



**HAL**  
open science

# Relations "biodisponibilité-génotoxicité-écotoxicité" des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les sols de friches industrielles

Marc Bernard Bonnard

► **To cite this version:**

Marc Bernard Bonnard. Relations "biodisponibilité-génotoxicité-écotoxicité" des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les sols de friches industrielles. Ecotoxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2010. Français. NNT : 2010METZ007S . tel-01752743

**HAL Id: tel-01752743**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752743v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## 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>

UNIVERSITE PAUL VERLAINE – METZ  
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées  
Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE)  
CNRS UMR 7146

Ecole Doctorale 410 Sciences et Ingénieries  
« Ressources, Procédés, Produits, Environnement » (RP2E)

## THESE

Présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur ès Sciences  
Mention « Ecotoxicité, Biodiversité, Ecosystèmes »

Le 20 Avril 2010

Par

Marc BONNARD

**RELATIONS « BIODISPONIBILITE-GENOTOXICITE-ECOTOXICITE »  
DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP)  
DANS LES SOLS DE FRICHES INDUSTRIELLES**

Devant un jury composé de :

**Pr. D. DAMIDOT**, ENSM Douai, *Rapporteur*

**C. GRAND**, ADEME Angers, *Examineur*

**Dr. S. LEMIERE**, Université Lille 1, *Examineur*

**Dr. C. MOUGIN**, INRA PESSAC Versailles, *Rapporteur*

**Pr. C. MOUNEYRAC**, Université Catholique de l'Ouest, Angers, *Examineur*

**Pr. P. VASSEUR**, Université Paul Verlaine-Metz, *Directeur de thèse*

UNIVERSITE PAUL VERLAINE – METZ  
UFR Sciences Fondamentales et Appliquées  
Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE)  
CNRS UMR 7146

Ecole Doctorale 410 Sciences et Ingénieries  
« Ressources, Procédés, Produits, Environnement » (RP2E)

## **THESE**

Présentée en vue de l'obtention du grade de  
Docteur ès Sciences  
Mention « Ecotoxicité, Biodiversité, Ecosystèmes »

Le **20 Avril 2010**

Par

**Marc BONNARD**

**RELATIONS « BIODISPONIBILITE-GENOTOXICITE-ECOTOXICITE »  
DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP)  
DANS LES SOLS DE FRICHES INDUSTRIELLES**

Devant un jury composé de :

**Pr. D. DAMIDOT**, ENSM Douai, *Rapporteur*

**C. GRAND**, ADEME Angers, *Examineur*

**Dr. S. LEMIERE**, Université Lille 1, *Examineur*

**Dr. C. MOUGIN**, INRA PESSAC Versailles, *Rapporteur*

**Pr. C. MOUNEYRAC**, Université Catholique de l'Ouest, Angers, *Examineur*

**Pr. P. VASSEUR**, Université Paul Verlaine-Metz, *Directeur de thèse*

Ce travail de thèse a été cofinancé par l'Agence de l'Environnement et de Maîtrise de l'Energie (ADEME) et le Conseil Régional de Lorraine.

ADEME  
2 Square La Fayette  
BP 90406  
49004 Angers, Cedex 01

Conseil Régional de Lorraine  
Place Gabriel Hocquart,  
BP 81004  
57036 Metz, Cedex 1

**ADEME**



*« L'homme se développe actuellement comme un ver de terre : un tuyau qui avale de la terre et qui laisse derrière lui des petits tas. Si un jour la terre disparaît parce qu'il aura tout mangé, il ne faudra pas s'en étonner. »*

Andrei Tarkovski (1932-1986), réalisateur russe.

*A mes parents*

*A Isabelle*

# Remerciements

Ces pages sont l'occasion pour moi de remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué au bon déroulement de cette thèse.

Je voudrais tout d'abord remercier ma directrice de thèse, le Professeur Paule Vasseur, de la confiance qu'elle m'a témoignée en m'accordant la réalisation de ce projet de recherche. J'ai bénéficié d'un très bon encadrement et de précieux conseils qui m'ont permis de mener ce projet de recherche le mieux possible. Ces années d'apprentissage à ses côtés m'ont beaucoup appris et vont m'aider pour la suite de ma carrière professionnelle.

Je remercie chaleureusement Mme Grand, Mme Mouneyrac, Mr Damidot, Mr Lemièrre et Mr Mougïn d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et d'évaluer ce travail de recherche. C'est l'occasion pour moi de remercier également pour leur soutien financier l'Agence de l'Environnement et de Maitrise de l'Energie (ADEME), la région Lorraine ainsi que le réseau de recherche CNRS-ERICHE.

