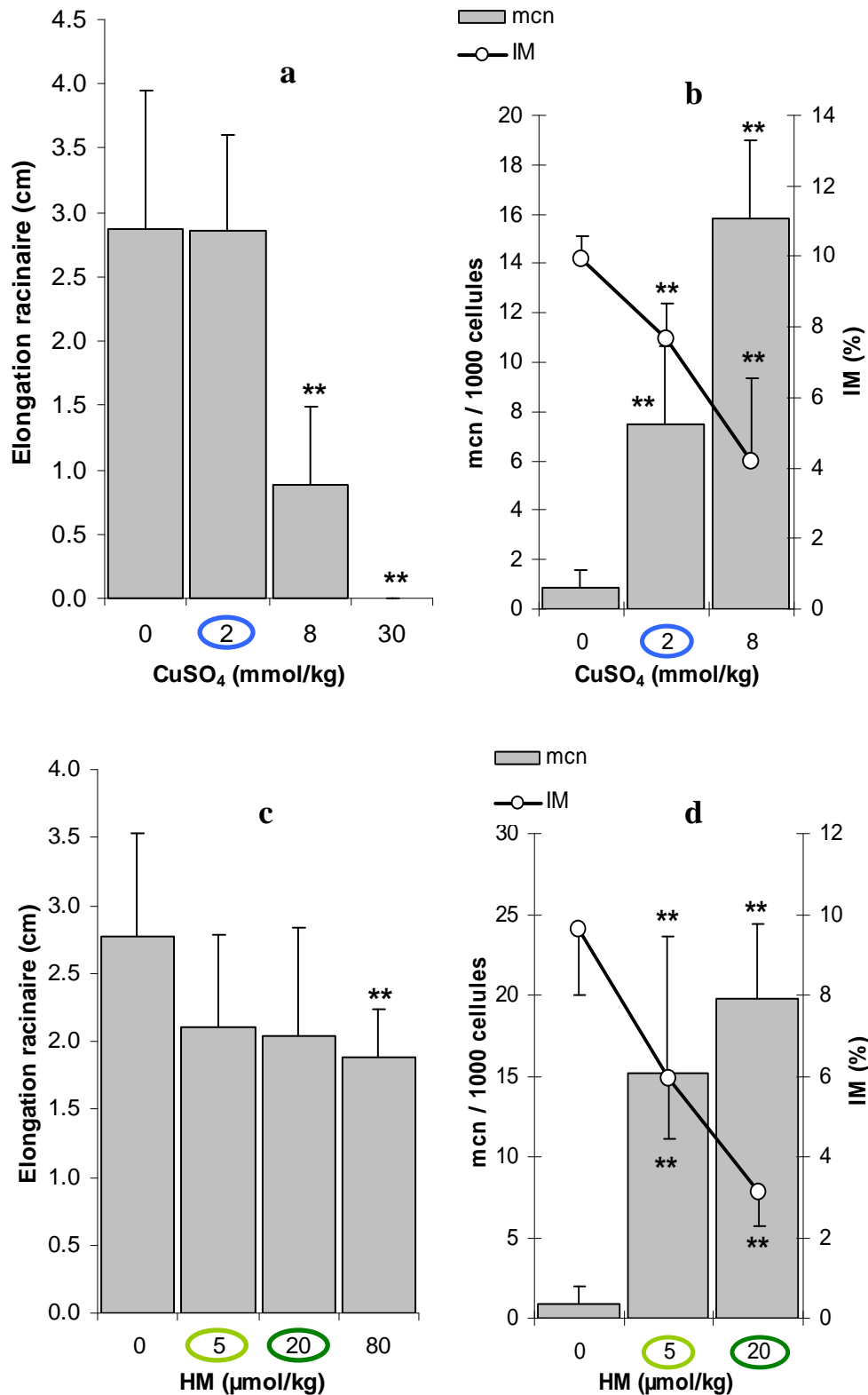


Figure 48 : Elongation racinaire (moyenne +/- écart-type, 3 fèves, n = 9 racines) des racines secondaires de *Vicia faba* après 48h de contamination en milieu solide dans du sol LUFA 2.2 dopé au sulfate de cuivre (a) ou à l'HM (c). ANOVA suivie du test t de Dunnett : significatif par rapport au témoin : \*\*p<0,01 Pour CuSO<sub>4</sub> : changement de variable : racine (x). (b), (d) : Indice mitotique (%) et fréquence de micronoyaux pour 1 000 cellules retrouvés dans les cellules-filles méristématiques des mêmes racines, respectivement (moyenne +/- écart-type, 3 fèves, n = 6 racines). Kruskal-Wallis suivi du test U de Mann-Whitney : \*\*p<0,01. Cercles de couleur : concentrations retenues pour les tests à long terme.

## 5.2.3 Impact à long terme sur les plantes

### 5.2.3.1 Germination

Les 10 graines plantées dans chaque pot ont toutes germé en 5 à 10 jours, quelque soit le polluant présent dans le sol. Ainsi, les tests de germination sont strictement négatifs malgré le fait que l'HM soit justement une molécule aux propriétés antigerminatives. Le temps moyen de germination des graines est également équivalent entre les groupes (6,8 à 7,9 jours de moyenne). Ces résultats sont peu surprenants quand on sait que le critère de germination est peu sensible par rapport à d'autres critères d'effet (da Rosa Corrêa et al. 2006).

### 5.2.3.2 Aspect des plantes

La Figure 49 montre l'aspect des plantes obtenues au bout de 25 jours. Les individus témoins sont bien développés (Figure 49a) avec des feuilles lisses et régulières (Figure 49b). En revanche, ceux poussant dans le sol traité à 20  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM présentent des feuilles irrégulières, épaissies, avec une surface rugueuse, rondes et vaguement lobées ou au contraire très allongées, avec des bords parfois repliés (Figure 49c). De plus, beaucoup montrent une tige atrophiée, avec des entrenoeuds exagérément courts (non montré). L'explication de ces malformations pourrait trouver son origine dans une inhibition de la multiplication cellulaire, qui empêcherait surtout le développement normal de la tige, mais aussi dans les effets génotoxiques de l'HM qui pourrait provoquer une fréquence d'apoptoses très élevée, provoquant des malformations des feuilles. Le cuivre ne provoque aucune malformation visible à l'œil nu chez 9 individus sur 10. Le dixième présente un retard de croissance avec des feuilles très irrégulières, boursouflées et repliées (Figure 49d). Dans ce cas, les effets du cuivre sont probablement accentués par la concurrence avec les autres individus qui accaparent la plupart des nutriments.

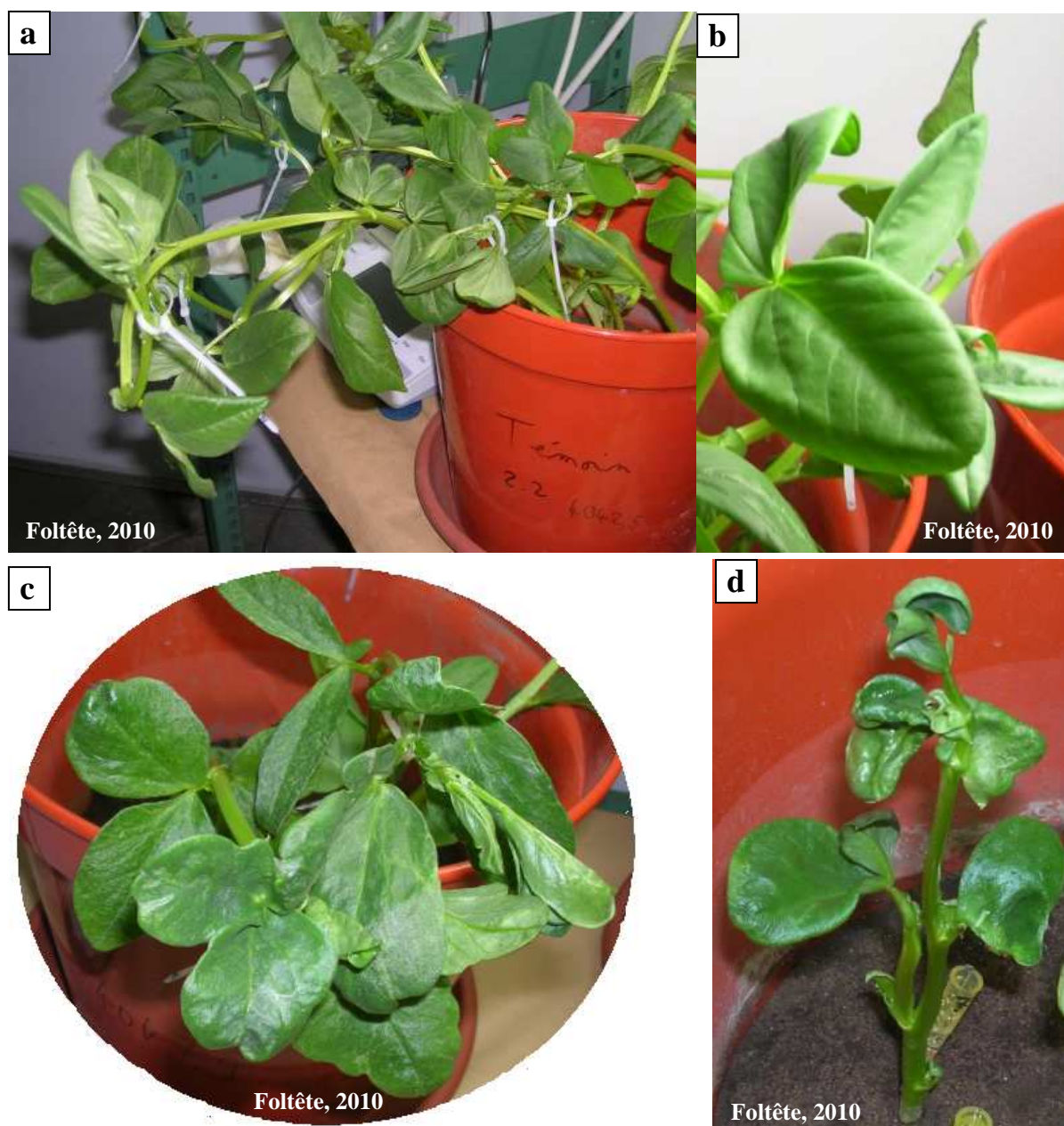


Figure 49 : Aspect des feuilles de *Vicia faba* 25 jours après semence. (a), (b) : Témoin. (c) : 20 $\mu$ mol/kg d'HM. (d) : L'une des 10 plantes exposées au sulfate de cuivre, les 9 autres ayant une taille et un aspect semblables au témoin.

### 5.2.3.3 Vitesse de croissance

La vitesse initiale de pousse calculée sur les 25 premiers jours après émergence (Figure 50) révèle une différence entre les groupes. En effet, si dans le pot témoin ainsi que dans ceux traités au cuivre ou à 5  $\mu$ mol/kg d'HM, tous les individus ont une vitesse initiale de 0,4 à 0,5 nouveaux bourgeons latéraux par jour, dans le pot traité à 20  $\mu$ mol/kg, deux groupes de vitesse distincts se différencient clairement. L'un, affichant entre 0,1 et 0,3 nouveaux bourgeons latéraux par jour, est logiquement considéré comme constitué d'individus à la

croissance ralentie par l'action du toxique. Le second groupe, de vitesse initiale comprise entre 0,5 et 0,6, connaît une croissance plutôt supérieure à la majorité des individus témoins. Ce phénomène inattendu peut être expliqué par une réaction adaptative de stress, qui vise à accélérer le développement de la plante afin d'augmenter ses chances de finir son cycle de vie avant de mourir suite à l'action du toxique. Les individus contaminés à 20  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM présentent donc une répartition en fonction de leur vitesse initiale de croissance significativement différente de celle du témoin. Les plantes les plus vulnérables connaissent un retard de croissance tandis que les plus résistantes augmentent leur vitesse de croissance pour tenter de donner des fruits au plus vite.

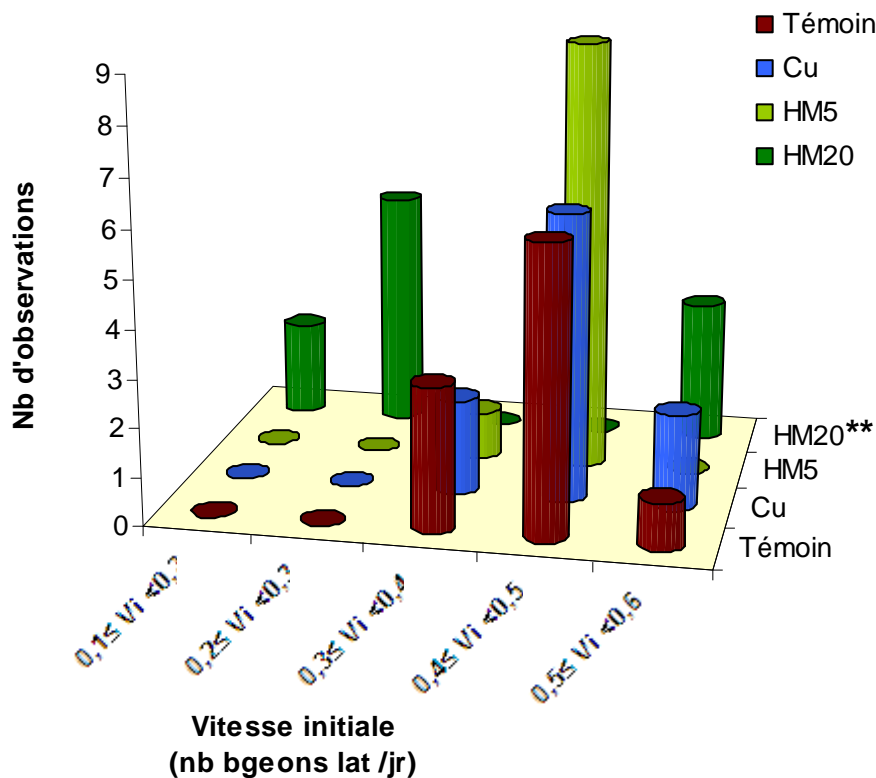


Figure 50 : Répartition des 10 individus exposés à 2 mmol/kg de sulfate de cuivre (Cu), 5  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM (HM5) ou 20  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM (HM20) en fonction de leur vitesse initiale de croissance sur les 25 premiers jours suivant leur émergence (Vi). \*\* Répartition significativement différente du témoin (Chi-deux,  $p < 0,01$ ).

La présence de ces deux types d'individus à vitesse de croissance très différente dans le groupe traité à la plus haute concentration d'HM explique que la vitesse moyenne de croissance observée entre le dixième et le 40<sup>ème</sup> jour ne soit pas différente entre les quatre groupes (Figure 51). Le nombre moyen de bourgeons latéraux reste malgré tout inférieur à celui des trois autres groupes, mais il n'est statistiquement différent du témoin que pour la première date de suivi, le jour 11.

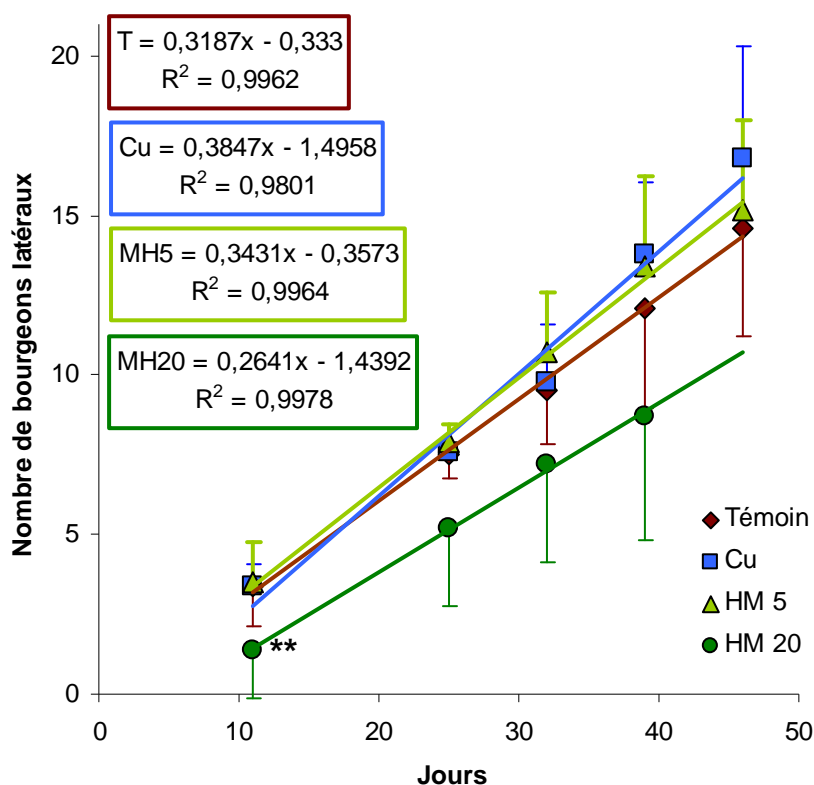


Figure 51 : Vitesse de croissance (moyenne +/- écart-type) de 10 individus exposés à 2 mmol/kg de sulfate de cuivre (Cu), 5 µmol/kg d'HM (HM5) ou 20 µmol/kg HM (HM20). Pour HM20, le dernier point (jour 46) n'a pas été pris en compte dans le calcul de la vitesse car les trois plus petites plantes étaient mortes, ce qui augmentait artificiellement la moyenne du nombre de bourgeons. Les vitesses de croissance ne sont pas différentes entre elles (ANOVA). \*\* Nombre de bourgeons significativement différents du témoin pour un jour donné, Mann-Whitney, p<0,01.

#### 5.2.3.4 Sénescence ou récupération

A partir du jour 39, les trois plantes les plus chétives du groupe traité à 20 µmol/kg meurent. Il est intéressant de remarquer qu'à partir de ce jour également, les nouvelles feuilles qui apparaissent sur les trois individus les plus développés du même groupe ont un aspect normal, similaire à celui des feuilles témoin, alors que toutes les feuilles de tous les individus de ce groupe présentaient jusque-là des déformations similaires à celles présentées dans la Figure



49c. En effet, l'HM est très peu persistant dans les sols, très vite dégradé par les microorganismes. Dans un sol sableux, sa demi-vie est d'environ 2,2 jours et 90% de sa concentration de départ disparaît dans les 7,3 jours (analyse bibliographique, § 3.1.4). Par contre, il est beaucoup plus rémanent dans les tissus vivants. Frear et Swanson (1978) montrent en effet qu'entre 12 et 22% de la concentration initiale d'HM est retrouvée intacte dans les tissus de *Nicotiana tabacum* au bout de 28 jours. Dans notre étude, l'explication de la disparition des symptômes visibles de l'intoxication au bout de 39 jours pourrait s'expliquer par le développement d'une résistance efficace chez la plante, mais plus vraisemblablement par la dégradation pure et simple de la molécule d'hydrazide maléique par la plante.