Je remercie également toutes les personnes du laboratoire LIEBE que j'ai côtoyées durant ces années et avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir à travailler. En premier lieu, ses directeurs Mr Jean-François Férard et Pascale Bauda pour m'avoir accueilli au sein du LIEBE et pour leur sympathie. Un très grand merci pour TOUT à mes collègues de bureau, à savoir Claudine, Marie-Aline, Yann, Chantal, Nelly, Rachid; et plus particulièrement Anne-Marie qui m'a apporté une aide précieuse et a consacré un temps énorme pour mes essais sur vers de terre. Je n'oublie pas les deux sœurs du laboratoire, Maryline pour son aide entre autres dans la paperasse administrative et Rosie pour son café. Un grand merci également aux autres enseignant-chercheurs, chercheurs et techniciens... pour leurs aides et leurs conseils avec un clin d'œil particulier pour : Carole, Pascal, Françoise, Mireille, Simon pour son aide dans l'analyse statistique de mes données, Johanne et Emmanuel qui m'ont beaucoup appris sur les vers de terre. Je remercie également les autres doctorants du laboratoire, présents ou passés, pour leur aide dans mon travail, leur sympathie et les bons moments passés hors travail : Sophie S., Eric G., Anne-Sophie, Karen, Emilie, Audrey, Hugues, Aurélie, Olivier, Anatole, Pierre, Laetitia, les deux Vincent, Renaud, Marc, Eric B., Emmanuel, Asma, Sophie P., Perrine, Ig-Chun, et les autres.



Je tiens également à remercier pour leur sympathie tous les membres du GISFI que j'ai pu côtoyer lors des missions de prélèvements, des fêtes de la Science et des réunions, en particulier Noëlle Raoult, Corinne Leyval et Jean-Louis Morel. Je remercie chaleureusement Tracy Carmona pour avoir pris le temps de corriger l'anglais de mes articles.

J'aimerais également remercier toutes les personnes que j'ai côtoyées lors de mes stages de Maîtrise, D.E.S. et D.E.A. qui m'ont permis de découvrir ce monde passionnant de la recherche en écotoxicologie. Un grand merci à Sylvie Lapègue et Karine Bouilly de la station IFREMER de La Tremblade, à Monsieur et Madame Amiard et à Brigitte Berthet de l'Université de Nantes ainsi qu'à Michèle Roméo de l'Université de Nice Sophia-Antipolis.

Je souhaiterais remercier enfin tous les membres de ma famille, belle-famille et amis pour leur soutien, même si j'étais loin d'eux.

Je remercie de tout mon cœur mes parents qui m'ont toujours aidé et qui m'ont permis d'en être là aujourd'hui. Un grand merci également à mes grands-parents et au reste de ma famille : Sophie, Cédric, Clémence, Thibaud, Laurent, Marie et Olivier. Même si nous nous sommes moins vus ces dernières années, un grand merci à mes amis nantais que j'ai toujours plaisir à retrouver : Gégé, Delphine, Maël, Saby, Gildas, David, Angel, Pierre, Estelle, Emilie, Christophe, Manu, Nath, Pilou et Elise.

Je remercie également de leur soutien mes beaux-parents, ma belle-sœur Christina pour m'avoir entre autres offert l'excellent ouvrage *Nounours et le ver de terre* (et à qui j'ai promis de citer la référence) ainsi qu'à son ami Laurent pour la pêche, le foot et la bière. Un grand merci également au reste de sa famille et aux amis messins pour les soirées passées en leur compagnie : Frédéric, Céline, Emma, Marc, Emilie, Florence, Jérémie, Mélanie, Julien, Rémi, Marine, Virgile et Karine.

Je remercie enfin et de tout mon cœur ma femme Isabelle que j'ai rencontrée à Metz, qui m'a toujours soutenu et qui a dû elle me supporter ces années là.

Je n'oublie pas mes petits vers de terre pour leur bonne contribution à mon étude et qui s'associent à moi pour remercier de leur crottin, Clovis et Mistral.

# SOMMAIRE

Introduction .....	1
Synthèse bibliographique .....	3
II. 1. Problématique liée aux sites et sols pollués.....	3
II.1.1. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP).....	3
II.1.2. Les métaux lourds.....	8
II.1.3. HAP et métaux lourds dans les sols industriels.....	9
II.2. Réhabilitation des friches industrielles.....	14
II.3. Evaluation des risques des sols contaminés .....	17
II.3.1. Notions de danger, d'exposition, de risque .....	17
II.3.2. Approche physico-chimique de la pollution des sols .....	20
II.3.3. Approche biologique-écotoxicologique de la pollution des sols.....	21
II.4. Importance et mesure de la biodisponibilité des polluants.....	23
II.5. Ecotoxicité des sols contaminés .....	26
II.5.1. Sols dopés en métaux lourds .....	26
II.5.2. Sols contaminés en métaux lourds.....	32
II.5.3. Sols dopés en HAP .....	33
II.5.4 Sols contaminés en HAP .....	37
II.6. Génotoxicité des sols contaminés.....	39
II.6.1. Etudes chez les vers de terre.....	39
II.6.2. Etude chez les plantes.....	45
Objectifs de la recherche .....	48
Matériel et Méthodes.....	51
IV.1. Description et historique des sites étudiés .....	51
IV.2. Echantillonnage des sols .....	54
IV.3. Analyse physico-chimique des sols .....	55
IV.4. Matériel biologique .....	57
IV.4.1. Systématique .....	57
IV.4.2. Description de l'espèce .....	57
IV.4.3. Elevage du ver <i>Eisenia fetida</i> .....	59
IV.5. Essais d'écotoxicité.....	59
IV.5.1. Essais sur la survie des vers de terre .....	60
IV.5.2. Essais sur la reproduction des vers de terre .....	61

IV.5.3. Critères d'écotoxicité des sols.....	61
IV.5.4. Validité des essais .....	62
IV.6. Essais de génotoxicité .....	62
IV.6.1. Exposition des vers .....	62
IV.6.2. Récupération des coelomocytes de vers de terre .....	63
IV.6.3. Test Comet ou <i>Single-Cell Gel Electrophoresis assay</i> (SCGE) .....	65
Résultats .....	72
Article 1 .....	72
Article 2 .....	81
Article 3 .....	93
Discussion .....	103
Conclusion.....	114
Références .....	116

## Liste des Figures

**Figure 1:** Structure des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) prioritaires, définis par l'US-EPA (dénomination anglaise).

**Figure 2:** Les différentes étapes dans la démarche d'évaluation des risques.

**Figure 3:** Biodisponibilité et toxicité des polluants des sols vis-à-vis des organismes (d'après Fent, 2003).

**Figure 4:** Dispositif de parcelles de la station expérimentale du GISFI pour les études de phytoremédiation.

**Figure 5:** Localisation des friches industrielles où ont été prélevés les sols étudiés.

**Figure 6:** Photographies du site de la cokerie d'Homécourt (54) avant son démantèlement (haut). La station expérimentale du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Fiches Industrielles s'est installée sur le site de la cokerie après son démantèlement (bas).

**Figure 7:** Installation mobile de désorption thermique pour le traitement des sols contaminés.

**Figure 8:** Localisation des différentes institutions impliquées dans l'analyse physico-chimique des sols.

**Figure 9:** Cycle de vie du ver de terre *Eisenia fetida* (Savigny, 1826).

**Figure 10:** Coupe transversale (gauche) de ver de terre et photographie (droite) de coelomocytes (de type amœbocytes ou éléocytes/chloragocytes) sur cellule de Malassez (Grossissement  $\times 400$ ).

**Figure 11:** Les différentes étapes du test Comet ou *Single-Cell Gel Electrophoresis assay* (SCGE).

**Figure 12:** ADN intact (gauche) et ADN endommagé (droite) de coelomocytes de vers de terre, donnant une figure caractéristique de comète.

**Figure 13:** Représentation schématique d'une comète et des différents paramètres de mesure.

**Figure 14:** Les différentes classes de dommages à l'ADN des coelomocytes de vers de terre, en fonction des valeurs de % Tail DNA.

**Figure 15:** Comportement physique des contaminants dans les sols (d'après Semple *et al.*, 2003).

Résultats - Article 1:

**Figure 1:** Toxicity expressed as toxic units (TU = 100/EC50) of the A and B contaminated soils measured on growth of higher plants (*Brassica chinensis*), mortality and reproduction of earthworms (*Eisenia fetida*) and reproduction of collembolae (*Folsomia candida*).

Résultats - Article 2:

**Figure 1:** DNA damage (expressed as the average percentage of tail DNA) of coelomocytes of control earthworms (in ISO soil: C<sub>4</sub> and C<sub>10</sub> or culture substrate: C<sub>0</sub>) and earthworms exposed for 4 or 10 days to 10%, 20% and 40% of the coking plant soil.

**Figure 2:** Percentage of decrease of reproduction endpoints expressed by cocoon production after 28 days (red) and juvenile production after 56 days (blue) in earthworms exposed to different concentrations (10, 20, 40% d.w.) of the coking plant soil in the test medium.

Résultats - Article 3:

**Figure 1:** Box-plot representation of the average percentage of tail DNA in coelomocytes of earthworms exposed for 0, 4 or 10 days to the control soils (SC: Substrate of Culture, ISO : artificial soil - *blank boxplots*) and to the different concentrations (50%, 75% and 100%) of the two contaminated soils (NM : before treatment – *hatched boxplots*, NMTD : after thermal desorption – *dotted boxplots*).

**Figure 2:** DNA damage in coelomocytes of earthworms exposed for 0, 4 or 10 days to control soils (SC: substrate of culture, ISO: artificial soil) or contaminated soils (NM: without treatment, NMDT: after thermal desorption).