A partir du jour 46, les individus traités à 5  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM montrent une proportion de feuilles mortes statistiquement supérieure au témoin (Figure 52). C'est le seul symptôme d'intoxication que présente ce groupe. Parmi les individus traités à 2 mmol/kg de sulfate de cuivre, un seul individu présente des symptômes d'intoxication (Figure 49c).

En raison de l'insuffisance de la puissance d'éclairage à maintenir les plantes plus longtemps dans de bonnes conditions et de l'épuisement du sol, nous avons été contraints d'interrompre l'expérience après 46 jours. Nous n'avons donc malheureusement pas été en mesure d'étudier la floraison et la fructification de nos plantes.

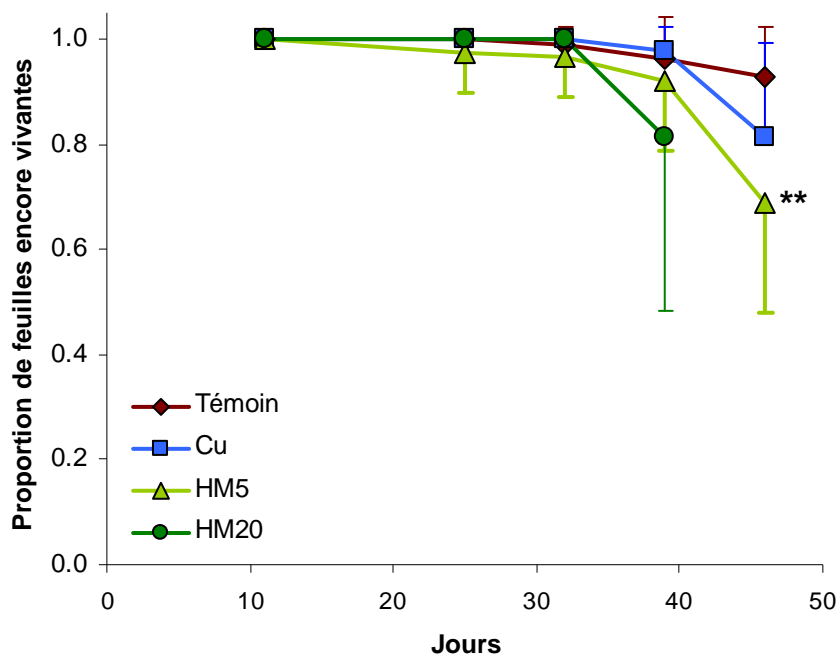


Figure 52 : Evolution de la proportion de feuilles encore vivantes (moyenne +/- écart-type) de 10 individus exposés à 2 mmol/kg de sulfate de cuivre (Cu), 5 µmol/kg d'HM (HM5) ou 20 µmol/kg d'HM (HM20). Pour HM20, le dernier point (jour 46) n'a pas été pris en compte car les trois plus petites plantes étaient mortes, ce qui augmentait artificiellement la proportion de feuilles vivantes. \*\*significativement différent du témoin, test U de Mann-Whitney,  $p < 0,01$

### 5.2.3.5 Conclusion

La concentration de cuivre que nous avons retenue pour le test à long terme correspond à celle que l'on peut trouver dans un sol de vignoble peu contaminé, et se situe apparemment au niveau du seuil de toxicité pour les plantes. Sur ce métal, peu d'effets toxiques ont été constatés, si ce n'est l'atrophie d'un individu sur les dix exposés. Si cette dernière est liée à l'effet du cuivre, les tests de croissance montrent la même sensibilité que le test des micronoyaux. Si elle n'est due qu'à la concurrence entre les individus, on ne peut pas conclure sur la valeur prédictive du test des micronoyaux car aucun autre signe significatif de perturbation du cycle de vie des individus n'a été constaté.

En ce qui concerne l'hydrazide maléique (HM), les concentrations utilisées pour le test à long terme correspondent également à ce qu'on pourrait théoriquement s'attendre à obtenir dans un sol de champ après épandage du produit aux concentrations recommandées par le fabricant. L'HM ne persistant que très peu de temps dans les sols et ne posant donc aucun problème de rémanence, l'objectif de cette expérience n'était pas de prouver sa toxicité à long terme, mais bien de travailler avec une molécule modèle à demie-vie limitée à quelques jours dans le sol.

Ces caractéristiques nous ont permis de vérifier le pouvoir prédictif du test des micronoyaux en sachant que la molécule disparaîtrait rapidement du sol (environ une semaine) et que les effets constatés à long terme ne pouvaient être dûs qu'à la persistance du produit dans les tissus ou de ses effets dans les cellules. On peut considérer qu'au bout de 39 jours, le produit a été quasiment totalement éliminé des tissus. Dans le sol traité à 20  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM, seuls trois individus semblent résister et parvenir à former des feuilles d'aspect normal. Malheureusement, le sort des quatre autres individus reste inconnu, mais il semble probable que les lésions persistent et provoquent de graves dysfonctionnements même lorsque le produit a disparu. Cette hypothèse est confirmée par le comportement des plantes poussant dans le sol contenant 5  $\mu\text{mol/kg}$  d'HM, dont le dessèchement des feuilles ne survient qu'au bout de 46 jours. De plus, Smith et al. (1959) ont également constaté que l'HM garde son efficacité très longtemps, jusqu'à plus d'un an. Pour ces auteurs, il était difficile de savoir si cette propriété était due à la stabilité de la molécule dans les tissus de la plante ou à des effets irréversibles causés par son action, et qui peuvent persister après sa dégradation. Au vu de la demie-vie de l'HM dans les tissus végétaux, nous pouvons aujourd'hui avancer qu'il est hautement improbable qu'il puisse y persister pendant plus d'un an en concentration suffisante pour provoquer des effets visibles.

## Conclusions

- **Aucun des trois traitements testés n'a eu d'influence sur le temps ou le taux de germination des graines.**
- **Les traitements de CuSO<sub>4</sub> à 2 mmol/kg ou d'HM à 5 µmol/kg, responsables d'une augmentation de la fréquence des micronoyaux et d'une diminution de l'IM dans les cellules-filles méristématiques des racines secondaires de *Vicia faba*, induisent peu de symptômes sur les plantes durant leurs 46 premiers jours de vie.**
- **La concentration d'HM qui induit la plus forte fréquence de micronoyaux sans réduire l'IM en dessous de 2%, qui se trouve être 20 µmol/kg dans nos conditions expérimentales, provoque quant à elle 100% de feuilles malformées et un sévère retard de croissance chez sept individus, dont trois sont morts après environ 40 jours. Trois individus sur dix ont réagi positivement à l'intoxication en augmentant leur vitesse de croissance initiale et sont parvenus au bout de 39 jours à former des feuilles saines en apparence.**
- **La valeur prédictive du test des micronoyaux pour une perturbation future du cycle de vie de la plante est pertinente pour les deux concentrations d'HM, mais il est difficile de conclure pour le cas du cuivre.**



# *Discussion Générale*

---



# 1 Relations entre fréquence de micronoyaux, indice mitotique et élongation racinaire

## 1.1 Corrélation

Nous n'avons pas obtenu de corrélation claire entre indice mitotique (IM) et élongation racinaire. Ceci est dû à l'allongement des cellules qui n'est pas forcément inhibé par le blocage des mitoses au niveau du méristème, mais également au fait que les trois racines dont nous mesurons l'allongement ne sont pas forcément les mêmes que celles qui servent ensuite au décompte des micronoyaux. Pourtant, certains auteurs font le rapprochement entre ces deux paramètres. Par exemple, Rank et Nielsen (1997) constatent chez *Allium cepa* que s'ils choisissent pour concentration maximale d'étude celle permettant d'inhiber la pousse des racines de 50 %, l'indice mitotique ne descendra jamais en dessous de 50% du témoin, théorie qu'ils ont vérifiée avec tous les toxiques étudiés, dont l'HM. Notre étude va à l'encontre de cette observation, étant donné que pour une élongation racinaire supérieure à 90% du témoin (pour 20 µM d'HM), l'indice mitotique atteint moins de 28% du témoin. Cette observation n'est donc pas fiable dans le cas de *Vicia faba* où des racines préexistantes sont utilisées pour les tests. En milieu solide, cette théorie n'est logiquement pas vérifiée pour l'HM avec le protocole 48h puisque ce dernier prône l'exposition de racines préexistantes, mais elle ne l'est pas non plus pour le protocole 5j où les racines apparaissent directement dans la matrice testée. Pour le cuivre, en revanche, la théorie est vérifiée en milieu solide quel que soit le protocole.

De Marco et al. (2005) trouvent une très forte corrélation positive entre la longueur de la racine primaire de *Vicia faba* et le nombre de micronoyaux retrouvés dans les méristèmes de ces mêmes racines. L'explication logique peut en être que plus l'organisme croît et plus ses cellules se multiplient, augmentant mathématiquement la probabilité de survenue d'une lésion de l'ADN. Nous n'avons pour notre part constaté aucune corrélation entre ces deux grandeurs, ceci étant en partie dû au fait que les racines employées pour les mesures ne sont pas les mêmes.

On sait que lorsque l'IM diminue en-dessous d'un certain seuil, la fréquence de micronoyaux a tendance à diminuer également. De plus, comme expliqué au paragraphe précédent, un plus



grand nombre de mitoses signifie également un plus grand risque de formation de micronoyaux. Pourtant, aucune corrélation claire n'a été établie entre ces deux paramètres. La seule explication que nous ayons pu trouver réside dans le fait que cette régression ne pouvant se faire que pour une concentration de toxique donnée, nous disposons pour chaque expérience de 6 données issues de 3 individus différents. Pour disposer d'un plus grand nombre de valeurs il nous faut mélanger plusieurs expériences différentes conduites à la même concentration de toxique. Les variations interindividuelles ou inter-expérimentations sont sans doute en partie responsables de la non-corrélation.

Nous n'avons donc trouvé aucune corrélation entre les trois paramètres que nous avons l'habitude de mesurer au cours d'un test des micronoyaux, à savoir l'élongation racinaire, l'IM et bien sûr la fréquence de micronoyaux. Ils sont donc indépendants les uns des autres et non redondants, et donc complémentaires.

## **1.2 Sensibilité**

En règle générale, au cours de tous les tests que nous avons conduits, le même ordre se dégage entre nos différents biomarqueurs en matière de sensibilité décroissante : mcN > IM > croissance > germination. Il faut néanmoins signaler que sur les sols ou percolats de friche industrielle (Neuves-Maisons), l'élongation racinaire peut être plus sensible que l'IM. De plus, certaines substances peuvent inhiber la croissance végétale sans être génotoxiques.

Cet ordre est cohérent avec les résultats de la plupart des auteurs, même si des avis discordants existent. Par exemple, de manière surprenante, Chakraborty et al. (2009) trouvent sur *Allium cepa* exposé en milieu solide à un cocktail de métaux dans une matrice complexe : fréquence de cellules binucléées > test des comètes > aberrations chromosomiques = IM = élongation racinaire > mcN. Seth et al. (2008) trouvent : aberrations chromosomiques = test des comètes > IM = mcN chez *Allium cepa* exposée au cadmium. Chez *Pinus sylvestris* exposé au cadmium, Schützendübel et al. (2001) trouvent l'élongation racinaire autant voire plus sensible que les enzymes du stress oxydatif, le glutathion réduit et la mort cellulaire, alors qu'il est plutôt généralement admis que les marqueurs « macroscopiques » sont affectés à des concentrations supérieures à celles impliquant les paramètres « microscopiques ».

Ces disparités justifient l'utilisation du plus grand nombre de tests possible, aucun n'ayant vraiment prouvé une quelconque suprématie de façon consensuelle.

## **2 Ajustement du protocole du test des micronoyaux**

### **2.1 Praticité**

Ce test est simple à réaliser, quoique chronophage ; il ne nécessite pas non plus d'appareillage sophistiqué (un microscope suffit).

### **2.2 Spécificité**

L'intérêt du test des micronoyaux réside dans le fait que l'occurrence naturelle de ce type de dommages est très faible et donc que les témoins négatifs affichent normalement un taux de micronoyaux compris entre 0 et 1%. L'apparition de micronoyaux, mêmes rares, est toujours le signe d'une génotoxicité. La spécificité du test est donc excellente.

### **2.3 Répétabilité, reproductibilité**

L'écart-type à la moyenne de la fréquence de micronoyaux est souvent très important, parfois supérieur à 50% de la moyenne. Ces disparités sont compensées par les très importantes différences constatées entre les individus exposés et les témoins, et entre les différentes concentrations de toxique. Ainsi, si la répétabilité en elle-même est faible, elle est la plupart du temps suffisante pour dégager une haute significativité statistique entre les différents groupes testés.

Le nombre de micronoyaux dénombrés peut varier beaucoup d'un opérateur à l'autre, mais l'aspect final de la courbe concentration-réponse est toujours le même. La concentration du « pic génotoxique » n'a jamais été opérateur-dépendante. Le test des micronoyaux possède donc une reproductibilité correcte. De plus, le test semble peu affecté par les différents protocoles testés, la présence de lumière ou non pendant la phase de prégermination ou le nombre d'individus par pot.

### **2.4 Sensibilité**

L'origine des graines employées pour le test est à surveiller : des plantes cultivées sur plusieurs générations dans un sol pollué au cuivre par l'épandage de bouillie bordelaise se montreront forcément moins sensibles à ce métal. Il en va de même pour le cadmium (Duan et al. 2000).

L'autre paramètre important qui peut faire varier sa sensibilité semble être le temps d'exposition. En effet, dans la littérature, on trouve les valeurs suivantes de LOEC micronoyaux pour une exposition de différents modèles de plantes supérieures exposées à CdCl<sub>2</sub> en solution :

- Après deux heures d'exposition et 36h de récupération, il faut au moins 5.10<sup>-2</sup>M de CdCl<sub>2</sub> pour obtenir des micronoyaux chez *Vicia faba* (Steinkellner et al. 1998).
- Après 12h d'exposition et 24h de récupération, Cordova Rosa et al. (2003) trouvent un nombre significatif de micronoyaux dans les racines secondaires de *Vicia faba* à partir de 2.10<sup>-5</sup>M de CdCl<sub>2</sub>.
- Sur le même modèle *Vicia*, De Marco et al. (1988) trouvent des micronoyaux à partir de 4.10<sup>-4</sup>M pour une exposition de 24h suivie de 24h de récupération.
- CdCl<sub>2</sub> induit la formation de micronoyaux dans les racines primaires de *Vicia faba* après 30h d'exposition à partir de 7,5.10<sup>-8</sup>M (Manier et al. 2009).
- Après 48h d'exposition à Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, Ünyayar et al. (2006) obtiennent un nombre significatif de micronoyaux pour 10 µM pour *Allium sativum* mais dès 10<sup>-6</sup>M pour *Vicia faba*. Aucune concentration inférieure n'a été testée par ces auteurs.

La tendance est donc à l'augmentation de la sensibilité du test lorsque le temps d'exposition augmente. Cette constatation est confirmée par certains auteurs :

- *Allium sativum* exposé durant 24 et 72h montre des micronoyaux à partir des concentrations de 10<sup>-2</sup> et 10<sup>-7</sup> M de CdCl<sub>2</sub> respectivement (Liu et al. 2003a).
- Pour Béraud et al. (2007) les premiers signes de génotoxicité se manifestent à 10<sup>-7</sup>M pour une exposition de 30h mais dès 7,5.10<sup>-8</sup> pour 39h. A 48h d'exposition, les nombres de micronoyaux retrouvés sont bien supérieurs à ce qu'ils étaient pour les deux temps les plus courts.

Quant à nous, nous avons montré qu'après 5 jours d'exposition en milieu solide, le nombre de micronoyaux est inférieur à ce qu'il est à 48h. Nos résultats sont confirmés par Marcato-Romain et al. (2009). Pour rendre notre test le plus sensible possible, il faut donc trouver le juste temps d'exposition, qui paraît se situer aux alentours de 72h.

## **2.5 Le protocole « 5 jours » : avantages et inconvénients**

### **2.5.1 Avantages**

- Pour la mesure de la croissance racinaire, on dispose d'une sensibilité souvent supérieure à celle du protocole 48h. En effet, certaines molécules (antigerminatifs) inhibent l'apparition des racines secondaires mais pas leur allongement ;
- On plante directement la racine primaire dans le sol à tester, sans craindre d'abîmer les racines secondaires.

### **2.5.2 Inconvénients**

- Il existe toujours un risque que l'une des plantes ne se développe pas : il faut donc utiliser quatre jeunes pousses pour s'assurer que trois au moins survivront ;
- il faut 5 jours pour que les racines se développent de manière suffisante ;
- la mesure de la croissance racinaire est plus compliquée qu'avec le protocole 48h car lorsque les fèves sont repiquées dans le sol contaminé, elles ne comportent que leur racine primaire. A la fin de la contamination, on ne peut donc pas mesurer l'élongation racinaire, ce qui pose la question du choix du critère de toxicité : comment choisir les 3 racines que l'on va mesurer ? Doit-on choisir d'autres paramètres complémentaires (nombre de racines apparues, biomasse...) ?
- Une durée d'exposition de 5 jours nécessitant un arrosage quotidien oblige forcément l'opérateur à venir travailler pendant les week-ends. Cette contrainte sera forcément rejetée par une commission de normalisation.

## **2.6 Le protocole « 48h » : avantages et inconvénients**

### **2.6.1 Avantages**

- L'exposition dure 48h, comme en milieu liquide, ce qui légitimise une éventuelle comparaison entre les deux modes de contamination ;
- On peut mesurer les racines secondaires avant et après l'exposition, ce qui ne pose plus le problème du choix du critère de toxicité : nous conservons le même critère pour les milieux solide et liquide ;
- Les racines sont déjà bien développées lors du repiquage, ce qui permet aux plantes de survivre à coup sûr, à tout le moins en ce qui concerne notre expérience ;
- Il n'est pas nécessaire qu'un opérateur soit présent le week-end.