## Liste des Tableaux

**Tableau I:** Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires définis par l'US-EPA.

**Tableau II:** Teneurs en HAP totaux (en mg/kg) et proportion relative (2, 3, 4, 5-6 noyaux aromatiques) des congénères des HAP dans des sols, suivant les activités industrielles.

**Tableau III:** Génotoxicité et cancérogénicité des 16 HAP prioritaires définis par l'US-EPA.

**Tableau IV:** Liste des essais d'écotoxicité des sols et des fractions aqueuses (lixiviats/percolats) normalisés au niveau national et international.

**Tableau V:** Etudes sur l'inhibition de la reproduction (cocons, juvéniles), de la croissance et de la maturation sexuelle d'invertébrés terrestres exposés à des sols (artificiels ou naturels) dopés en métaux lourds.

**Tableau VI:** Etudes sur l'inhibition de la survie, de la biomasse, de la croissance et de la reproduction d'invertébrés terrestres exposés à des sols dopés en HAP: vers de terre du genre *Eisenia* (*E. fetida*, *E. veneta*) et du genre *Lumbricus* (*L. rubellus*) - collemboles du genre *Folsomia* (*F. candida*, *F. fimetaria*).

**Tableau VII:** Etudes sur l'inhibition de la croissance (racines, feuilles) et de la germination de plantes supérieures exposées à des sols dopés en HAP ou en hydrocarbures totaux.

**Tableau VIII:** Etudes sur l'inhibition de la survie, de la croissance, de la reproduction et de la maturation sexuelle d'invertébrés terrestres et de la croissance et de la germination des plantes supérieures, exposés à des sols multi-contaminés (notamment en HAP et en hydrocarbures totaux).

**Tableau IX:** Etudes de génotoxicité (essai comet) chez les vers de terre exposés à des matrices dopées en HAP ou en métaux lourds.

**Tableau X:** Etudes de génotoxicité (essai comet) chez les vers de terre exposés à des sols multi-contaminés.

**Tableau XI:** Institutions impliquées dans les analyses physico-chimiques des sols contaminés et du substrat de référence ISO.

### Résultats - Article 1:

**Table I:** Physico-chemical characteristics, pollutant concentrations (in mg/kg dry weight) and toxicity to terrestrial species of the A (1) and B (4) PAH-contaminated soils studied.

### Résultats - Article 2

**Table I:** The main physico-chemical characteristics of both coking plant and artificial ISO soils.

**Table II:** The number, viability and genotoxicity of coelomocytes extruded by earthworms exposed to 10%, 20% and 40% of the contaminated soil during 4 and 10 day periods.

Résultats - Article 3

**Table I:** The main physico-chemical characteristics of both contaminated soils (NM: before and NMDT: after thermal desorption) and the artificial ISO control soil.

**Table II:** DNA damage in coelomocytes of earthworms exposed for 0, 4 or 10 days to control soils (SC: substrate of culture, ISO: artificial soil) or contaminated soils (NM: without treatment, NMDT: after thermal desorption).

## Liste des Abréviations

### A

---

ADEME : Agence de l'Environnement et de Maîtrise de l'Energie  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AFLP : *Amplified Fragment Length Polymorphism*  
AFNOR : Association Française de Normalisation

### B

---

BASOL : Base de données sur les sites et sols pollués ou potentiellement pollués appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curatif.  
B[a]P : Benzo[a]Pyrene  
BeT : Bromure d'Ethidium  
BRGM : Bureau de Recherches Géologiques et Minières  
BTEX : benzène, éthylbenzène, toluène, xylène

### C

---

CAT : Catalase  
CE(L)x : Concentration Effective (Létale) (x = 10%, 20% ou 50%)  
C/N : Ratio Carbone/Azote  
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique  
COV : Composé Organique Volatil  
CP : Cyclophosphamide  
CRE : Capacité de Rétention en Eau (ou WHC : *Water Holding Capacity*)

### D

---

DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DRIRE : Directions Régionales de l'Industrie de la Recherche et de l'Environnement.

### E

---

EC-SCF : *European Commission – Scientific Committee on Food*  
EEA : *European Environmental Agency* (Agence Européenne de l'Environnement)  
ERICHE : Réseau de Recherche CNRS (Evaluer et Réduire l'Impact de la Chimie sur l'Environnement)

### F-G

---

FCM : Cytométrie en Flux - *Flow Cytometry*  
GC-MS : Chromatographie Gazeuse - Spectrométrie de Masse  
GISFI : Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles  
GST : Glutathion S-Transférases

### H

---

HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques  
HOM : Sol de la cokerie d'Homécourt  
HPLC-F : Chromatographie Liquide Haute Performance – Fluorimètre