### **2.6.2 Inconvénients**

- Il est plus difficile de repiquer de jeunes plantes ayant déjà des racines secondaires de 1 à 3 cm que des embryons comportant uniquement la racine primaire. On prend le risque d'abîmer l'une des racines mesurées, c'est pourquoi il est préférable d'en mesurer au moins 4 en prévision des pertes.
- La sensibilité de l'élongation racinaire est inférieure à celle obtenue pour le test 5 jours, en particulier pour l'HM.

## **2.7 Proposition d'un protocole**

Nous pourrions proposer de placer dans le sol à tester les jeunes pousses comportant uniquement leur racine primaire durant 3 jours. Pour accélérer la vitesse de pousse, la température ou le taux d'humidité pourraient être augmentés. Ainsi, sans qu'il soit nécessaire de venir le week-end, on peut espérer augmenter la sensibilité du test des micronoyaux, puisque d'après les constatations effectuées dans le paragraphe précédent, la durée optimale d'exposition serait de 72h. On garderait également la sensibilité de la mesure de la croissance racinaire caractéristique du protocole 5 jours.

Concernant le choix du paramètre reflétant le mieux la croissance racinaire, nous proposons le critère « longueur des trois plus longues racines ».

### 3 Tests à long terme

Notre travail montre de façon très intéressante que la pertinence des différents biomarqueurs que nous utilisons (germination, croissance, micronoyaux) pour détecter une pollution dans un sol dépend de la nature de la pollution et de sa concentration. Nous avons vu dans le cas du cadmium étudié au §5.1 qu'un biomarqueur « microscopique » comme le test des micronoyaux était nécessaire pour mettre en évidence un risque de perturbation du cycle de vie des plantes. Ce test à long terme portait sur une concentration très élevée de cadmium. Malgré tout, aucun signe externe de toxicité n'a été détecté sur les deux premiers mois de croissance, alors que le stress se manifeste ensuite de façon dramatique surtout pour la reproduction des individus. Les tests plantes classiques de germination et de croissance sur quelques jours ne sont donc pas toujours assez sensibles pour détecter précocément les risques d'une pollution. Dans ce cas, le test des micronoyaux a une bonne valeur prédictive.

Il en est de même pour l'HM à 5  $\mu\text{mol/kg}$ . En effet, les plantes qui y sont exposées ne présentent aucun dommage « macroscopique » dans les premières semaines mais commencent à montrer des signes de sénescence au bout de 46 jours. Par contre, pour la concentration de 20  $\mu\text{mol/kg}$ , un simple test de croissance aurait pu aisément suffire à détecter la pollution, mais pas un test de germination.

Dans le cas du cuivre, à l'exception d'un seul individu, aucun marqueur « macroscopique » n'a été modifié sur toute la durée de l'expérience. Le pouvoir prédictif du test dans ce cas reste à approfondir.

A la lumière de ces constatations, nous pouvons conclure que le test des micronoyaux, en plus d'être un outil simple et efficace pour la détermination de la génotoxicité des matrices polluées, pourrait être un réel indicateur d'un risque potentiel d'altération et/ou de modification du cycle de vie des plantes poussant sur un sol pollué.

## 4 Application à la gestion des sols contaminés

Nous avons vu que les tests de génotoxicité ne doivent en aucun cas être conduits seuls mais au contraire être accompagnés *a minima* de tests plantes classiques. Seule la complémentarité de ces tests permet une vue d'ensemble des effets d'une matrice sur l'organisme. Dans l'idéal, en fonction de l'information qui nous intéresse, les tests plantes doivent être couplés à des tests sur d'autres organismes.

La décision d'intervenir sur un sol pour le dépolluer doit être mûrement réfléchi. En effet, le travail sur le sol contaminé de Neuves-Maisons nous a appris que dans certains cas, il n'est pas conseillé d'intervenir pour dépolluer un sol, car celui-ci perd sa structure et beaucoup de ses nutriments et peut devenir plus toxique qu'il n'était au départ (Bonnard et al. 2010). Il peut être préférable au contraire de le laisser reposer afin qu'il s'enrichisse naturellement en nutriments et matières organiques, ce qui peut avoir pour effet de diminuer progressivement sa toxicité. Dans un sol naturel, même fortement pollué, la biodisponibilité des substances toxiques peut en effet être très limitée. Un plan de remédiation est alors inutile, voire contre-productif car il perturberait fatalement l'équilibre du sol, ce qui pourrait avoir pour conséquence d'augmenter la mobilité des polluants (Chapman et al. 2010).

La faiblesse des tests effectués sur les sols vient du fait qu'ils exigent des étapes de préparation qui modifient l'équilibre des sols et peuvent mener à une surévaluation du risque (Chapman et al. 2010). Avant toute remédiation, il est donc nécessaire de vérifier que la biodisponibilité n'est pas augmentée par désorganisation de la structure du sol (van Herwijnen et al. 2007). De plus, *Vicia faba* entre autres est capable de diminuer le pH du sol dans sa rhizosphère afin d'augmenter l'absorption des nutriments (Yan et al. 1992). Ce faisant, les plantes peuvent augmenter la biodisponibilité des métaux du sol (Nowack et al. 2010). L'ensemble de ces éléments montre qu'il serait intéressant de développer des tests *in situ*.

## 5 Le programme Nanoalter

L'étude des sous-produits d'altération (SPA) de nanocomposites contenant des nanoparticules de TiO<sub>2</sub> nous a appris que même s'ils présentent une forte propension à constituer des agrégats de grande taille, les SPA sont internalisés dans les racines des plantes. Même si cette étude a été menée à des concentrations sans doute très supérieures à celles attendues dans l'environnement, l'internalisation de ces structures dans les tissus vivants a de quoi inquiéter. Pourtant, la grande quantité de SPA retrouvée dans la racine n'a eu quasiment aucun effet sur la physiologie de la plante, ce qui prouve que les matériaux s'y trouvaient sous une forme peu réactive, du moins après 48h d'exposition. Il reste nécessaire de mener des investigations pour prévoir le devenir de ce genre de structures à longue échéance, et leur effet à plus long terme sur les organismes vivants. Par ailleurs, si nous nous sommes focalisés sur l'étude des nanocomposites uniquement, il serait également intéressant d'évaluer l'écotoxicité de la totalité des composants des crèmes solaires.

## 6 Conclusion et perspectives

Notre travail illustre la pertinence du test des micronoyaux pour diverses applications en milieux liquide comme solide : évaluation de la génotoxicité de matrices polluées (GISFI), appréciation des risques inhérents à la dégradation de nanocomposites manufacturés dans l'environnement (Nanoalter).

Comme nous l'avons déjà souligné, ce test jouit d'une bonne reproductibilité, mais même si ses résultats semblent peu affectés par des variations mineures de protocole, l'harmonisation de ce dernier par une normalisation ISO permettrait une meilleure comparabilité entre les résultats des différents laboratoires. A cet égard, nos expériences ont permis d'initier le processus de normalisation du test qui est d'ores et déjà en cours, même s'il nécessite encore certains ajustements.

De plus, nous avons ouvert une voie non encore explorée, celle de la signification à long terme pour la plante des dommages génotoxiques visibles par le test des micronoyaux. Les premiers résultats laissent à supposer une perturbation du cycle de vie de la plante qui se manifeste tardivement et peut affecter sa croissance, son aspect, sa floraison ou sa fructification. Néanmoins, il est difficile de savoir si les anomalies constatées sont réellement



dues aux lésions génotoxiques ou si elles sont les conséquences d'un mécanisme indépendant inhérent à la molécule testée. En tout état de cause, que ces lésions génotoxiques soient directement responsables de l'altération du cycle de vie, ou que la présence de micronoyaux ne soit qu'un dommage collatéral d'un autre mécanisme responsable de la perturbation de ce cycle, la présence de ces indicateurs est forcément le témoin d'une grave perturbation.

Afin de connaître le véritable impact de la présence de micronoyaux dans les cellules de la plante, il faudrait créer des lésions génotoxiques dans les racines de jeunes pousses à l'aide d'un agent non rémanent, par exemple par le biais d'une irradiation (Minouflet et al. 2005), puis vérifier la formation de micronoyaux sur un groupe d'individus tandis que l'autre groupe serait repiqué dans un sol non pollué. En surveillant la croissance et le cycle de vie de ces individus, on pourrait ainsi connaître le véritable impact à long terme de la présence de lésions génotoxiques dans les racines d'une jeune plante.

En ce qui concerne le test des comètes, il mérite également sa place dans l'arsenal d'évaluation des matrices complexes ou de screening de nouvelles molécules, mais il exige une bonne prise en main et une relative expérience pour être fiable.

Pour compléter notre arsenal de tests de génotoxicité, il serait également possible d'avoir recours à la cytométrie de flux. Cette technique de pointe permet la détection et la quantification exacte des dommages chromosomiques (Monteiro et al. 2010).

# *Liste Bibliographique*

---



## A

- Abdel Migid HM, Azab YA, Ibrahim WM. 2007. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 66(1):57-64.
- AFNOR. 1996. NF X31-147. Soil Quality - Soils, sediments - Total solubilizing by acid attack. In: AFNOR, editor. p 127-133.
- AFNOR. 2004. NF T90-327. Soil Quality – Assessment of Genotoxic Effects to Higher plants – Micronucleus Test on *Vicia faba*. In: AFNOR, editor. Saint-Denis. p 13.
- AFSSET. 2010. Évaluation des risques liés aux nanomatériaux pour la population générale et pour l'environnement. 207 p.
- Aitken RJ, Chaudhry MQ, Boxall ABA, Hull M. 2006. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. *Occup. Med.* 56(5):300-306.
- Alva AK, Graham JH, Tucker DPH. 1993. Role of Calcium in Amelioration of Copper Phytotoxicity for *Citrus*. *Soil Science* 155(3):211-218.
- Amphlett GE, Delow GF. 1984. Statistical analysis of the micronucleus test. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 128(2):161-166.
- Andrew C, Peter TG, Timothy JW. 1997. Cell wall porosity and available surface area of wheat straw and wheat grain fractions. *J. Sci. Food Agric.* 75(3):289-295.
- Angelis K, Velemínský J, Rieger R, Heindorff K. 1986. Interaction of maleic hydrazide or N-methyl-N-nitrosourea with root tip DNA of in vitro cultured *Vicia faba* embryos. *Biol. Zentralbl.* 105:29-36.
- Appleton MD, Haab W, Eisenstadt ML, Rodgers R, Thoman CJ. 1981. Incorporation of maleic hydrazide into ribonucleic acid of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 29(5):986-989.
- Aravind P, Prasad MNV. 2003. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiol. Biochem.* 41(4):391-397.
- Asli S, Neumann PM. 2009. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. *Plant, Cell Environ.* 32(5):577-584.
- Auffan M, Rose J, Proux O, Borschneck D, Masion A, Chaurand P, Hazemann J-L, Chaneac C, Jolivet J-P, Wiesner MR and others. 2008. Enhanced Adsorption of Arsenic onto Maghemite Nanoparticles: As(III) as a Probe of the Surface Structure and Heterogeneity. *Langmuir* 24(7):3215-3222.
- Auffan M, Rose J, Wiesner MR, Bottero J-Y. 2009. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. *Environ. Pollut.* 157(4):1127-1133.

## B

- Babich H, Stotzky G. 1977. Reductions in the Toxicity of Cadmium to Microorganisms by Clay Minerals. *Appl. Environ. Microbiol.* 33(3):696-705.
- Baize D, Saby N, Walter C. 2006. Le cuivre extrait à l'EDTA dans les sols de France - Probabilités de carences et de toxicités selon la BDAT. *Etude et Gestion des Sols* 13(4):259-268.
- Barančíková G, Makovníková J. 2003. The influence of humic acid quality on the sorption and mobility of heavy metals. *Plant Soil Environ.* 49(12):565-571.
- Baron-Epel O, Gharyal PK, Schindler M. 1988. Pectins as mediators of wall porosity in soybean cells. *Planta* 175(3):389-395.
- Barrena R, Casals E, Colón J, Font X, Sánchez A, Puentes V. 2009. Evaluation of the ecotoxicity of model nanoparticles. *Chemosphere* 75:850-857.
- Battin TJ, Kammer Fvd, Weilhartner A, Ottofuelling S, Hofmann T. 2009. Nanostructured TiO<sub>2</sub>: Transport Behavior and Effects on Aquatic Microbial Communities under Environmental Conditions. *Environ. Sci. Technol.* 43(21):8098-8104.
- Bauch T, Böcker W, Mallek U, Müller W-U, Streffer C. 1999. Optimization and Standardization of the "Comet Assay" for Analyzing the Repair of DNA Damage in Cells. *Strahlenther. Onkol.* 175(7):333-340.
- Baun A, Hartmann N, Grieger K, Kusk K. 2008a. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. *Ecotoxicology* 17(5):387-395.
- Baun A, Sørensen SN, Rasmussen RF, Hartmann NB, Koch CB. 2008b. Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. *Aquat. Toxicol.* 86(3):379-387.
- Bennett MD. 1976. DNA amount, latitude, and crop plant distribution. *Environ. Exp. Bot.* 16(2-3):93-98, IN1-IN2, 99-108.
- Béraud E. 2007. Etude des effets génotoxiques et de l'induction des phytochélatines chez *Vicia faba* (Fabaceae) exposée au cadmium. Application du test *Vicia*-micronoyaux à des matrices complexes. Metz: Université de Metz. 107 p.
- Béraud E, Cotelle S, Leroy P, Féraud J-F. 2007. Genotoxic effects and induction of phytochelatin in the presence of cadmium in *Vicia faba* roots. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 633(2):112-116.
- Berzelius JJ. 1839. *Traité de chimie, tome premier*: Bruxelles. 605 p.
- Besnard E, Chenu C, Robert M. 2001. Influence of organic amendments on copper distribution among particle-size and density fractions in Champagne vineyard soils. *Environ. Pollut.* 112(3):329-337.
- Biswas PK, Hall O, Mayberry BD. 1967. Metabolism of Maleic Hydrazide in Tea, *Camellia sinensis*. *Physiol. Plant.* 20(4):819-824.
- Blaise C, Gagné F, Féraud J, Eullaffroy P. 2008. Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environ. Toxicol.* 23(5):591-598.

- Bonnard M, Devin S, Leyval C, Morel JL, Vasseur P. 2010. The influence of thermal desorption on genotoxicity of multipolluted soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(5):955-960.
- Borboa L, De La Torre C. 1996. The genotoxicity of Zn (II) and Cd (II) in *Allium cepa* root meristematic cells. *New Phytol.* 134:481-486.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Brams E. 1969. The mucilaginous layer of *citrus* roots — Its delineation in the rhizosphere and removal from roots. *Plant Soil* 30(1):105-108.
- Brar SK, Verma M, Tyagi RD, Surampalli RY. 2010. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge - Evidence and impacts. *Waste Manage.* 30(3):504-520.
- Brun LA, Maillet J, Hinsinger P, Pépin M. 2001. Evaluation of copper availability to plants in copper-contaminated vineyard soils. *Environ. Pollut.* 111(2):293-302.
- Brun LA, Maillet J, Richarte J, Herrmann P, Remy JC. 1998. Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environ. Pollut.* 102(2-3):151-161.
- Brunet L, Lyon DY, Hotze EM, Alvarez PJJ, Wiesner MR. 2009. Comparative Photoactivity and Antibacterial Properties of C60 Fullerenes and Titanium Dioxide Nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 43(12):4355-4360.
- Burton NA, Green DVS, Hillier IH, Taylor PJ, Vincent MA, Woodcock S. 1993. Tautomeric equilibria of maleic hydrazide in the gas phase and in aqueous solution: an experimental and theoretical study. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* 3:331 - 335.

## C

- Callaghan JJ, Grun P. 1961. Incorporation of C<sup>14</sup>-labeled maleic hydrazide into the root-tip cells of *Allium cernuum*, *Vicia faba*, and *Tradescantia paludosa*. *J Biophys Biochem Cytol* 10:567-575.
- Carpita N, Sabulase D, Montezinos D, Delmer DP. 1979. Determination of the Pore Size of Cell Walls of Living Plant Cells. *Science* 205(4411):1144-1147.
- CE. 2008. RÈGLEMENT (CE) No 889/2008 DE LA COMMISSION du 5 septembre 2008 portant modalités d'application du règlement (CE) no 834/2007 du Conseil relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques en ce qui concerne la production biologique, l'étiquetage et les contrôles. In: européenne C, editor: J.O. 18.9.2008. p 250.
- Chakraborty R, Mukherjee A, Mukherjee A. 2009. Evaluation of genotoxicity of coal fly ash in *Allium cepa* root cells by combining comet assay with the *Allium* test. *Environ. Monit. Assess.* 153(1):351-357.
- Chapman EEV, Dave G, Murimboh JD. 2010. Ecotoxicological risk assessment of undisturbed metal contaminated soil at two remote lighthouse sites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(5):961-969.

- Chiang C-W, Wang A, Mou C-Y. 2006. CO oxidation catalyzed by gold nanoparticles confined in mesoporous aluminosilicate Al-SBA-15: Pretreatment methods. *Catalysis Today* 117(1-3):220-227.
- Cho U-H, Seo N-H. 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Sci.* 168(1):113-120.
- Clemens S. 2001. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta* 212(4):475-486.
- Cobbett CS. 2000a. Phytochelatin biosynthesis and function in heavy-metal detoxification. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3(3):211-216.
- Cobbett CS. 2000b. Phytochelatin and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiol.* 123(3):825-832.
- Cook CM, Kostidou A, Vardaka E, Lanaras T. 1997. Effects of copper on the growth, photosynthesis and nutrient concentrations of *Phaseolus* plants. *Photosynthetica* 34(2):179-193.
- Corbesier L, Coupland G. 2006. The quest for florigen: a review of recent progress. *J. Exp. Bot.* 57(13):3395-3403.
- Cordova Rosa EV, Valgas C, Souza-Sierra MM, Corrêa AXR, Radetski CM. 2003. Biomass growth, micronucleus induction, and antioxidant stress enzyme responses in *Vicia faba* exposed to cadmium in solution. *Environ. Toxicol. Chem.* 22(3):645-649.
- Cosa G, Focsaneanu KS, McLean JRN, McNamee JP, Scaiano JC. 2001. Photophysical Properties of Fluorescent DNA-dyes Bound to Single- and Double-stranded DNA in Aqueous Buffered Solution. *Photochem. Photobiol.* 73(6):585-599.
- Cotelle S. 1999. Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide de plantes supérieures. Metz: Université de Metz. 179 p.
- Cotelle S, Féraud JF. 1999. Comet assay in genetic ecotoxicology: A review. *Environ. Mol. Mutag.* 34(4):246-255.
- Cotelle S, Masfaraud J-F, Féraud J-F. 1997. Ecogenotoxicity of contaminated soil samples assessed by the *Allium/Vicia* root tip test. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 379(1, Supplement 1):S104-S104.
- Cotelle S, Masfaraud J-F, Féraud J-F. 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia*-micronucleus and the *Tradescantia*-micronucleus assays. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 426(2):167-171.
- Coupland D, Peel AJ. 1971. Uptake and Incorporation of <sup>14</sup>C-labelled Maleic Hydrazide into the Roots of *Salix viminalis*. *Physiol. Plant.* 25(1):141-144.
- Courbot M, Diez L, Ruotolo R, Chalot M, Leroy P. 2004. Cadmium-Responsive Thiols in the Ectomycorrhizal Fungus *Paxillus involutus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(12):7413-7417.
- Currier HB, Crafts AS. 1950. Maleic Hydrazide, a Selective Herbicide. *Science* 111(2876):152-153.
- Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. 2000. Biphasic effect of copper on the ascorbate-glutathione pathway in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* seedlings during the early stages of metal assimilation. *Physiol. Plant.* 110(4):512-517.

## D

- da Rosa Corrêa AX, Rörig LR, Verdinelli MA, Cotelle S, Féraud J-F, Radetski CM. 2006. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. *Sci. Total Environ.* 357(1-3):120-127.
- Daniel M-C, Astruc D. 2003. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews* 104(1):293-346.
- Das NK. 1962. Synthetic capacities of chromosome fragments correlated with their ability to maintain nucleolar material. *J. Cell Biol.* 15(1):121-130.
- Dazy M, Jung V, Féraud J-F, Masfarau J-F. 2008. Ecological recovery of vegetation on a coke-factory soil: Role of plant antioxidant enzymes and possible implications in site restoration. *Chemosphere* 74(1):57-63.
- De Marco A, De Simone C, D'Ambrosio C, Owczarek M. 1999. Buthionine sulfoximine prevents the reduction of the genotoxic activity of maleic hydrazide by soil humic substances in *Vicia faba* seedlings. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 438(2):89-95.
- 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.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 344(1-2):5-12.
- De Marco A, Owczarek M, Raglione M, Lanza B. 2005. Reduced clastogenic activity of maleic hydrazide in *Vicia faba* seedlings grown in a situation of overcrowding stress. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 581(1-2):133-139.
- 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/Genetic Toxicology* 206(3):311-315.
- De Vos CHR, Vonk MJ, Vooijs R, Schat H. 1992. Glutathione Depletion Due to Copper-Induced Phytochelatin Synthesis Causes Oxidative Stress in *Silene cucubalus*. *Plant Physiol.* 98(3):853-858.
- Degrassi F, Rizzoni M. 1982. Micronucleus test in *Vicia faba* root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. *Mutat. Res.-Environ. Mutag. Related Subj.* 97(1):19-33.
- Devaux A. 2006. Essais des comètes en conditions alcalines, cours inclus dans la formation continue "Essais d'Ecotoxicité et de Cancérogénicité des substances chimiques, Produits Phytosanitaires, Biocides, Effluents et sols Contaminés", Laboratoire d'Ecotoxicité et Santé Environnementale. Metz.
- Dhawan A, Bajpayee M, Parmar D. 2009. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol. Toxicol.* 25(1):5-32.
- Domene X, Ramírez W, Mattana S, Alcañiz JM, Andrés P. 2008. Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organisms test battery. *Environ. Pollut.* 155:227-236.
- Domir SC. 1980. Fate of [<sup>14</sup>C]daminozide and [<sup>14</sup>C]maleic hydrazide in American elm (*Ulmus americana* L.). *Pestic. Sci.* 11(4):418-422.



- Dorn PB, Vipond TE, Salanitro JP, Wisniewski HL. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, Microtox(R), and plants. *Chemosphere* 37(5):845-860.
- Drażkiewicz M, Skórzyńska-Polit E, Krupa Z. 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* 17(4):379-387.
- Duan C-Q, Hu B, Jiang X-H, Wen C-H, Wang Z, Wang Y-X. 1999. Genotoxicity of water samples from Dianchi lake detected by the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 426(2):121-125.
- Duan C, Hu B, Guo T, Luo M, Xu X, Chang X, Wen C, Meng L, Yang L, Wang H. 2000. Changes of reliability and efficiency of micronucleus bioassay in *Vicia faba* after exposure to metal contamination for several generations. *Environ. Exp. Bot.* 44(1):83-92.
- Duc G. 1997. Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crops Res.* 53:99-109.

## E

- Ebbs S, Lau I, Ahner B, Kochian L. 2002. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Planta* 214(4):635-640.
- El Hajjouji H, Pinelli E, Guirese M, Merlina G, Revel JC, Hafidi M. 2007. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 634(1-2):25-31.
- Elhajouji A, Tibaldi F, Kirsch-Volders M. 1997. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis* 12(3):133-140.
- Ennever FK, Andreano G, Rosenkranz HS. 1988. The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. *Mutation Research/Genetic Toxicology* 205(1-4):99-105.
- Ercal N, Gurer-Orhan H, Aykin-Burns N. 2001. Toxic Metals and Oxidative Stress Part I: Mechanisms Involved in Metal-induced Oxidative Damage. *Curr. Top. Med. Chem.* 1:529-539.
- Evans HJ, Scott D. 1963. Influence of DNA synthesis on the production of chromatid aberrations by X rays and maleic hydrazide in *Vicia faba*. *Genetics* 49:17-38.
- Evans LT. 1959. Environmental Control of Flowering in *Vicia faba* L. *Ann. Bot.* 23(4):521-546.

## F

- Fenech M. 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat. Res.* 392:11-18.
- Feretti D, Zerbini I, Ceretti E, Villarini M, Zani C, Moretti M, Fatigoni C, Orizio G, Donato F, Monarca S. 2008. Evaluation of chlorite and chlorate genotoxicity using plant bioassays and in vitro DNA damage tests. *Water Res.* 42(15):4075-4082.

- Fernandes TCC, Mazzeo DEC, Marin-Morales MA. 2007. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. *Pestic. Biochem. Physiol.* 88(3):252-259.
- Fernández M, Cagigal E, Vega MM, Urzelai A, Babín M, Pro J, Tarazona JV. 2005. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 62:174-184.
- Ferrara G, Loffredo E, Senesi N. 2004. Anticlastogenic, antitoxic and sorption effects of humic substances on the mutagen maleic hydrazide tested in leguminous plants. *Eur. J. Soil Sci.* 55(3):449-458.
- Ferrara G, Loffredo E, Simeone R, Senesi N. 2000. Evaluation of antimutagenic and desmutagenic effects of humic and fulvic acids on root tips of *Vicia faba*. *Environ. Toxicol.* 15(5):513-517.
- Figueroa JAL, Wrobel K, Afton S, Caruso JA, Felix Gutierrez Corona J, Wrobel K. 2008. Effect of some heavy metals and soil humic substances on the phytochelatin production in wild plants from silver mine areas of Guanajuato, Mexico. *Chemosphere* 70(11):2084-2091.
- Frear DS, Swanson HR. 1978. Behavior and fate of [<sup>14</sup>C]maleic hydrazide in tobacco plants. *J. Agric. Food Chem.* 26(3):660-666.
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W. 1995. DNA repair and mutagenesis. Washington, DC: ASM Press. 699 p.
- Fuhrer J. 1982. Ethylene Biosynthesis and Cadmium Toxicity in Leaf Tissue of Beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* 70(1):162-167.
- Fusconi A, Repetto O, Bona E, Massa N, Gallo C, Dumas-Gaudot E, Berta G. 2006. Effects of cadmium on meristem activity and nucleus ploidy in roots of *Pisum sativum* L. cv. Frisson seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 58(1-3):253-260.

## G

- Gallais A, Bannerot H. 1992. Amélioration des espèces végétales cultivées: objectifs et critères de sélection. Paris: INRA
- Gao F, Hong F, Liu C, Zheng L, Su M, Wu X, Yang F, Wu C, Yang P. 2006. Mechanism of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on promoting photosynthetic carbon reaction of spinach. *Biol. Trace Elem. Res.* 111(1):239-253.
- Gao F, Liu C, Qu C, Zheng L, Yang F, Su M, Hong F. 2008. Was improvement of spinach growth by nano-TiO<sub>2</sub> treatment related to the changes of Rubisco activase? *BioMetals* 21(2):211-217.
- Garbey C, Thiébaud G, Muller S. 2004. Morphological plasticity of a spreading aquatic macrophyte, *Ranunculus peltatus*, in response to environmental variables. *Plant Ecology* 173(1):125-137.
- Gianazza E, Wait R, Sozzi A, Regondi S, Saco D, Labra M, Agradi E. 2007. Growth and protein profile changes in *Lepidium sativum* L. plantlets exposed to cadmium. *Environ. Exp. Bot.* 59(2):179-187.

- Gichner T. 2003. Differential genotoxicity of ethyl methanesulphonate, N-ethyl-N-nitrosourea and maleic hydrazide in tobacco seedlings based on data of the Comet assay and two recombination assays. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 538(1-2):171-179.
- Gichner T, Badayev SA, Demchenko SI, Relichová J, Sandhu SS, Usmanov PD, Usmanova O, Velemínský J. 1994. Arabidopsis assay for mutagenicity. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 310(2):249-256.
- Gichner T, Lovecká P, Kochánková L, Macková M, Demnerová K. 2007. Monitoring toxicity, DNA damage, and somatic mutations in tobacco plants growing in soil heavily polluted with polychlorinated biphenyls. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 629(1):1-6.
- Gichner T, Lovecka P, Vrchetova B. 2008. Genomic damage induced in tobacco plants by chlorobenzoic acids-Metabolic products of polychlorinated biphenyls. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 657(2):140-145.
- Gichner T, Menke M, Stavreva DA, Schubert I. 2000a. Maleic hydrazide induces genotoxic effects but no DNA damage detectable by the Comet assay in tobacco and field beans. *Mutagenesis* 15(5):385-389.
- Gichner T, Mühlfeldová Z. 2002. Induced DNA Damage Measured by the Comet Assay in 10 Weed Species. *Biol. Plant.* 45(4):509-516.
- Gichner T, Patková Z, Száková J, Demnerová K. 2004. Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 559(1-2):49-57.
- Gichner T, Ptáček O, Stavreva DA, Plewa MJ. 1999. Comparison of DNA damage in plants as measured by single cell gel electrophoresis and somatic leaf mutations induced by monofunctional alkylating agents. *Environ. Mol. Mutag.* 33(4):279-286.
- Gichner T, Ptáček O, Stavreva DA, Wagner ED, Plewa MJ. 2000b. A comparison of DNA repair using the comet assay in tobacco seedlings after exposure to alkylating agents or ionizing radiation. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 470(1):1-9.
- Godet F, Vasseur P, Babut S. 1993. Essais de génotoxicité in vitro et in vivo applicables à l'environnement hydrique. *Rev. Sci. Eau/J. Water Sci.* 6:285-314.
- Gómez-Arroyo S, Cortés-Eslava J, Bedolla-Cansino RM, Villalobos-Pietrini R, Calderón-Segura ME, Ramírez-Delgado Y. 2001. Sister Chromatid Exchanges Induced by Heavy Metals in *Vicia Faba*. *Biol. Plant.* 44(4):591-594.
- Grant WF. 1994. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 310(2):175-185.
- Grant WF. 1999. Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations--a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 426(2):107-112.
- Grant WF, Owens ET. 2001. Chromosome aberration assays in *Pisum* for the study of environmental mutagens. *Mutat. Res. - Rev. Mut. Res.* 488(2):93-118.
- Grill E, Gekeler W, Winnacker EL, Zenk HH. 1986. Homo-phytochelatin are heavy metal-binding peptides of homo-glutathione containing Fabales. *FEBS Lett.* 205(1):47-50.

- Grill E, Löffler S, Winnacker E-L, Zenk MH. 1989. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86(18):6838-6842.
- Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH. 1985. Phytochelatins: The Principal Heavy-Metal Complexing Peptides of Higher Plants. Science 230(4726):674-676.
- Grill E, Winnacker E-L, Zenk MH. 1987. Phytochelatins, a class of heavy-metal-binding peptides from plants, are functionally analogous to metallothioneins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(2):439-443.
- Gupta M, Cuypers A, Vangronsveld J, Clijsters H. 1999. Copper affects the enzymes of the ascorbate-glutathione cycle and its related metabolites in the roots of *Phaseolus vulgaris*. Physiol. Plant. 106(3):262-267.
- Gusmão R, Ariño C, Díaz-Cruz JM, Esteban M. 2010. Electrochemical survey of the chain length influence in phytochelatins competitive binding by cadmium. Anal. Biochem. 406:61-69.
- Gustavino B, Degrassi F, Filipponi R, Modesti D, Tanzarella C, Rizzoni M. 1994. Mitotic indirect non-disjunction in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes. Mutagenesis 9(1):17-21.

## H

- Haber F, Weiss J. 1934. The Catalytic Decomposition of Hydrogen Peroxide by Iron Salts. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences 147(861):332-351.
- Hall JL. 2002. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. J. Exp. Bot. 53(366):1-11.
- Hamon RE, McLaughlin MJ, Naidu R, Correll R. 1998. Long-Term Changes in Cadmium Bioavailability in Soil. Environ. Sci. Technol. 32(23):3699-3703.
- Hansen AM, Maya P. 1997. Adsorption-desorption behaviors of Pb and Cd in Lake Chapala, Mexico. Environ. Int. 23(4):553-564.
- Hart JJ, Welch RM, Norvell WA, Kochian LV. 2002. Transport interactions between cadmium and zinc in roots of bread and durum wheat seedlings. Physiol. Plant. 116(1):73-78.
- Hartwig A. 1998. Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. Toxicol. Lett. 102-103:235-239.
- Haruta M. 1997. Size- and support-dependency in the catalysis of gold. Catalysis Today 36(1):153-166.
- Hayashi M, Hashimoto S, Sakamoto Y, Yoshimura I. 1994. Statistical analysis of data in mutagenicity assays: rodent micronucleus assay. Environ. Health Perspect. 102 (Suppl 1):49-52.
- Heindorff K, Michaelis A, Aurich O, Rieger R. 1985. Peroxide pretreatment of *Vicia faba* root-tip meristems results in "clastogenic adaptation" to maleic hydrazide but not to TEM. Mutation Research Letters 142(1-2):23-27.

- Heindorff K, Rieger R. 1984. Exogenous factors affecting yield and intrachromosomal distribution of maleic hydrazide-induced chromatid aberrations in *Vicia faba*. Biol. Zentralbl. 103(1):9-23.
- Heindorff K, Rieger R, Velemínský J, Gichner T. 1984. A comparative study of the clastogenicity of maleic hydrazide and some of its putative degradation products. Mutation Research Letters 140:123-126.
- Heiss S, Wachter A, Bogs J, Cobbett C, Rausch T. 2003. Phytochelatin synthase (PCS) protein is induced in *Brassica juncea* leaves after prolonged Cd exposure. J. Exp. Bot. 54(389):1833-1839.
- Hoagland DR, Arnon DI. 1950. The water-culture method for growing plants without soil. Univ. Calif. Agric. Exp. Stn. Berkeley, CA, Circular No. 347:1-39.
- Hock B, Elstner EF. 2005. Plant Toxicology. New York: Marcel Dekker. 616 p.
- Hofmann H-J, Cimiraglia R, Tomasi J, Bonaccorsi R. 1991. Structure and tautomerism of maleic hydrazide. J. Mol. Struct. 227:321-326.
- Hong F-S, Yang P, F.-Q. Gao, Liu C, Zheng L, Yang F, J Z. 2005a. Effect of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on spectral characterization of photosystem II particles from spinach Chemical Research in Chinese Universities 21(2):196-200.
- Hong F, Yang F, Liu C, Gao Q, Wan Z, Gu F, Wu C, Ma Z, Zhou J, Yang P. 2005b. Influences of Nano-TiO<sub>2</sub> on the chloroplast aging of spinach under light. Biol. Trace Elem. Res. 104(3):249-260.
- Hooper DU, Vitousek PM. 1997. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. Science 277:1302-1305.
- Hossain Z, Huq F. 2002. Studies on the interaction between Cd<sup>2+</sup> ions and DNA. J. Inorg. Biochem. 90(3-4):85-96.
- Howden R, Goldsbrough PB, Andersen CR, Cobbett CS. 1995. Cadmium-Sensitive, cad1 Mutants of *Arabidopsis thaliana* Are Phytochelatin Deficient. Plant Physiol. 107(4):1059-1066.
- Hund-Rinke K, Simon M. 2006. Ecotoxic Effect of Photocatalytic Active Nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) on Algae and Daphnids (8 pp). Environ. Sci. Pollut. R. 13(4):225-232.
- Hylmö B. 1955. Passive Components in the Ion Absorption of the Plant. I. The Zonal Ion and Water Absorption in Brouwer's Experiments. Physiol. Plant. 8(2):433-449.
- Hylmö B. 1958. Passive Components in the Ion Absorption of the Plant II. The Zonal Water Flow, Ion Passage, and Pore Size in Roots of *Vicia Faba*. Physiol. Plant. 11(2):382-400.

## J

- Jouili H, El Ferjani E. 2003. Changes in antioxidant and lignifying enzyme activities in sunflower roots (*Helianthus annuus* L.) stressed with copper excess. C. R. Biol. 326(7):639-644.
- Jun-hui Z, Hang M. 2009. Eco-toxicity and metal contamination of paddy soil in an e-wastes recycling area. J. Hazard. Mater. 165:744-750.