### I-K

---

IARC : Centre International pour la Recherche contre le Cancer  
ICP-SAE : spectrométrie d'émission atomique a source plasma  
ICP-MS : spectrométrie de masse à source plasma  
INRA : Institut National de Recherche Agronomique  
ISO : International Organization for Standardization  
Kow : coefficient de partage octanol / eau



## L-M

---

LIEBE : Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

LMP : *Low melting Point* (agarose bas point de fusion)

LOEC : *Low Observed Effect Concentration* (concentration induisant le plus faible effet observé)

MEEDDM : Ministère de l'Écologie, de l'Énergie, du Développement Durable et de la Mer

MMS : Méthylméthansulfonate

## N

---

NF : Norme Française

NM : Sol de la cokerie de Neuves-Maisons

NMDT : Sol de la cokerie de Neuves-Maisons après un traitement de thermodésorption

NMP : *Normal Melting Point* (agarose point de fusion normal)

NOEC : *No Observed Effect Concentration* (ou CSEO: Concentration Sans Effet Observé)

## O

---

OCDE – OECD : Organisation de Coopération et de Développement Economique (*Organization for Economic and Co-operation Development*)

8-OH-dG : 8 hydroxydéoxyguanosine

OM : *Organic Matter*

## P-S

---

PBS : Phosphate Buffered Saline

pH : potentiel hydrogène

ROS : *Reactive Oxygen Species* (ou espèces réactives à l'oxygène)

SCGE : *Single-Cell Gel Electrophoresis Assay*

SOD : Superoxide Dismutase

## T

---

TOC : Total Organic Carbon

Tris : Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane

Triton X100 : *t*-octylphénoxy polyéthoxyéthanol

## U-V

---

UE : Union Européenne

US-EPA: *United States Environmental Protection Agency* - Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis d'Amérique

UV : Ultraviolet

V : Volt

## Métaux lourds

---

Cd (cadmium), Cr III ou VI (Chrome trivalent ou hexavalent), Co (Cobalt), Cu (Cuivre), Mn (Manganèse), Mo (Molybdène), Ni (Nickel), Pb (Plomb), Tl (Thallium), Zn (Zinc)

## Unités de mesures

---

dw: dry weight (ou poids sec)

( $\mu$ )mg: (micro)milligramme,

kg : kilogramme

( $\mu$ )mL : (micro)millilitre

( $\mu$ )mM : (micro)millimolaire

% w/w : % weight/weight

Ø : diamètre

## Liste des espèces citées

### Invertébrés terrestres :

*A. caliginosa*, *A. longa*, *A. tuberculata* : *Aporrectodea caliginosa*, *Aporrectodea longa*, *Aporrectodea tuberculata* (vers de terre)  
*D. rubidus* : *Dendrodrilus rubidus* (ver de terre)  
*D. curgensis* : *Dichogaster curgensis* (ver de terre)  
*D. willsi* : *Drawida willsi* (ver de terre)  
*E. andrei*, *E. eugeniae*, *E. fetida*, *E. veneta* : *Eisenia andrei*, *Eisenia eugeniae*, *Eisenia fetida*, *Eisenia veneta* (vers de terre)  
*E. albidus*, *E. crypticus*, *E. sp.* : *Enchytraeus albidus*, *Enchytraeus crypticus*, *Enchytraeus sp.* (enchytrées)  
*F. candida*, *F. fimetaria* : *Folsomia candida*, *Folsomia fimetaria* (collemboles)  
*H. aspersa* : *Helix aspersa* (escargot)  
*L. rubellus*, *L. terrestris* : *Lumbricus rubellus*, *Lumbricus terrestris* (vers de terre)  
*P. scaber* : *Porcellio scaber* (cloporte)

### Plantes terrestres :

*A. cepa* : *Allium cepa* (oignon)  
*A. sativa* : *Avena sativa* (avoine)  
*B. alba*, *B. chinensis*, *B. napus* : *Brassica alba* (moutarde), *Brassica chinensis* (chou chinois), *Brassica napus* (colza)  
*F. sp.* : *Fetuca sp.* (fétuque)  
*G. max* : *Glycine max* (soja)  
*H. vulgare* : *Hordeum vulgare* (orge)  
*L. sativa* : *Lactuca sativa* (laitue)  
*L. sativum* : *Lepidium sativum* (crésson alénois)  
*L. perenne* : *Lolium perenne* (ray-grass anglais)  
*L. esculentum* : *Lycopersicon esculentum* (tomate)  
*M. sativa* : *Medicago sativa* (luzerne)  
*N. tabacum* : *Nicotinum tabacum* (tabac)  
*P. nipponensis*, *P. vulgaris* : *Phaseolus nipponensis* (haricot nippon), *Phaseolus vulgaris* (haricot commun)  
*S. alba* : *Sinapsis alba* (moutarde blanche)  
*S. tuberosum* : *Solanum tuberosum* (pomme de terre)  
*S. bicolor*, *S. sudanense* : *Sorghum bicolor* (sorgho commun), *Sorghum sudanense* (sorgho du Soudan)  
*T. aestivum* : *Triticum aestivum* (blé)  
*T. sp.* : *Tradescantia sp.* (éphémère)  
*T. pratense*, *T. repens* : *Trifolium pratense* (trèfle violet ou des prés), *Trifolium repens* L. (trèfle blanc)  
*V. faba* : *Vicia faba* (fève)  
*Z. mays* : *Zea mays* (maïs)

**Organismes aquatiques:**

- A. marina* : *Arenicola marina* (arénicole)
- A. rubens* : *Asterias rubens* (étoile de mer)
- B. calyciflorus* : *Brachionus calyciflorus* (rotifère)
- C. dubia* : *Ceriodaphnia dubia* (cériodaphnie)
- C. gigas* : *Crassostrea gigas* (huitre creuse)
- D. rerio* : *Danio rerio* (poisson zèbre)
- D. magna* : *Daphnia magna* (daphnie)
- L. minor* : *Lemna minor* (lentille d'eau)
- M. edulis* : *Mytilus edulis* (moule bleue)
- N. diversicolor* : *Nereis diversicolor* (néreis)
- P. pugio* : *Palaemonetes pugio* (crevette marine)
- P. waltl* : *Pleurodeles waltl* (triton de waltl)
- X. laevis* : *Xenopus laevis* (xénope)

**Micro-organismes :**

- Acinetobacter sp.*
- Mycobacterium sp. SNP11, Mycobacterium gilvum*
- Pseudomonas sp.*
- Pseudokirchneriella subcapitata*
- Rhodococcus sp.*
- Salmonella typhimurium*
- Sphingomonas sp.*
- Trametes versicolor*
- Vibrio fischeri* (bactérie marine)

## Liste des sites internet consultés

ADEME (Agence de l'Environnement et de Maitrise de l'Energie)

<http://www2.ademe.fr/servlet/KBaseShow?sort=-1&cid=96&m=3&catid=10157>

BASOL (Base de données sur les sites et sols pollués – MEEDDM)

<http://basol.environnement.gouv.fr/tableaux/home.htm>

BRGM (Bureau de Recherches Géologiques et Minières)

[http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/Documents/Appui/BD\\_Sol\\_existantes\\_et\\_gestion\\_SSP\\_V0-022007.pdf](http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/Documents/Appui/BD_Sol_existantes_et_gestion_SSP_V0-022007.pdf)

DRIRE Lorraine (Directions Régionales de l'Industrie, de la Recherche et de l'Environnement)

<http://217.167.195.132/webdrire/files/DEI/Bilan02SSpollues.pdf>

[http://www.lorraine.drire.gouv.fr/webdrire/files/DEI/BIL09\\_SSP.pdf](http://www.lorraine.drire.gouv.fr/webdrire/files/DEI/BIL09_SSP.pdf)

EC SCF (*European Commission – Scientific Committee on Food*)

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154_en.pdf)

Eric Vindimian (MEEDDM)

[http://eric.vindimian.9online.fr/fr\\_download.html](http://eric.vindimian.9online.fr/fr_download.html)

ETC (*Educational Technology Clearinghouse*)

[http://etc.usf.edu/clipart/47900/47924/47924\\_earthworm\\_1g.gif](http://etc.usf.edu/clipart/47900/47924/47924_earthworm_1g.gif)

GISFI (Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Fiches Industrielles)

<http://www.gisfi.fr>

INRA (Institut national de Recherche Agronomique)

<http://www.inra.fr/>

IPCS (*International Programme on Chemical Safety*)

<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm>

Préfecture de la Région Lorraine

<http://www.lorraine.pref.gouv.fr/index.php?headingid=303>

Université Franche-Comté

<http://chrono-environnement.univ-fcomte.fr/IMG/jpg/Fig41.jpg>

Université de Lille 1

<http://cnriut09.univ-lille1.fr/articles/Articles/Fulltext/156a.pdf>

<http://cnriut09.univ-lille1.fr/articles/Articles/Fulltext/158a.pdf>

US Environmental Protection Agency (US-EPA)

<http://www.epa.gov/ncea/pdfs/riskcom/menzie.pdf>

<http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/organics/610.pdf>

## Liste des articles et des communications

### Articles dans des revues internationales, soumis à un comité de lecture

BIOAVAILABILITY OF CHEMICAL POLLUTANTS IN CONTAMINATED SOILS AND PITFALLS OF CHEMICAL ANALYSIS IN HAZARD ASSESSMENT

VASSEUR Paule, BONNARD Marc, PALAIS Frédéric, EOM Ig-Chun, MOREL Jean-Louis  
*Environmental Toxicology*, 2008, Volume 23, Issue 5, pages 652-656