**K**

- Kaegi R, Ulrich A, Sinnet B, Vonbank R, Wichser A, Zuleeg S, Simmler H, Brunner S, Vonmont H, Burkhardt M and others. 2008. Synthetic TiO<sub>2</sub> nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environ. Pollut.* 156(2):233-239.
- Kahru A, Dubourguier HC, Blinova I, Ivask A, Kasemets K. 2008. Biotests and Biosensors for Ecotoxicology of Metal Oxide Nanoparticles: A Minireview. *Sensors* 8:5153-5170.
- Kanaya N, Gill BS, Grover IS, Murin A, Osiecka R, Sandhu SS, Andersson HC. 1994. *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 310(2):231-247.
- Kapustka LA, Reporter M. 1993. Terrestrial primary producers. In: Calow P, editor. *Handbook of ecotoxicology*, vol. 1. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. p 278–298.
- Karavaev VA, Baulin AM, Gordienko TV, Dovydkov SA, Tikhonov AN. 2001. Changes in the Photosynthetic Apparatus of Broad Bean Leaves as Dependent on the Content of Heavy Metals in the Growth Medium. *Russ. J. Plant Physl.* 48(1):38-44.
- Kirsch-Volders M. 1997. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 392(1-2):1-4.
- Klančnik K, Drobne D, Valant J, Dolenc Koce J. 2011. Use of a modified *Allium* test with nanoTiO<sub>2</sub>. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74(1):85-92.
- 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. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 420(1-3):37-48.
- Komossa D, Sandermann H, Jr. 1995. Plant metabolic studies of the growth regulator maleic hydrazide. *J. Agric. Food Chem.* 43(10):2713-2715.
- Koppen G, Angelis KJ. 1998. Repair of X-ray induced DNA damage measured by the comet assay in roots of *Vicia faba*. *Environ. Mol. Mutag.* 32(3):281-285.
- 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. Mutag. Related Subj.* 360(3):193-200.
- Kozak J, West CE, White C, da Costa-Nunes JA, Angelis KJ. 2009. Rapid repair of DNA double strand breaks in *Arabidopsis thaliana* is dependent on proteins involved in chromosome structure maintenance. *DNA Repair* 8(3):413-419.
- Kristen U. 1997. Use of higher plants as screens for toxicity assessment. *Toxicol. In Vitro* 11(1-2):181-191.
- Kumaravel TS, Jha AN. 2006. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 605(1-2):7-16.
- Kurepa J, Paunesku T, Vogt S, Arora H, Rabatic BM, Lu J, Wanzer MB, Woloschak GE, Smalle JA. 2010. Uptake and Distribution of Ultrasmall Anatase TiO<sub>2</sub> Alizarin Red S Nanoconjugates in *Arabidopsis thaliana*. *Nano Lett.* 10(7):2296-2302.

Kus M, Gernjak W, Ibanez PF, Rodriguez SM, Galvez JB, Icli S. 2006. A Comparative Study of Supported TiO<sub>2</sub> as Photocatalyst in Water Decontamination at Solar Pilot Plant Scale. *Journal of Solar Energy Engineering* 128(3):331-337.

## L

- Labille J, Brant J. 2010. Stability of nanoparticles in water. *Nanomedicine* 5(6):985-998.
- Labille J, Feng J, Botta C, Borschneck D, Sammut M, Cabie M, Auffan M, Rose J, Bottero J-Y. 2010. Aging of TiO<sub>2</sub> nanocomposites used in sunscreen. Dispersion and fate of the degradation products in aqueous environment. *Environ. Pollut.* 158(12):3482-3489.
- Landberg T, Greger M. 2002. Differences in oxidative stress in heavy metal resistant and sensitive clones of *Salix viminalis*. *J. Plant Physiol.* 159(1):69-75.
- Lee S, Moon JS, Ko T-S, Petros D, Goldsbrough PB, Korban SS. 2003. Overexpression of *Arabidopsis* Phytochelatin Synthase Paradoxically Leads to Hypersensitivity to Cadmium Stress. *Plant Physiol.* 131(2):656-663.
- Leme DM, de Angelis DdF, Marin-Morales MA. 2008. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons present in waters impacted by an oil spill on the genetic material of *Allium cepa* root cells. *Aquat. Toxicol.* 88(4):214-219.
- Leme DM, Marin-Morales MA. 2009. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutat. Res. - Rev. Mut. Res.* 682(1):71-81.
- Liang Y, Wong JWC, Wei L. 2005. Silicon-mediated enhancement of cadmium tolerance in maize (*Zea mays* L.) grown in cadmium contaminated soil. *Chemosphere* 58(4):475-483.
- Lin A, Zhu Y, Tong Y. 2005. Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and imidacloprid. *Sci. China Ser. C (Life Sci.)* 48(0):7-13.
- Lin AJ, Zhang XH, Chen MM, Cao Q. 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *J. Environ. Sci. (China)* 19(5):596-602.
- Lin D, Xing B. 2007. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. *Environ. Pollut.* 150(2):243-250.
- Liu D, Jiang W, Gao X. 2003a. Effects of Cadmium on Root Growth, Cell Division and Nucleoli in Root Tip Cells of Garlic. *Biol. Plant.* 47(1):79-83.
- Liu D, Jiang W, Li M. 1992. Effects of trivalent and hexavalent chromium on root growth and cell division of *Allium cepa*. *Hereditas* 117(1):23-29.
- Liu D, Jiang W, Wang W, Zhao F, Lu C. 1994. Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. *Environ. Pollut.* 86(1):1-4.
- Liu J, Li K, Xu J, Liang J, Lu X, Yang J, Zhu Q. 2003b. Interaction of Cd and five mineral nutrients for uptake and accumulation in different rice cultivars and genotypes. *Field Crops Res.* 83(3):271-281.
- Liu W, Yang YS, Li P, Zhou Q, Sun T. 2004. Root growth inhibition and induction of DNA damage in soybean (*Glycine max*) by chlorobenzenes in contaminated soil. *Chemosphere* 57(2):101-106.

- Liu W, Zhu L-S, Wang J, Wang J-H, Xie H, Song Y. 2009. Assessment of the Genotoxicity of Endosulfan in Earthworm and White Clover Plants Using the Comet Assay. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 56(4):742-746.
- Lock K, Janssen CR. 2001. Cadmium Toxicity for Terrestrial Invertebrates: Taking Soil Parameters Affecting Bioavailability Into Account. *Ecotoxicology* 10(5):315-322.
- Lors C, Ponge J-F, Martínez Aldaya M, Damidot D. 2010. Comparison of solid-phase bioassays and ecoscores to evaluate the toxicity of contaminated soils. *Environ. Pollut.* 158(8):2640-2647.
- Lütz-Meindl U, Lütz C. 2006. Analysis of element accumulation in cell wall attached and intracellular particles of snow algae by EELS and ESI. *Micron* 37(5):452-458.

## M

- Ma T-H. 1982. *Vicia* cytogenetic tests for environmental mutagens - A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.* 99:257-271.
- Ma T-H, Grant WF, de Serres FJ. 1997. The genotoxicity monitoring of air, water and soil - A preliminary report of the International Programme on Plant Bioassays (IPPB). *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 379(1, Supplement 1):S99-S99.
- Ma T-H, Xu Z, Xu C, McConnell H, Valtierra Rabago E, Adriana Arreola G, Zhang H. 1995. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat. Res.-Environ. Mutag. Related Subj.* 334(2):185-195.
- Ma X, Geiser-Lee J, Deng Y, Kolmakov A. 2010. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. *Sci. Total Environ.* 408(16):3053-3061.
- Madrid F, Díaz-Barrientos E, Madrid L. 2008. Availability and bio-accessibility of metals in the clay fraction of urban soils of Sevilla. *Environ. Pollut.* 156(3):605-610.
- Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T. 1996. The Composition of Metals Bound to Class III Metallothionein (Phytochelatin and Its Desglycyl Peptide) Induced by Various Metals in Root Cultures of *Rubia tinctorum*. *Plant Physiol.* 110(4):1145-1150.
- Majer BJ, Tschерko D, Paschke A, Wennrich R, Kundi M, Kandeler E, Knasmüller S. 2002. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 515(1-2):111-124.
- Mancini A, Buschini A, Restivo FM, Rossi C, Poli P. 2006. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Sci.* 170(4):845-852.
- Manier N, Deram A, Le Curieux F, Marzin D. 2009. Comparison Between New Wild Plant *Trifolium repens* and *Vicia faba* on their Sensitivity in Detecting the Genotoxic Potential of Heavy Metal Solutions and Heavy Metal-Contaminated Soils. *Water, Air, Soil Pollut.* 202(1):343-352.
- Marcano L, Carruyo I, Del Campo A, Montiel X. 2004. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. *Environ. Res.* 94(2):221-226.



- Marcato-Romain C-E, Guiresse M, Cecchi M, Cotelle S, Pinelli E. 2009. New direct contact approach to evaluate soil genotoxicity using the *Vicia faba* micronucleus test. *Chemosphere* 77(3):345-350.
- Markossian KA, Kurganov BI. 2003. Copper Chaperones, Intracellular Copper Trafficking Proteins. Function, Structure, and Mechanism of Action. *Biochemistry (Moscow)* 68(8):827-837.
- Masciangioli T, Zhang WX. 2003. Environmental technologies at the nanoscale. Washington, DC, ETATS-UNIS: American Chemical Society. 7 p.
- Matamoros MA, Moran JF, Iturbe-Ormaetxe I, Rubio MC, Becana M. 1999. Glutathione and Homoglutathione Synthesis in Legume Root Nodules. *Plant Physiol.* 121(3):879-888.
- McCarthy JF, Zachara JM. 1989. Subsurface transport of contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 23(5):496-502.
- Mehra RK, Winge DR. 1988. Cu(I) binding to the *Schizosaccharomyces pombe* [gamma]-glutamyl peptides varying in chain lengths. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 265(2):381-389.
- Mendoza-Cózatl DG, Moreno-Sánchez R. 2006. Control of glutathione and phytochelatin synthesis under cadmium stress. Pathway modeling for plants. *J. Theor. Biol.* 238(4):919-936.
- Menke M, Angelis KJ, Schubert I. 2000a. Detection of specific DNA lesions by a combination of comet assay and FISH in plants. *Environ. Mol. Mutag.* 35(2):132-138.
- Menke M, Chen IP, Angelis KJ, Schubert I. 2001. DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 493(1-2):87-93.
- Menke M, Meister A, Schubert I. 2000b. N-Methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage detected by the comet assay in *Vicia faba* nuclei during all interphase stages is not restricted to chromatid aberration hot spots. *Mutagenesis* 15(6):503-506.
- Miao M, Fu R, Yang D, Zheng L. 1999. *Vicia* root micronucleus assay on the clastogenicity of water samples from the Xiaoqing River in Shandong Province of the People's Republic of China. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 426(2):143-145.
- Minissi S, Caccese D, Passafiume F, Grella A, Ciccotti E, Rizzoni M. 1998. Mutagenicity (micronucleus test in *Vicia faba* root tips), polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metal content of sediments collected in Tiber river and its tributaries within the urban area of Rome. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 420(1-3):77-84.
- 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. Environ. Mutag.* 393(1-2):17-21.
- Minouflet M, Ayrault S, Badot P-M, Cotelle S, Ferard J-F. 2005. Assessment of the genotoxicity of <sup>137</sup>Cs radiation using *Vicia*-micronucleus, *Tradescantia*-micronucleus and *Tradescantia*-stamen-hair mutation bioassays. *J. Environ. Radioact.* 81(2-3):143-153.
- Misra RR, Smith GT, Waalkes MP. 1998. Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines. *Toxicology* 126(2):103-114.
- Møller P. 2006. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98(4):336-345.

- Monarca S, Rizzoni M, Gustavino B, Zani C, Alberti A, Feretti D, Zerbini I. 2003. Genotoxicity of surface water treated with different disinfectants using *in situ* plant tests. *Environ. Mol. Mutag.* 41(5):353-359.
- Monteiro MS, Rodriguez E, Loureiro J, Mann RM, Soares AMVM, Santos C. 2010. Flow cytometric assessment of Cd genotoxicity in three plants with different metal accumulation and detoxification capacities. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 73(6):1231-1237.
- Mony C, Thiébaud G, Muller S. 2007. Changes in morphological and physiological traits of the freshwater plant *Ranunculus peltatus* with the phosphorus bioavailability. *Plant Ecology* 191(1):109-118.
- Mueller TO, Mondy NI. 1977. Effect of sprout inhibition on the lipid composition of potatoes. *J. Food Sci.* 42(3):618-621.

## N

- Nakagawa Y, Wakuri S, Sakamoto K, Tanaka N. 1997. The photogenotoxicity of titanium dioxide particles. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 394(1-3):125-132.
- Navarro E, Baun A, Behra R, Hartmann N, Filser J, Miao A-J, Quigg A, Santschi P, Sigg L. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17(5):372-386.
- Noodén LD. 1969. The Mode of Action of Maleic Hydrazide: Inhibition of Growth. *Physiol. Plant.* 22(2):260-270.
- Noodén LD. 1970. Metabolism and Binding of <sup>14</sup>C-Maleic Hydrazide. *Plant Physiol.* 45(1):46-52.
- Nowack B, Bucheli TD. 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150(1):5-22.
- Nowack B, Schulin R, Luster J. 2010. Metal fractionation in a contaminated soil after reforestation: Temporal changes versus spatial variability. *Environ. Pollut.* 158(10):3272-3278.

## O

- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J. 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 113:823-839.
- Ojima Y, Nishioka M, Matsumoto M, Taya M. 2009. Quantification of DNA damage by the comet assay in radish sprouts exposed to excess light irradiation. *Biochem. Eng. J.* 46(1):69-72.
- Olive PL, Banath JP. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protocols* 1(1):23-29.
- Ouariti O, Boussama N, Zarrouk M, Cherif A, Habib Ghorbal M. 1997. Cadmium- and copper-induced changes in tomato membrane lipids. *Phytochemistry* 45(7):1343-1350.

- Ouzounidou G, Ciamporová M, Moustakas M, Karataglis S. 1995. Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress--I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots. *Environ. Exp. Bot.* 35(2):167-176.
- Ovečka M, Lang I, Baluška F, Ismail A, Illeš P, Lichtscheidl IK. 2005. Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* 226(1):39-54.

## P

- Page V, Weisskopf L, Feller U. 2006. Heavy metals in white lupin: uptake, root-to-shoot transfer and redistribution within the plant. *New Phytol.* 171(2):329-341.
- Pal R, Rai J. 2010. Phytochelatins: Peptides Involved in Heavy Metal Detoxification. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 160(3):945-963.
- 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-Genetic Toxicology* 343(2-3):75-84.
- Panda KK, Patra J, Panda BB. 1997. Persistence of cadmium-induced adaptive response to genotoxicity of maleic hydrazide and methyl mercuric chloride in root meristem cells of *Allium cepa* L.: Differential inhibition by cycloheximide and buthionine sulfoximine. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 389(2-3):129-139.
- Pandard P, Devillers J, Charissou A-M, Poulsen V, Jourdain M-J, Féraud J-F, Grand C, Bispo A. 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Sci. Total Environ.* 363(1-3):114-125.
- Patra J, Baisakhi B, Mohapatro MK, Panda BB. 2000. Aluminium triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in plant cells in vivo. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 465(1-2):1-9.
- Patra J, Panda KK, Panda BB. 1997. Differential induction of adaptive responses by paraquat and hydrogen peroxide against the genotoxicity of methyl mercuric chloride, maleic hydrazide and ethyl methane sulfonate in plant cells in vivo. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 393(3):215-222.
- Patra J, Sahoo MK, Panda BB. 2005. Salicylic acid triggers genotoxic adaptation to methyl mercuric chloride and ethyl methane sulfonate, but not to maleic hydrazide in root meristem cells of *Allium cepa* L. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 581(1-2):173-180.
- Pätsikkä E, Kairavuo M, Sersen F, Aro E-M, Tyystjärvi E. 2002. Excess Copper Predisposes Photosystem II to Photoinhibition in Vivo by Outcompeting Iron and Causing Decrease in Leaf Chlorophyll. *Plant Physiol.* 129(3):1359-1367.
- Perfus-Barbeoch L, Leonhardt N, Vavasseur A, Forestier C. 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channels and disturbs the plant water status. *Plant J.* 32(4):539-548.
- Pich A, Scholz G. 1996. Translocation of copper and other micronutrients in tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.): nicotianamine-stimulated copper transport in the xylem. *J. Exp. Bot.* 47(1):41-47.

- Pincheira J, López-Sáez JF, Carrera P, Navarrete MH, de la Torre C. 2003. Effect of caffeine on in vivo processing of alkylated bases in proliferating plant cells. *Cell Biol. Int.* 27(10):837-843.
- Poli P, de Mello MA, Buschini A, de Castro VLSS, Restivo FM, Rossi C, Zucchi TMAD. 2003. Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 540(1):57-66.
- Ponnampalam R, Mondy NI. 1985. Effect of Sprout Inhibitors and Nitrogen Fertilization on Nitrate-N Content of Potato Tubers. *J. Food Sci.* 50(5):1246-1248.
- Poschenrieder C, Gunse B, Barcelo J. 1989. Influence of Cadmium on Water Relations, Stomatal Resistance, and Abscisic Acid Content in Expanding Bean Leaves. *Plant Physiol.* 90(4):1365-1371.
- Posmyk M, Kontek R, Janas K. 2008. Red cabbage extract limits copper stress injury in meristematic cells of *Vicia faba*. *Acta Physiol. Plant.* 30(4):481-491.
- Prasad MNV. 1995. Cadmium toxicity and tolerance in vascular plants. *Environ. Exp. Bot.* 35(4):525-545.
- Proseus TE, Boyer JS. 2005. Turgor Pressure Moves Polysaccharides into Growing Cell Walls of *Chara corallina*. *Ann. Bot.* 95(6):967-979.

## R

- Radetski CM, Ferrari B, Cotelle S, Masfaraud JF, Ferard JF. 2004. Evaluation of the genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Sci. Total Environ.* 333(1-3):209-216.
- Rahoui S, Chaoui A, Ferjani E. 2008. Differential sensitivity to cadmium in germinating seeds of three cultivars of faba bean (*Vicia faba* L.). *Acta Physiol. Plant.* 30(4):451-456.
- 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. Environ. Mutag.* 390(1-2):121-127.
- Reese RN, Mehra RK, Tarbet EB, Winge DR. 1988. Studies on the gamma-glutamyl Cu-binding peptide from *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 263(9):4186-4192.
- Reijnders L. 2006. Cleaner nanotechnology and hazard reduction of manufactured nanoparticles. *J. Clean. Prod.* 14(2):124-133.
- Reijnders L. 2008. Hazard reduction for the application of titania nanoparticles in environmental technology. *J. Hazard. Mater.* 152(1):440-445.
- Restivo FM, Laccone MC, Buschini A, Rossi C, Poli P. 2002. Indoor and outdoor genotoxic load detected by the Comet assay in leaves of *Nicotiana tabacum* cultivars Bel B and Bel W3. *Mutagenesis* 17(2):127-134.
- Rieger R, Michaelis A, Green M. 1968. A glossary of genetics and cytogenetics, 3rd Eds. London: Allen and Unwin. 507 p.

- Rieger R, Michaelis A, Takehisa S. 1990. Involvement of phytochelatins in NiCl<sub>2</sub>-triggered protection against induction of chromatid aberrations by TEM and MH in *Vicia faba* root tip meristems. *Mutation Research Letters* 244(1):31-35.
- Rizzoni M, Tanzarella C, Gustavino B, Degrassi F, Guarino A, Vitagliano E. 1989. Indirect mitotic nondisjunction in *Vicia faba* and Chinese hamster cells. *Chromosoma* 97(4):339-346.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M. 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* 722(1-2):225-254.
- Ruiz Flores LE, Madrigal-Bujaidar E, Salazar M, Chamorro G. 2003. Anticlastogenic effect of *Spirulina maxima* extract on the micronuclei induced by maleic hydrazide in *Tradescantia*. *Life Sci.* 72(12):1345-1351.
- Salin ML. 1988. Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiol. Plant.* 72(3):681-689.

## S

- Sancenón V, Puig S, Mira H, Thiele DJ, Peñarrubia L. 2003. Identification of a copper transporter family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 51(4):577-587.
- Sandalio LM, Dalurzo HC, Gómez M, Romero-Puertas MC, del Río LA. 2001. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *J. Exp. Bot.* 52(364):2115-2126.
- Sandhu SS, de Serres FJ, Gopalan HNB, Grant WF, Svendsgaard D, Velemínský J, Becking GC. 1994. International program on chemical safety's collaborative study on plant systems to detect genotoxic effects of environmental chemicals: Results and recommendations. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 310(2):257-263.
- Sang N, Li G. 2004. Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tips of *Vicia faba*. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 560(2):159-165.
- Sanità di Toppi L, Gabbrielli R. 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ. Exp. Bot.* 41(2):105-130.
- Sanyal D, Bangerth F. 1998. Stress induced ethylene evolution and its possible relationship to auxin-transport, cytokinin levels, and flower bud induction in shoots of apple seedlings and bearing apple trees. *Plant Growth Regul.* 24(2):127-134.
- Sarwar N, Saifullah, Malhi SS, Zia MH, Naeem A, Bibi S, Farid G. 2010. Role of mineral nutrition in minimizing cadmium accumulation by plants. *J. Sci. Food Agric.* 90(6):925-937.
- Sauvé S, McBride MB, Norvell WA, Hendershot WH. 1997. Copper Solubility and Speciation of In Situ Contaminated Soils: Effects of Copper Level, pH and Organic Matter. *Water, Air, Soil Pollut.* 100(1):133-149.
- Schat H, Llugany M, Vooijs R, Hartley-Whitaker J, Bleeker PM. 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptive heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *J. Exp. Bot.* 53(379):2381-2392.

- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium-Induced Changes in Antioxidative Systems, Hydrogen Peroxide Content, and Differentiation in Scots Pine Roots. *Plant Physiol.* 127(3):887-898.
- Scott D, Evans HJ. 1964. Influence of the nucleolus on DNA synthesis and mitosis in *Vicia faba*. *Exp. Cell Res.* 36(1):145-159.
- Seeger E, Baun A, Kästner M, Trapp S. 2009. Insignificant acute toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to willow trees. *J. Soils Sed.* 9(1):46-53.
- Sela M, Tel-Or E, Fritz E, Huttermann A. 1988. Localization and Toxic Effects of Cadmium, Copper, and Uranium in *Azolla*. *Plant Physiol.* 88(1):30-36.
- Seth CS, Misra V, Chauhan LKS, Singh RR. 2008. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and Comet assay approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71(3):711-716.
- Silva L, Oliva M, Azevedo A, Araújo J. 2006. Responses of restinga plant species to pollution from an iron pelletization factory. *Water, Air, Soil Pollut.* 175(1):241-256.
- Singer VL, Lawlor TE, Yue S. 1999. Comparison of SYBR® Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the *Salmonella*/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 439(1):37-47.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175(1):184-191.
- Smith AE, Zukel JW, Stone GM, Riddell JA. 1959. Plant Growth Inhibitors, Factors Affecting the Performance of Maleic Hydrazide. *J. Agric. Food Chem.* 7(5):341-344.
- Sobrino-Plata J, Ortega-Villasante C, Laura Flores-Cáceres M, Escobar C, Del Campo FF, Hernández LE. 2009. Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere* 77(7):946-954.
- Song YF, Wilke BM, Song XY, Gong P, Zhou QX, Yang GF. 2006. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and heavy metals (HMs) as well as their genotoxicity in soil after long-term wastewater irrigation. *Chemosphere* 65(10):1859-1868.
- Souguir D, Ferjani E, Ledoigt G, Goupil P. 2008. Exposure of *Vicia faba* and *Pisum sativum* to copper-induced genotoxicity. *Protoplasma* 233(3):203-207.
- Sriussadaporn C, Yamamoto K, Fukushi K, Simazaki D. 2003. Comparison of DNA damage detected by plant comet assay in roadside and non-roadside environments. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 541(1-2):31-44.
- Stampoulis D, Sinha SK, White JC. 2009. Assay-Dependent Phytotoxicity of Nanoparticles to Plants. *Environ. Sci. Technol.* 43(24):9473-9479.
- Stavreva DA, Gichner T. 2002. DNA damage induced by hydrogen peroxide in cultured tobacco cells is dependent on the cell growth stage. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 514(1-2):147-152.
- Steinkellner H, Mun-Sik K, Helma C, Ecker S, Ma T-H, Horak O, Kundi M, Knasmüller S. 1998. Genotoxic effects of heavy metals: Comparative investigation with plant bioassays. *Environ. Mol. Mutag.* 31(2):183-191.

- Su M, Wu X, Liu C, Qu C, Liu X, Chen L, Huang H, Hong F. 2007. Promotion of Energy Transfer and Oxygen Evolution in Spinach Photosystem II by Nano-anatase TiO<sub>2</sub>. *Biol. Trace Elem. Res.* 119(2):183-192.
- Sun H, Zhang X, Niu Q, Chen Y, Crittenden J. 2007. Enhanced Accumulation of Arsenate in Carp in the Presence of Titanium Dioxide Nanoparticles. *Water, Air, Soil Pollut.* 178(1):245-254.
- Sun Y, Li Z, Guo B, Chu G, Wei C, Liang Y. 2008. Arsenic mitigates cadmium toxicity in rice seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 64:264–270.
- Swietlinska Z, Zuk J. 1978. Cytotoxic effects of maleic hydrazide. *Mutat. Res.-Rev. Genet. Toxicol.* 55(1):15-30.
- Szöllősi R, Varga IS, Erdei L, Mihalik E. 2009. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72(5):1337-1342.

## T

- Tang D, Wen L-S, Santschi PH. 2000. Analysis of biogenic thiols in natural water samples by high-performance liquid chromatographic separation and fluorescence detection with ammonium 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (SBD-F). *Anal. Chim. Acta* 408(1-2):299-307.
- Temminghoff EJM, Van der Zee SEATM, de Haan FAM. 1997. Copper Mobility in a Copper-Contaminated Sandy Soil as Affected by pH and Solid and Dissolved Organic Matter. *Environ. Sci. Technol.* 31(4):1109-1115.
- Thomé OW. 1885. *Flora von Deutschland, Österreich und der Schweiz* Gera, Germany.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutag.* 35(3):206-221.
- Tukendorf A, Rauser WE. 1990. Changes in glutathione and phytochelatins in roots of maize seedlings exposed to cadmium. *Plant Sci.* 70(2):155-166.

## U

- Ünyayar S, Celik A, Cekic FO, Gozel A. 2006. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutagenesis* 21(1):77-81.
- Upadhyay RK, Panda SK. 2009. Copper-induced growth inhibition, oxidative stress and ultrastructural alterations in freshly grown water lettuce (*Pistia stratiotes* L.). *C. R. Biol.* 332(7):623-632.

## V

- van Herwijnen R, Laverge T, Poole J, Hodson ME, Hutchings TR. 2007. The effect of organic materials on the mobility and toxicity of metals in contaminated soils. *Appl. Geochem.* 22(11):2422-2434.
- Vasseur P, Bonnard M, Palais F, Eom I-C, Morel J-L. 2008. Bioavailability of Chemical Pollutants in Contaminated Soils and Pitfalls of Chemical Analyses in Hazard Assessment. *Environ. Toxicol.* 23(5):652-656.
- Vatamaniuk OK, Mari Sp, Lu Y-P, Rea PA. 1999. AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis*: Isolation and in vitro reconstitution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(12):7110-7115.
- Vatamaniuk OK, Mari Sp, Lu Y-P, Rea PA. 2000. Mechanism of Heavy Metal Ion Activation of Phytochelatin (PC) Synthase. *J. Biol. Chem.* 275(40):31451-31459.
- Vázquez S, Goldsbrough P, Carpena RO. 2006. Assessing the relative contributions of phytochelatins and the cell wall to cadmium resistance in white lupin. *Physiol. Plant.* 128(3):487-495.
- Vázquez S, Goldsbrough P, Carpena RO. 2009. Comparative analysis of the contribution of phytochelatins to cadmium and arsenic tolerance in soybean and white lupin. *Plant Physiol. Biochem.* 47(1):63-67.

## W

- Wakefield G, Green M, Lipscomb S, Flutter B. 2004. Modified titania nanomaterials for sunscreen applications reducing free radical generation and DNA damage. *Materials Science and Technology* 20:985-988.
- Wang B, Xie Z, Chen J, Jiang J, Su Q. 2008. Effects of field application of phosphate fertilizers on the availability and uptake of lead, zinc and cadmium by cabbage (*Brassica chinensis* L.) in a mining tailing contaminated soil. *J. Environ. Sci. (China)* 20(9):1109-1117.
- Wang C-T, Ro S-H. 2006. Surface nature of nanoparticle gold/iron oxide aerogel catalysts. *J. Non-Cryst. Solids* 352(1):35-43.
- Wang H. 1999. Clastogenicity of chromium contaminated soil samples evaluated by *Vicia* root-micronucleus assay. *Mutat. Res.-Fundam. Mol. Mech. Mutag.* 426(2):147-149.
- Wang S-H, Yang Z-M, Yang H, Lu B, Li S-Q, Lu Y-P. 2004. Copper-induced stress and antioxidative responses in roots of *Brassica juncea* L. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 45:203-212.
- Wang W. 1991. Literature review on higher plants for toxicity testing. *Water, Air, Soil Pollut.* 59(3):381-400.
- Wang Z, Lee Y-H, Wu B, Horst A, Kang Y, Tang YJ, Chen D-R. 2010. Anti-microbial activities of aerosolized transition metal oxide nanoparticles. *Chemosphere* 80(5):525-529.



- Warne MSJ, Heemsbergen D, McLaughlin M, Bell M, Broos K, Whatmuff M, Barry G, Nash D, Pritchard D, Penney N. 2008. Models for the field-based toxicity of copper and zinc salts to wheat in 11 Australian soils and comparison to laboratory-based models. *Environ. Pollut.* 156(3):707-714.
- Weigel HJ, Jager HJ. 1980. Subcellular Distribution and Chemical Form of Cadmium in Bean Plants. *Plant Physiol.* 65(3):480-482.
- White PA, Claxton LD. 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat. Res. - Rev. Mut. Res.* 567(2-3):227-345.
- Wilke BM, Riepert F, Koch C, Kühne T. 2008. Ecotoxicological characterization of hazardous wastes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70(2):283-293.
- Wu F-B, Chen F, Wei K, Zhang G-P. 2004. Effect of cadmium on free amino acid, glutathione and ascorbic acid concentrations in two barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.) differing in cadmium tolerance. *Chemosphere* 57(6):447-454.
- Wu FB, Zhang G. 2002. Genotypic Differences in Effect of Cd on Growth and Mineral Concentrations in Barley Seedlings. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 69(2):219-227.

## Y

- Yan F, Schubert S, Mengel K. 1992. Effect of Low Root Medium pH on Net Proton Release, Root Respiration, and Root Growth of Corn (*Zea mays* L.) and Broad Bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol.* 99(2):415-421.
- Yang F, Hong F, You W, Liu C, Gao F, Wu C, Yang P. 2006. Influence of nano-anatase TiO<sub>2</sub> on the nitrogen metabolism of growing spinach. *Biol. Trace Elem. Res.* 110(2):179-190.
- Yang F, Liu C, Gao F, Su M, Wu X, Zheng L, Hong F, Yang P. 2007. The Improvement of Spinach Growth by Nano-anatase TiO<sub>2</sub> Treatment Is Related to Nitrogen Photoreduction. *Biol. Trace Elem. Res.* 119(1):77-88.
- Yang L, Watts DJ. 2005. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 158(2):122-132.
- Yi H, Meng Z. 2003. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 537(1):109-114.
- Yildiz M, Cigerci IH, Konuk M, Fatih Fidan A, Terzi H. 2009. Determination of genotoxic effects of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root cells by chromosome aberration and comet assays. *Chemosphere* 75(7):934-938.
- Yu H, Wang J, Fang W, Yuan J, Yang Z. 2006. Cadmium accumulation in different rice cultivars and screening for pollution-safe cultivars of rice. *Sci. Total Environ.* 370(2-3):302-309.

## Z

- Zenk MH. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants - a review. *Gene* 179(1):21-30.

- Zhang F, Zhang H, Wang G, Xu L, Shen Z. 2009. Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *J. Hazard. Mater.* 168(1):76-84.
- Zhang W-X. 2003. Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. *J. Nano. Res.-SW* 5(3):323-332.
- Zhang Y, Xiao H. 1998. Antagonistic effect of calcium, zinc and selenium against cadmium induced chromosomal aberrations and micronuclei in root cells of *Hordeum vulgare*. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 420(1-3):1-6.
- Zhao Xu, Li Z, Chen Y, Shi L, Zhu Y. 2007. Solid-phase photocatalytic degradation of polyethylene plastic under UV and solar light irradiation. *J. Mol. Catal. A-Chem.* 268(1-2):101-106.
- Zheng L, Hong F, Lu S, Liu C. 2005. Effect of nano-TiO<sub>2</sub> on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biol. Trace Elem. Res.* 104(1):83-91.
- Zheng L, Su M, Liu C, Chen L, Huang H, Wu X, Liu X, Yang F, Gao F, Hong F. 2007a. Effects of Nanoanatase TiO<sub>2</sub> on Photosynthesis of Spinach Chloroplasts Under Different Light Illumination. *Biol. Trace Elem. Res.* 119(1):68-76.
- Zheng L, Su M, Wu X, Liu C, Qu C, Chen L, Huang H, Liu X, Hong F. 2007b. Effects of Nano-anatase on Spectral Characteristics and Distribution of LHCII on the Thylakoid Membranes of Spinach. *Biol. Trace Elem. Res.* 120(1):273-283.
- Zheng L, Su M, Wu X, Liu C, Qu C, Chen L, Huang H, Liu X, Hong F. 2008. Antioxidant Stress is Promoted by Nano-anatase in Spinach Chloroplasts Under UV-B Radiation. *Biol. Trace Elem. Res.* 121(1):69-79.
- Zhong Y, Feng SL, Luo Y, Zhang GD, Kong ZM. 2001. Evaluating the Genotoxicity of Surface Water of Yangzhong City Using the *Vicia Faba* Micronucleus Test and the Comet Assay. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67(2):217-224.
- Zhu YL, Pilon-Smits EAH, Tarun AS, Weber SU, Jouanin L, Terry N. 1999. Cadmium Tolerance and Accumulation in Indian Mustard Is Enhanced by Overexpressing gamma -Glutamylcysteine Synthetase. *Plant Physiol.* 121(4):1169-1177.