GENOTOXIC AND REPRODUCTIVE EFFECTS OF AN INDUSTRIALLY CONTAMINATED SOIL ON THE EARTHWORM *EISENIA FETIDA*

BONNARD Marc, EOM Ig-Chun, MOREL Jean-LOUIS et VASSEUR Paule  
*Environmental Molecular and Mutagenesis*, 2009, Volume 50, Issue 1, pages 60-67

THE INFLUENCE OF THERMAL DESORPTION ON GENOTOXICITY OF MULTI-POLLUTED SOIL

BONNARD Marc, DEVIN Simon, LEYVAL Corinne, MOREL Jean-Louis et VASSEUR Paule

*Ecotoxicology and Environmental Safety*, en ligne

*IN-VIVO* GENOTOXIC EFFECT OF NICKEL, TRIVALENT CHROMIUM AND HEXAVALENT CHROMIUM ON THE EARTHWORM *EISENIA FETIDA* USING COMET ASSAY

BIGORGNE Emilie, COSSU-LEGUILLÉ Carole, BONNARD Marc et NAHMANI Johanne  
*Accepté pour publication dans la revue Chemosphere*

### Articles dans des revues internationales, soumis à un comité de lecture (hors cadre de la thèse)

EFFECTS OF CADMIUM ON ANEUPLOIDY AND HEMOCYTE PARAMETERS IN THE PACIFIC OYSTER, *CRASSOSTREA GIGAS*

BOUILLY Karine, GAGNAIRE Béatrice, BONNARD Marc, THOMAS-GUYON Hélène, RENAULT Tristan, MIRAMAND Pierre et LAPEGUE Sylvie  
*Aquatic Toxicology*, 2006, Volume 78, Issue 2, pages 149-156

IMPACT OF DIURON ON ANEUPLOIDY AND HEMOCYTE PARAMETERS IN THE PACIFIC OYSTER, *CRASSOSTREA GIGAS*

BOUILLY Karine, BONNARD Marc, GAGNAIRE Béatrice, RENAULT Tristan et LAPEGUE Sylvie

*Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2007, Volume 52, Issue 1, pages 58-63

EFFECTS OF COPPER ON THE BURROWING BEHAVIOR OF ESTUARINE AND COASTAL INVERTEBRATES, THE POLYCHAETE *NEREIS DIVERSICOLOR* AND THE BIVALVE *SCROBICULARIA PLANA*

BONNARD Marc, ROMEO Michèle et AMIARD-TRIQUET Claude  
*Human and Ecological Risk Assessment*, 2009, Volume 15, Issue 1, pages 11-26

**Communications orales - colloques internationaux**

BIOAVAILABILITY OF CHEMICAL POLLUTANTS IN CONTAMINATED SOILS

VASSEUR Paule, BONNARD Marc, PALAIS Frédéric, RAST Claudine, VEBER Anne-Marie, COSSU-LEGUILLE Carole et MOREL Jean-Louis

*International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA), 13th, Toyama, Japon, 19-24 Août 2007*

GENOTOXICITY AND ECOTOXICITY OF A POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs)-CONTAMINATED SOIL ORIGINATING FROM AN OLD COKING SITE

BONNARD Marc, EOM Ig-Chun, FAURE Pierre, MOREL Jean-Louis et VASSEUR Paule

*Soil and Wetlands Ecotoxicology (SOWETOX), 1st, Barcelone, Espagne, 26-27 Novembre 2007*

GENOTOXICITY OF POLLUTED SOILS: RESPONSE OF BIOLOGICAL INDICATORS.

VASSEUR Paule et BONNARD Marc,

*International Conference on Environmental Mutagens (ICEM), 10th, Florence, Italie, 20-25 Août 2009*

GENOTOXICITY OF COKING PLANT SOILS IN THE EARTHWORM *EISENIA FETIDA*

BONNARD Marc, LEYVAL Corinne, MOREL Jean-Louis, GRAND Cécile, VEBER Anne-Marie et VASSEUR Paule

*International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA), 14th, Metz, France, 30 Août-4 Septembre 2009*

*(prix de la meilleure communication orale - jeune chercheur)*

**Conférence invitée - colloque international**

APPROCHE DE L'IMPACT DE SOLS POLLUES SUR LES ORGANISMES TERRESTRES

BONNARD Marc, GRAND Cécile et VASSEUR Paule

*Colloque international sur la Toxicologie environnementale et agroalimentaire dans l'espace francophone, Sousse, Tunisie, 9-11 Novembre 2009*

**Communications orales - colloques nationaux**

RELATIONS « BIODISPONIBILITE – GENOTOXICITE - ECOTOXICITE » DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) DANS LES SOLS DE FRICHES INDUSTRIELLES

BONNARD Marc, EOM Ig-Chun, FAURE Pierre, MOREL Jean-Louis et VASSEUR Paule

*Réseau de recherche « Evaluer et réduire les impacts de la chimie sur l'environnement » (CNRS-ERICHE), Paris, France, 13-14 Novembre 2007.*

RELATIONS « BIODISPONIBILITE – GENOTOXICITE - ECOTOXICITE » DES HYDROCARBURES AROMATIQUES POLYCYCLIQUES (HAP) DANS LES SOLS DE FRICHES INDUSTRIELLES.