# ANNEXES

---



# **TABLE DES ANNEXES**

## **ANNEXE 1**

**Dosages des sols de Neuves-Maisons (GISFI)**

## **ANNEXE 2**

**Composition des solutions**

## **ANNEXE 3**

**Trucs et astuces pour le test des comètes**

## **ANNEXE 4**

**Caractéristiques des sols LUFA utilisés**



# ANNEXE 1

## Dosages des sols de Neuves-Maisons (GISFI)

Percolats du 11/09/2007

Parcelle	Hauteur d'eau (cm)	Temp. (°C)	pH	Conductivité	Oxygène dissous (mg/L)	HAP tot (µg/L)
1TC	12	15,6	7,7	3,53	1,61	160
2MS	0					
3VS	18	15,8	8,02	3,41	1,31	223
4VS	13	15,9	7,66	3,14	0,58	188
5MSm	0					
6MSm	0					
7TD	0					
8MS	0					
9TC	15	16,3	7,95	3,44	1,44	168
10TN	19	16,2	7,94	3,30	1,39	176
11VS	19	16,2	7,87	3,42	1,19	201
12TD	0					
13TD	0					
14MSm	0					
15VS	17	16,3	7,71	3,29	1,22	196
16TD	0					
17TN	21	16,8	7,94	3,15	1,69	166
18TN	22	16,7	7,84	3,25	1,54	166
19TN	25	16,8	7,68	3,10	1,27	167
20TC	20	16,5	7,91	3,38	1,42	164
21MSm	1					
22MS	0					
23MS	0					
24TC	18	16,6	7,36	3,33	0,16	128



### Percolats du 14/12/2007

Parcelle	Hauteur d'eau (cm)	Temp. (°C)	pH	Conductivité	Oxygène dissous (mg/L)	HAP tot (µg/L)
1TC	>60	7,4	7,62	3,61	0,18	183
2MS	>60	7,6	7,78	3,00	0,08	288
3VS	>60	7,3	7,94	3,21	0,18	249
4VS	>60	6,9	7,97	3,17	0,11	244
5MSm	>60	7,7	7,76	3,07	0,16	264
6MSm	>60	7,7	7,85	3,07	0,08	288
7TD	1					
8MS	>60	7,05	7,86	3,23	0,13	270
9TC	>60	8,6	7,82	3,62	0,16	180
10TN	>60	8,2	7,78	3,59	0,21	188
11VS	>60	7,9	7,95	3,15	0,10	226
12TD	2					
13TD	5					
14MSm	>60	8,05	7,84	3,07	0,13	273
15VS	>60	8,1	7,91	3,10	0,19	230
16TD	2					
17TN	>60	8,2	7,85	3,41	0,19	182
18TN	>60	8,0	7,80	3,47	0,18	179
19TN	>60	8,1	7,82	3,38	0,07	188
20TC	>60	7,8	7,86	3,53	0,17	175
21MSm	>60	8,4	7,83	2,85	0,06	276
22MS	>60	8,0	7,79	3,10	0,12	267
23MS	>60	8,2	7,89	2,94	0,12	277
24TC	>60	7,9	7,83	3,48	0,15	176

### Percolats du 7/04/2008

Parcelle	Hauteur d'eau (cm)	Temp. (°C)	pH	Conductivité	Oxygène dissous (mg/L)	HAP tot (µg/L)
1TC	16	6.8	8.3	260	0.04	197
2MS	15	6.8	8.32	276	-	326
3VS	22	6.7	8.29	270		243
4VS	19	6.5	8.21	275		238
5MSm	15	6.4	8.26	269		281
6MSm	13	6.3	8.24	282		294
7TD	13	6.5	8.22	244		130
8MS	15	6.4	8.16	284		288
9TC	18	6.8	8.1	261		200
10TN	18	7	7.94	267		202
11VS	21	6.7	7.93	267		216
12TD	12	6.7	8.06	243		129
13TD	13	6.8	8.06	244		113
14MSm	15	6.9	7.95	277		276
15VS	21	7.2	7.98	270		213
16TD	1					
17TN	16	6.8	7.97	268		197
18TN	18	7	7.86	261		195
19TN	17	6.9	7.98	261		202
20TC	16	6.9	7.93	259		197
21MSm	1					
22MS	14	6.8	8	274		301
23MS	15	7	7.91	281		293
24TC	17	6.8	7.85	259		197

## Analyses de sols

Les tableaux suivants présentent les caractéristiques et les dosages des nutriments, métaux ou HAP sur les parcelles de Neuves-Maisons. Nous avons calculé pour chacune des trois dates la moyenne et l'écart-type de chaque lot de 4 parcelles ayant subi le même traitement.

<b>Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques</b>	<b>Codes</b>
Matière Sèche	MS
Naphthalène	HAP 1
Acenaphtylène	HAP 2
Acénaphène	HAP 3
Fluorène	HAP 4
Phénanthrène	HAP 5
Anthracène	HAP 6
Fluoranthène	HAP 7
Pyrène	HAP 8
Benzo[a]anthracène	HAP 9
Chrysène	HAP 10
Indeno[1.2.3-cd]pyrène	HAP 11
Benzo[b]fluoranthène	HAP 12
Benzo[k]fluoranthène	HAP 13
Benzo[a]pyrène	HAP 14
Dibenzo[a.h]anthracène	HAP 15
Benzo[g.h.i]perylène	HAP 16
16 HAP US-EPA (mg/kg MS)	HAP-tot

Le dosage des 16 HAPs a été effectué selon le protocole suivant :

*Lyophilisation (24 heures)*

*Tamisage à 2 mm*

*Broyage à 500 µm de la fraction < à 2 mm*

*Extraction ASE 200 au dichlorométhane (130°C pendant 5 minutes)*

*Injection sur un couplage GC-MS après calibration et ajout de standards internes*

Les résultats présentés correspondent à la moyenne de deux réplicats

Paramètres agronomiques (g/kg sauf C/N et pH, sans unité)																
23/04/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	Azote tot	Azote tot	C/N	C/N	C org	C org	mat org	mat org	pH	pH	CaCo3	CaCo3	P2O5	P2O5		
TC	2,622500	0,216083	23,32500	0,89954	61,12500	4,828647	105,6500	8,39583	7,087500	0,130480	11,82000	1,61584	0,053000	0,005477		
MS	2,557500	0,193111	24,77500	2,35991	63,32500	8,023455	109,6250	13,93661	6,815000	0,420674	11,65250	7,09519	0,060250	0,012121		
VS	2,660000	0,105830	24,12500	1,78396	64,27500	6,116303	111,1500	10,73732	7,007500	0,114127	11,85750	3,18421	0,056750	0,006702		
MSm	2,662500	0,242539	23,82500	1,65605	63,20000	2,070427	109,5000	3,41565	6,950000	0,223159	12,64000	4,62353	0,057250	0,009465		
TD	1,047250	0,082160	55,52500	4,33311	57,92500	2,673793	100,2500	4,57347	7,665000	0,017321	38,35000	2,31301	0,083750	0,011325		
TN	2,600000	0,089069	23,72500	0,64485	61,67500	2,338625	106,7500	4,27200	7,140000	0,076158	12,93000	3,39798	0,056250	0,006397		
Éléments échangeables à l'acétate d'ammonium (g/kg)								Éléments extractibles à l'EDTA (mg/kg)								
23/04/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	Ca	Ca	Mg	Mg	K	K	Cu-dispo	Cu-dispo	Fe	Fe	Mn	Mn	Zn-dispo	Zn-dispo		
TC	37,92500	1,956826	0,232750	0,017689	0,354250	0,017970	13,45000	0,994987	99,5250	5,49265	88,9500	6,13324	185,0000	14,21267		
MS	34,97500	2,634862	0,190000	0,027833	0,340750	0,029602	10,95000	0,655744	95,3000	8,01748	184,7500	50,80272	196,5000	16,90168		
VS	36,42500	0,784750	0,222000	0,013292	0,352750	0,031479	12,05000	0,732575	94,9000	4,03072	160,7500	20,62967	188,5000	11,15049		
MSm	36,02500	2,099802	0,178250	0,016358	0,315000	0,030930	10,59500	0,614356	90,3250	3,83525	184,0000	22,77425	184,5000	21,12660		
TD	24,25000	1,707825	0,101000	0,002160	0,305750	0,008302	11,22500	0,618466	27,7250	1,18145	89,4750	1,31498	207,2500	9,21502		
TN	37,35000	1,001665	0,281000	0,064327	0,365000	0,025140	13,52500	0,499166	102,4500	2,73435	91,6750	13,04208	191,7500	13,22561		
Métaux totaux (mg/kg)																
23/04/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD		
parcelle	B	B	Cr	Cr	Co	Co	Cu-tot	Cu-tot	Ni	Ni	Zn-tot	Zn-tot	Cd	Cd		
TC	4,815000	0,214243	761,750	151,3701	24,92500	1,424488	137,0000	6,37704	96,2750	4,83210	2150,000	197,1463	2,945000	0,106615		
MS	4,482500	0,588296	996,000	406,3832	21,45000	5,587188	130,5000	19,95829	81,5750	20,96209	1820,000	375,5884	2,532500	0,749283		
VS	4,862500	0,222767	1188,250	875,9103	20,82500	6,623884	137,2500	21,40677	81,2000	24,83479	1773,250	640,4547	2,500000	0,760701		
MSm	4,600000	0,451737	771,500	158,7587	24,05000	1,008299	137,7500	13,14978	91,6500	2,89079	1955,000	185,9211	2,905000	0,079373		
TD	2,212500	0,045735	468,500	52,1888	26,87500	0,801561	110,2500	5,79511	100,4750	1,25266	2685,000	134,7838	2,307500	0,275484		
TN	5,195000	0,349237	753,500	193,7516	24,82500	0,386221	136,5000	11,56143	96,2000	1,67332	2117,500	122,8481	2,915000	0,098826		
Métaux totaux (mg/kg)																
23/04/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD			moyenne	SD		
parcelle	Mb	Mb	Pb	Pb	Th	Th	Hg	Hg	As	As			mat sèche %	mat sèche %		
TC	11,42500	1,203813	653,7500	94,0261	0,820750	0,133540	4,780000	0,346410	61,90000	5,95819			86,85000	0,404145		
MS	11,47500	0,403113	478,5000	115,1593	0,751750	0,051136	4,965000	1,307173	53,02500	11,54913			92,07500	0,704154		
VS	11,32500	0,287228	450,5000	184,6158	0,677750	0,192360	3,940000	1,410674	50,87500	18,32655			89,65000	0,506623		
MSm	11,05000	0,525991	518,5000	67,2978	0,796250	0,026005	6,217500	1,644068	60,17500	1,94487			91,92500	0,330404		
TD	13,17500	1,687947	763,2500	36,1236	0,879000	0,020216	1,685000	0,064550	66,17500	1,71731			93,57500	0,377492		
TN	11,47500	0,287228	556,2500	46,7003	0,762750	0,077839	4,465000	0,476760	60,90000	0,49666			87,25000	0,881287		

<b>HAP (mg/kg matière sèche)</b>																
23/04/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	HAP 1	HAP 1	HAP2	HAP2	HAP3	HAP3	HAP4	HAP4	HAP5	HAP5	HAP6	HAP6	HAP7	HAP7	HAP7	HAP7
TC	35,72500	6,08516	52,17500	3,58643	51,22500	6,56423	43,72500	6,04614	128,6750	15,09666	220,5500	17,2328	238,5250	18,41582		
MS	49,97500	7,54735	58,15000	7,13886	68,80000	12,75539	63,75000	16,41574	173,5250	36,61224	286,4750	46,0349	284,4250	49,33433		
VS	43,92500	9,13359	53,97500	5,37052	65,05000	12,76205	60,05000	15,75003	156,3250	30,87948	279,8750	109,0798	261,2750	29,41591		
MSm	47,87500	15,48513	55,07500	5,60082	60,57500	5,72152	52,92500	4,22877	160,3250	18,74680	271,2750	35,6658	281,5250	32,41485		
TD	2,77500	0,82614	2,22500	0,09574	0,95000	0,23805	1,77500	0,20616	7,4500	2,45017	9,1500	2,4090	11,5000	3,61663		
TN	35,62500	1,47054	50,62500	2,09185	44,45000	4,12513	39,32500	4,94596	120,5500	9,96042	208,6000	28,5196	226,2000	13,39577		

<b>HAP (mg/kg matière sèche)</b>																
23/04/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	HAP8	HAP8	HAP9	HAP9	HAP10	HAP10	HAP10	HAP11	HAP11	HAP12	HAP12	HAP12	HAP13	HAP13	HAP14	HAP14
TC	175,5500	11,44800	148,8750	8,81906	99,8500	7,43079	122,7750	6,76283	99,0500	4,78922	35,87500	1,46145	125,5250	5,43223		
MS	206,0000	34,36267	173,1000	23,21996	114,8000	16,13320	132,6250	7,61025	108,5250	10,38793	39,27500	4,25314	141,3250	12,29942		
VS	189,3250	16,73387	162,4500	14,88276	102,9250	12,59560	130,1500	10,90825	105,4250	7,60016	37,60000	2,37346	132,3500	10,32327		
MSm	206,0750	24,16476	175,4500	20,77507	114,3500	11,97623	135,1000	13,52504	110,6750	7,84108	40,37500	2,77173	144,1250	12,08094		
TD	7,4750	2,53689	7,2250	1,78582	4,6000	1,56844	7,5250	1,16154	6,4250	1,50859	2,47500	0,45735	6,2500	0,83467		
TN	169,2750	10,12830	144,8000	11,07941	96,8750	4,02275	121,8000	2,83666	95,2250	8,20950	35,40000	1,16619	124,2250	7,18581		

<b>HAP (mg/kg matière sèche)</b>						
23/04/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	HAP15	HAP15	HAP16	HAP16	HAP-tot	HAP-tot
TC	18,40000	0,948683	50,05000	1,88591	1646,625	114,6599
MS	18,97500	0,899537	53,87500	3,10953	1973,600	263,8447
VS	19,35000	1,292285	52,20000	3,89615	1852,225	283,1826
MSm	19,37500	1,203813	54,52500	3,44129	1929,600	206,0508
TD	2,35000	0,057735	3,27500	0,68496	83,450	20,0580
TN	17,95000	0,785281	50,57500	1,32508	1581,525	83,1602

Paramètres agronomiques (g/kg sauf C/N et pH, sans unité)																
11/09/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	Azote tot	Azote tot	C/N	C/N	C org	C org	mat org	mat org	pH	pH	CaCo3	CaCo3	P2O5	P2O5		
TC	2,635000	0,089629	24,55000	0,90370	64,52500	0,932291	111,5000	1,73205	7,242500	0,171537	12,91250	2,84733	0,056000	0,008756		
MS	2,952500	0,142215	23,60000	1,55563	69,60000	4,815254	120,2500	8,26136	7,132500	0,330290	15,37750	5,23011	0,064000	0,011860		
VS	2,602500	0,071822	25,15000	0,91104	65,50000	3,207283	113,5000	5,68624	7,292500	0,089954	14,27500	1,95000	0,057000	0,006683		
MSm	2,870000	0,074386	22,90000	1,00000	65,77500	3,623419	113,7500	6,18466	7,177500	0,075000	12,58750	3,50485	0,059000	0,009764		
TD	1,065000	0,053229	59,92500	1,56285	63,87500	4,097459	110,5000	7,00000	7,687500	0,009574	40,32500	1,71148	0,073250	0,004500		
TN	2,517500	0,077190	23,80000	1,01653	59,97500	4,232710	103,6250	7,36405	7,297500	0,143614	14,42500	2,23514	0,059500	0,007724		
Éléments échangeables à l'acétate d'ammonium (g/kg)								Éléments extractibles à l'EDTA (mg/kg)								
11/09/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	Ca	Ca	Mg	Mg	K	K	Cu-dispo	Cu-dispo	Fe	Fe	Mn	Mn	Zn-dispo	Zn-dispo		
TC	39,20000	3,356586	0,246250	0,026588	0,365750	0,028687	14,20000	1,197219	102,4750	2,42951	72,0250	8,03051	178,2500	12,84199		
MS	37,15000	3,567913	0,227750	0,013696	0,412250	0,072958	13,32500	1,719254	101,1750	14,16719	107,0000	7,11805	179,2500	12,81601		
VS	39,60000	3,712142	0,302500	0,067816	0,360000	0,032619	13,30000	0,668331	101,7500	2,21736	87,7750	5,24746	170,5000	12,39624		
MSm	37,80000	4,017462	0,195500	0,010472	0,344000	0,036724	11,92500	0,921502	96,7250	7,13927	116,1750	21,13739	157,5000	16,25833		
TD	18,40000	4,400758	0,095275	0,006206	0,378750	0,026171	17,02500	9,728780	26,9250	0,09574	73,6000	0,47610	186,2500	13,09898		
TN	30,04500	19,332255	0,319000	0,026420	0,350000	0,075829	13,05000	0,810350	102,0750	3,98110	72,1250	5,22199	172,2500	6,99405		
Métaux totaux (mg/kg)																
11/09/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	B	B	Cr	Cr	Co	Co	Cu-tot	Cu-tot	Ni	Ni	Zn-tot	Zn-tot	Cd	Cd		
TC	5,617500	0,425000	736,000	59,3577	27,15000	0,619139	142,7500	9,10586	105,2500	2,62996	2385,000	137,7195	3,042500	0,122848		
MS	5,235000	0,989630	751,500	138,9160	27,30000	1,344123	145,2500	11,70114	106,0000	4,54606	2495,000	351,6153	3,062500	0,152179		
VS	5,705000	0,712297	742,500	74,5185	26,32500	0,655108	161,5000	32,18178	102,3000	2,11975	2387,500	214,0677	3,117500	0,079320		
MSm	5,310000	0,173781	760,750	56,5236	27,62500	0,478714	152,2500	10,71992	106,5000	1,91485	2387,500	162,5577	3,127500	0,147958		
TD	2,510000	0,080416	437,000	75,0200	29,87500	0,956992	124,5000	6,13732	113,7500	3,09570	2985,000	76,8115	2,562500	0,079320		
TN	5,910000	0,251529	740,000	88,2043	26,72500	0,754431	145,2500	3,86221	103,5000	2,08167	2335,000	197,3998	3,047500	0,102429		
Métaux totaux (mg/kg)																
11/09/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD			moyenne	SD		
parcelle	Mb	Mb	Pb	Pb	Th	Th	Hg	Hg	As	As			mat sèche %	mat sèche %		
TC	11,60000	0,711805	618,0000	24,5900	0,768500	0,144643	4,512500	0,751193	78,20000	16,85883			84,77500	0,150000		
MS	12,05000	0,695222	661,5000	73,9256	0,741000	0,077722	5,192500	0,650045	62,32500	31,41702			87,57500	0,694622		
VS	12,85000	2,551470	617,2500	40,3020	0,719500	0,047050	4,570000	0,269444	45,00000	7,56527			84,62500	0,585235		
MSm	11,77500	0,221736	630,2500	42,8981	0,718500	0,016523	5,350000	0,965436	54,72500	21,84512			88,02500	0,758837		
TD	12,92500	0,478714	882,0000	33,5361	0,804500	0,061679	1,900000	0,219848	84,45000	15,89014			91,62500	0,906918		
TN	12,52500	1,526161	610,7500	39,4493	0,718500	0,034886	5,512500	1,249517	77,00000	13,75670			84,67500	0,556028		

HAP (mg/kg matière sèche)																
11/09/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	HAP 1	HAP 1	HAP2	HAP2	HAP3	HAP3	HAP4	HAP4	HAP5	HAP5	HAP6	HAP6	HAP6	HAP7	HAP7	
TC	26,72000	2,33979	40,24250	1,47190	37,73750	8,51790	32,50250	8,39225	108,6600	26,99230	204,8100	37,4972	189,1925	30,66823		
MS	35,92000	2,81831	44,35250	2,76200	46,54000	7,34414	42,22000	7,73298	133,9325	18,42347	246,2525	26,8387	221,9300	14,20372		
VS	40,05500	16,06144	41,25000	4,07867	46,69500	7,32803	43,44250	12,32376	131,0425	31,63867	228,7750	44,0271	213,7200	33,00603		
MSm	39,52750	13,03783	46,58250	4,34891	51,08500	7,95328	51,65000	9,36674	150,5100	24,70641	260,0350	30,9514	240,5025	30,50024		
TD	2,46000	2,28558	1,65000	0,66262	3,83000	5,95361	3,72000	5,45334	9,4750	6,24695	12,6625	5,6275	10,4900	3,84011		
TN	25,69750	0,67702	39,80000	1,47244	35,97750	2,79081	32,42750	2,82355	106,6775	9,31494	216,9850	38,6761	183,8875	12,46792		

HAP (mg/kg matière sèche)																
11/09/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	HAP8	HAP8	HAP9	HAP9	HAP10	HAP10	HAP10	HAP11	HAP11	HAP12	HAP12	HAP12	HAP13	HAP13	HAP14	HAP14
TC	162,4975	23,46315	132,0050	17,41400	96,8725	13,60662	105,1000	7,04176	113,5375	9,85502	50,24500	4,73279	133,5375	12,35326		
MS	185,7675	10,05197	151,2825	6,38479	112,3850	5,14156	112,9000	3,74952	126,7550	3,33861	56,45500	1,54155	152,3400	4,81544		
VS	180,3350	25,73602	144,9000	21,71485	106,0725	14,93224	107,6275	11,16298	121,1625	14,05124	53,91500	5,32679	145,5250	16,60622		
MSm	201,3000	23,60134	163,7100	18,82643	119,2975	12,53557	118,1225	8,94708	125,0875	27,25465	59,86250	5,66562	160,1600	15,20591		
TD	9,0675	3,24813	7,2650	2,00952	6,1700	1,52606	5,8450	1,08654	7,0850	1,50582	3,25500	0,61060	5,4650	1,56321		
TN	158,6150	13,17211	129,1600	9,78587	93,8850	6,53417	102,3250	4,96789	111,4975	5,60971	49,24500	2,71969	131,0700	7,11900		

HAP (mg/kg matière sèche)						
11/09/2007	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	HAP15	HAP15	HAP16	HAP16	HAP-tot	HAP-tot
TC	25,49250	1,609376	69,28500	4,56261	1447,963	326,7994
MS	27,53750	0,820381	75,02500	2,60033	1771,598	103,1356
VS	26,78500	2,348226	71,32000	6,51090	1702,623	263,1169
MSm	28,82500	2,150806	77,51250	5,34693	1893,773	231,4682
TD	2,50750	0,191725	4,19250	0,77869	90,525	44,9077
TN	25,15500	0,998883	67,92000	3,00214	1246,963	265,8651

Paramètres agronomiques (g/kg sauf C/N et pH, sans unité)																
07/04/2008	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	Azote tot	Azote tot	C/N	C/N	C org	C org	mat org	mat org	mat org	pH	pH	CaCo3	CaCo3	P2O5	P2O5	
TC	2,627500	0,331801	25,00000	0,60553	65,72500	8,290306	113,5000	14,38749	7,832500	0,147281	14,42500	1,11467	0,073750	0,005315		
MS	2,592500	0,236696	25,57500	1,24466	66,22500	5,908962	114,5000	10,34408	7,722500	0,040311	15,62500	4,20506	0,077500	0,008062		
VS	2,430000	0,144453	25,90000	0,88318	62,87500	3,125567	109,0000	5,35413	7,695000	0,110303	15,95000	2,73435	0,070500	0,007047		
MSm	2,570000	0,126491	23,42500	1,49750	60,10000	3,665151	103,9750	6,36678	7,527500	0,078049	13,60000	3,71484	0,065500	0,009747		
TD	1,088750	0,073979	57,02500	3,00153	62,05000	5,654791	107,3000	9,99800	8,387500	0,199729	45,77500	1,08128	0,085500	0,007724		
TN	2,405000	0,214554	25,67500	0,74106	61,65000	4,461315	106,7000	7,65681	7,632500	0,130224	15,27500	3,60867	0,072250	0,009912		
Eléments échangeables à l'acétate d'ammonium (g/kg)								Eléments extractibles à l'EDTA (mg/kg)								
07/04/2008	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	Ca	Ca	Mg	Mg	K	K	Cu-dispo	Cu-dispo	Fe	Fe	Mn	Mn	Zn-dispo	Zn-dispo		
TC	77,75000	78,168045	0,161250	0,012093	0,343750	0,033669	13,30000	0,948683	95,5000	12,43570	100,5500	10,52663	165,2500	14,63728		
MS	74,40000	69,740137	0,380250	0,420048	0,567000	0,356233	12,55000	0,525991	92,6750	6,42774	105,3750	9,26800	169,7500	21,37561		
VS	41,67500	3,210789	1,483500	1,353299	0,503250	0,278534	12,92500	0,525198	95,6250	3,09448	108,0500	7,47507	173,5000	14,43376		
MSm	87,42500	95,060555	0,485500	0,643265	0,515000	0,254845	12,85000	1,907005	95,9500	6,97687	122,1000	18,18168	162,5000	19,90812		
TD	116,25000	4,991660	0,086725	0,006039	0,364750	0,020419	11,75000	1,642153	31,7750	4,05494	84,1500	4,37074	191,5000	14,10674		
TN	81,77500	82,839861	0,758250	0,653309	0,497750	0,300208	14,02500	0,377492	99,2750	2,73907	100,9000	5,28268	179,7500	15,28343		
Métaux totaux (mg/kg)																
07/04/2008	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	B	B	Cr	Cr	Co	Co	Cu-tot	Cu-tot	Ni	Ni	Zn-tot	Zn-tot	Cd	Cd		
TC	3,932500	0,141038	670,500	149,5382	26,87500	2,780138	138,0000	8,52447	100,4500	7,62867	2192,500	338,8584	2,817500	0,161323		
MS	3,570000	0,155563	684,750	141,7965	25,70000	1,991649	133,2500	11,70114	95,6250	6,16462	2237,500	185,5398	2,652500	0,151959		
VS	5,190000	0,782219	731,500	65,6684	23,90000	1,388044	135,5000	12,12436	90,7500	5,10065	2035,000	122,3383	2,642500	0,144539		
MSm	4,277500	0,215774	777,500	104,9365	24,40000	0,840635	135,5000	5,91608	92,8750	2,59663	1947,500	223,6627	2,650000	0,067330		
TD	1,615000	0,128970	422,250	92,5360	27,50000	2,264214	114,7500	9,21502	101,3000	6,94454	2700,000	284,6050	2,100000	0,293258		
TN	4,262500	0,322942	719,750	142,3596	25,20000	1,070825	136,2500	3,50000	98,0000	8,62825	2100,000	140,9492	2,717500	0,062915		
Métaux totaux (mg/kg)																
07/04/2008	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD			moyenne	SD		
parcelle	Mb	Mb	Pb	Pb	Th	Th	Hg	Hg	As	As			mat sèche %	mat sèche %		
TC	11,05000	0,772442	634,5000	255,7636	0,670000	0,061903	5,062500	0,470133	60,75000	6,70199			82,72500	0,262996		
MS	11,20000	0,547723	520,0000	49,2950	0,659250	0,067500	5,252500	1,387477	56,50000	2,64575			82,27500	0,411299		
VS	10,72500	0,537742	481,7500	20,8866	0,630500	0,042162	6,315000	2,348567	60,25000	8,99537			82,40000	1,073934		
MSm	10,72500	0,780491	446,7500	48,8083	0,630750	0,038793	5,845000	2,273052	59,50000	6,45497			82,15000	0,700000		
TD	11,52500	0,639661	674,5000	70,9295	0,722750	0,038108	1,655000	0,230145	74,50000	5,44671			83,25000	0,129099		
TN	10,70000	0,668331	532,0000	69,2243	0,669000	0,045891	5,132500	1,576925	60,75000	6,13052			82,55000	0,465475		



<b>HAP (mg/kg matière sèche)</b>																
07/04/2008	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	HAP 1	HAP 1	HAP2	HAP2	HAP3	HAP3	HAP4	HAP4	HAP5	HAP5	HAP6	HAP6	HAP6	HAP7	HAP7	HAP7
TC	29,84000	2,95460	38,25000	2,81398	39,73750	2,45370	34,06750	4,18363	111,6900	6,90073	38,6550	7,9924	197,9425	9,10034		
MS	31,43000	1,48959	36,99000	3,15979	48,69000	5,06271	58,33250	36,74522	124,4875	13,21823	50,5650	8,6275	206,3650	15,73902		
VS	35,01250	5,11635	39,54000	5,40800	54,17500	7,48626	47,88500	8,51757	148,7075	14,84859	49,9325	8,5062	239,2550	10,33070		
MSm	31,34000	3,37527	37,48500	4,20516	49,68500	7,48654	41,84750	7,90579	124,8800	17,01196	49,7200	5,3161	208,0200	22,49986		
TD	1,84000	0,16833	1,12000	0,05477	0,65250	0,12553	1,05250	0,10243	6,4975	0,54353	1,7650	0,3529	9,1050	0,92961		
TN	30,40500	3,09068	40,04250	2,35984	40,88000	3,77913	53,68750	38,27539	116,3750	17,84993	46,4525	5,0650	202,6875	21,56813		

<b>HAP (mg/kg matière sèche)</b>																
07/04/2008	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	HAP8	HAP8	HAP9	HAP9	HAP10	HAP10	HAP10	HAP11	HAP11	HAP12	HAP12	HAP12	HAP13	HAP13	HAP14	HAP14
TC	146,4975	6,11760	103,1975	0,92110	94,2975	3,18340	98,0925	2,08286	153,9200	5,65288	56,72000	2,34471	94,4275	7,58430		
MS	150,5450	8,84049	108,6525	6,92400	96,5725	8,02264	97,9250	7,55899	154,9150	10,32481	57,30500	4,04503	105,6900	4,70354		
VS	168,7550	11,06545	119,6150	5,76167	108,4400	6,23108	102,0800	2,70708	163,8800	4,11004	61,32000	1,92750	108,5750	6,96470		
MSm	149,6850	18,26328	107,6550	11,26507	96,8550	11,24358	94,8600	10,47438	153,3525	13,87985	57,12500	5,87157	101,5950	6,85584		
TD	6,2850	0,92147	4,6725	0,52475	5,0175	0,45639	4,7575	0,20759	8,0425	0,58031	2,87250	0,15586	2,4075	0,57500		
TN	145,3100	14,79104	106,6150	7,57604	95,3025	9,44016	96,9925	6,90303	153,8250	14,63047	57,23250	5,62751	101,3325	4,12721		

<b>HAP (mg/kg matière sèche)</b>						
07/04/2008	moyenne	SD	moyenne	SD	moyenne	SD
parcelle	HAP15	HAP15	HAP16	HAP16	HAP-tot	HAP-tot
TC	27,69000	0,358608	80,39250	2,15614	1345,418	28,0464
MS	27,42500	0,966144	78,95250	5,41321	1434,843	72,7781
VS	28,35500	0,476200	80,12750	1,07819	1555,655	80,1794
MSm	26,90750	2,058080	76,76500	6,64880	1407,778	142,2650
TD	2,42500	0,119024	3,94000	0,20067	62,453	4,1919
TN	27,19500	1,084328	78,67250	6,22911	1393,008	133,3981

## ANNEXE 2

### Composition des solutions

**a. Milieu de Hoagland**

- $\text{KNO}_3$  : 505mg/L (5mM)
- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  : 1,18g/L (5mM)
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  : 1,232g/L (5mM)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 136mg/L (1mM)
- Tartrate de Fer : 5mg/L (9 $\mu$ M)
- Cette solution est ensuite oxygénée pendant 24h.

**b. Tampon PBS (Phosphate Buffered Saline)**

- NaCl : 8g/L (136,9mM)
- KCl : 200 mg/L (2,7mM)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anhydre : 1150 mg/L (8,1mM)
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anhydre : 200 mg/L (1,5mM)
- Ajuster le pH à 7,4

**c. Solution de lyse (comètes)**

- NaCl : 146,1g/L (2,5M)
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$  : 37,2g/L (100 mM)
- Tris : 1,2g/L (10 mM)
- Ajuster le pH à 10,5
- N-lauroylsarcosine sodique : 10g/L (1%)

Cette solution ne doit pas être laissée plus d'1h à basse température car la N-lauroylsarcosine sodique se solidifie.

**Rq** : ajuster le pH avant l'ajout de la sarcosine, car cette dernière ne se dissout qu'en milieu alcalin.

**Rq 2** : Pour rincer la vaisselle ayant contenu de la sarcosine, utiliser de l'eau additionnée de NaOH ou KOH, pour la même raison...

**d. Tampon d'électrophorèse (comètes)**

- NaOH : 12g/L (300mM)
- $\text{Na}_2\text{EDTA}$  : 1,86g/L (5mM)

A préparer extemporanément : penser à mettre une bouteille d'eau déminéralisée au réfrigérateur la veille du test.

**e. Tampon de neutralisation (comètes)**

- Tris : 48,5g/L (400 mM)
- Ajuster le pH à 7,5

## ANNEXE 3

### Trucs et astuces pour le test des comètes

- Afin d'éviter que des personnes n'ouvrent la porte pendant les manipulations des noyaux sensibles à la lumière, penser à accrocher sur la porte un panneau interdisant l'entrée.
- Marquer les lames en les gravant à l'aide d'un stylo « pointe de diamant », prévu pour la découpe du verre ou du carrelage. Les inscriptions au feutre peuvent s'effacer et polluer les solutions de trempage. Porter des lunettes de sécurité pendant l'opération : risque de projection d'éclats de verre.
- En lumière rouge, toutes les inscriptions de couleur rouge sont difficilement lisibles : penser à marquer les flacons en noir ou bleu.
- Attention à la lumière du réfrigérateur qui s'allume automatiquement lorsqu'on l'ouvre... Penser éventuellement à bloquer l'interrupteur en position éteinte (bande adhésive).
- Utiliser de préférence des cuves opaques avec couvercle pour le trempage des lames, et tailler un carton qui s'ajuste par-dessus la cuve de migration, ceci pour pouvoir sortir de la pièce pendant les temps d'attente.
- Pour le coulage de la deuxième couche d'agarose (contenant les noyaux), il est préférable d'étaler le dépôt à la pipette en un trait sur toute la longueur de la lame. Si on dépose la solution sous forme de goutte au milieu de la lame, des bulles se formeront aux deux extrémités et la répartition des noyaux ne sera pas homogène.
- En lumière rouge, il est difficile de faire la différence entre le recto et le verso des lames, et entre l'extrémité à saisir et celle à ne pas toucher : rester attentif..
- Pour savoir quand retirer les lamelles en étant sûr que l'agarose est solidifié, il suffit de vérifier la formation de buée sur la lamelle : si de la buée se forme, l'agarose est froid, donc solidifié...

## ANNEXE 4

### Caractéristiques des sols LUFA utilisés

Type de sol LUFA	2.2	3A
Carbone organique (%)	2.16 +/- 0.40	2.2 +/- 0.1
pH (0,01M CaCl <sub>2</sub> )	5.4 +/- 0.1	7.1 +/- 0.3
CEC (mval/100g)	10 +/- 1	19 +/- 5
<b>Taille des particules selon USDA (%)</b>		
Clay (< 0.002 mm)	6.4 +/- 0.9	17.6 +/- 1.5
Silt (0.002 - 0.05 mm)	12.2 +/- 0.6	39.1 +/- 2.4
Sand (0.05 – 2.0 mm)	81.4 +/- 1.2	47.3 +/- 3.3



## Résumé

Dans le cadre de l'optimisation de tests sur plantes pour la bioévaluation de matrices polluées, les objectifs de cette thèse ont d'abord été de mettre au point deux tests de génotoxicité sur les racines secondaires d'une plante modèle, la fève *Vicia faba*. Le premier d'entre eux, le test des micronoyaux, a engendré des résultats prometteurs qui ont donné lieu à l'initiation d'un processus de normalisation internationale par l'ISO. Le deuxième test, l'essai des comètes, a apporté des résultats moins encourageants en termes de faisabilité et de précision.

Pour aller plus loin dans la compréhension des conséquences de la formation de micronoyaux sur le cycle de vie de la plante, nous avons étudié les traits d'histoire de vie de fèves se développant depuis leur germination dans un sol contenant une quantité suffisante de génotoxique (cadmium, cuivre et hydrazide maléique) pour induire des micronoyaux, mais ne provoquant pas de retard de croissance à court terme (48h). A la lumière des résultats obtenus, nous pouvons supposer un lien entre la présence de micronoyaux à court terme et une perturbation ou une modification retardée du cycle de vie de la plante à plus long terme.

Le test des micronoyaux a en outre été mis en application parmi d'autres tests et biomarqueurs pour évaluer l'écotoxicité de matrices contaminées, liquides ou solides. Dans le cadre du Groupement d'Intérêt Scientifique pour les Friches Industrielles (GISFI), nous avons évalué la génotoxicité de sols pollués par d'anciennes activités de cokerie. Par ailleurs, nous avons également participé au projet « Ecotoxicité des sous-produits d'altération de Nanomatériaux » (Nanoalter), dans le cadre duquel nous avons évalué les dangers potentiels posés par la dégradation dans l'environnement de nanocomposites entrant dans la composition de crèmes solaires et comprenant des nanoparticules de dioxyde de titane. Enfin, les mécanismes de tolérance des plantes aux toxiques ont été étudiés par le dosage des phytochélatines et des enzymes du stress oxydant.

---

## Abstract

In the context of optimizing plant tests for polluted soil bioassessment, the objectives of this thesis were firstly the development of two genotoxicity tests on the secondary roots of a plant model, the broad bean *Vicia faba*. The first test was the micronucleus assay and gave promising results that lead to an international ISO standardizing process. The second test named comet assay brought less encouraging results because of problems with feasibility and precision.

To improve our knowledge about the consequences of micronuclei formation on plant life cycle, we studied life-history traits of beans developing from germination in a soil containing a sufficient quantity of genotoxic substance (cadmium, copper and maleic hydrazide) to induce micronuclei without provoking short-term (48h) growth retardation. The obtained results evoked a link between micronuclei presence after 48h and plant life cycle changes or impairments.

Besides, the micronucleus assay was applied among other assays or biomarkers to evaluate ecotoxicity of liquid or solid contaminated matrix. As part of the French Scientific Interest Group on Industrial Wasteland (GISFI), we evaluated the genotoxicity of soils polluted by a former coke-factory. Furthermore, we took part to the project "Ecotoxicity of nanomaterial alteration byproducts", also called Nanoalter. Our goal was to assess the potential hazards attached to the environmental degradation of titanium dioxide-containing sunscreen nanocomposites. Then, the tolerance mechanisms of plants towards chemicals were studied by phytochelatin and oxidative stress enzymes measurements.