BONNARD Marc, EOM Ig-Chun, FAURE Pierre, MOREL Jean-Louis et VASSEUR Paule

*Réseau de recherche « Evaluer et réduire les impacts de la chimie sur l'environnement » (CNRS-ERICHE), Cap Hornu, France, 02-03 Octobre 2008.*

TOXICITE, BIODISPONIBILITE, GENOTOXICITE DE SOLS DE FRICHES INDUSTRIELLES SUR LE VER DE TERRE *EISENIA FETIDA*.

BONNARD Marc, GRAND Cécile et VASSEUR Paule

*Deuxièmes rencontres nationales de la recherche sur les sites et sols pollués : pollutions locales et diffuses, Paris, France, 20-21 Octobre 2009.*

GENOTOXICITE DE SOLS ANCIENNEMENT CONTAMINES CHEZ LE VER DE TERRE *EISENIA FETIDA* ET IMPACT AU NIVEAU POPULATIONNEL.

BONNARD Marc, GRAND Cécile et VASSEUR Paule

*Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée (SEFA), Versailles, France, 31 Mars-01 Avril 2010.*

### **Communication orale - colloque national (hors cadre de la thèse)**

VARIATIONS TEMPORELLES DU TAUX D'ANEUPLOIDIE D'HUITRES CREUSES *CRASSOSTREA GIGAS* SUR LA VASIERE DE BROUAGE ET TOXICITE DE L'ATRAZINE ET DU CADMIUM EN MILIEU CONTROLE.

BOUILLY Karine, BONNARD Marc, LEITAO Alexandra, McCOMBIE Hélène et LAPEGUE Sylvie.

*Fonctionnement écologique des vasières littorales et sociétés humaines, La Rochelle, France, 3-4 Novembre 2004.*

### **Communications affichées – colloques nationaux**

TOXICITE ET GENOTOXICITE DE SOLS POLLUES SUR LE VER DE TERRE *EISENIA FETIDA*

BONNARD Marc, GRAND Cécile et VASSEUR Paule

*Séminaire de l'école doctorale RP2E, Vandoeuvre les nancy, France, 15 janvier 2009.*

GENOTOXICITE DU NICKEL DIVALENT, DU CHROME TRIVALENT ET DU CHROME HEXAVALENT SUR LES COELOMOCYTES DU VER DE TERRE *EISENIA FETIDA*

BIGORGNE Emilie, BONNARD Marc, NAHMANI Johanne et COSSU-LEGUILLE Carole

*Deuxièmes rencontres nationales de la recherche sur les sites et sols pollués : pollutions locales et diffuses, Paris, France, 20-21 Octobre 2009.*

### **Communication affichée – colloque international (hors cadre de la thèse)**

EFFECTS OF NEUROTOXIC CONTAMINANTS ON THE BURROWING BEHAVIOUR OF ESTUARINE INVERTEBRATES

BONNARD Marc, ROMEO Michèle et AMIARD-TRIQUET Claude

*European Congress of the Society of Environmental Toxicology And Chemistry (SETAC), 16th, La Haye, Pays-Bas, 7-11 Mai 2006 (poster corner)*

# *Introduction*



## **Introduction**

Les friches industrielles ont en commun la caractéristique d'être le siège d'une pollution mixte et complexe, dominée par la présence de composés organiques et/ou minéraux préoccupants car persistants dans l'environnement et potentiellement toxiques pour l'homme et les écosystèmes.

En 2005 et 2007, l'Agence Européenne de l'Environnement (EEA) a dressé un bilan de la situation en Europe concernant les sites et sols pollués. Le nombre de sites nécessitant une décontamination des sols est d'environ 250 000. Ce nombre est en constante progression et une augmentation de 50% est envisagée d'ici 2025. De ce fait, la gestion et la remédiation des anciens sites industriels, ainsi que la prévention de nouvelles contaminations, est devenue une nécessité et un enjeu essentiel du développement durable. Une directive européenne qui vise à instaurer des objectifs communs en matière de protection des sols entre les différents pays membres de l'Union Européenne (UE) est par ailleurs en étude.

Au niveau national, la gestion des anciens sites industriels pollués est effectuée dans le cadre de la législation relative aux Installations classées pour la Protection de l'Environnement. La politique en matière de sites et sols pollués s'appuie sur la prévention de la pollution des sols, le traitement et la réhabilitation des sites contaminés en fonction de l'impact potentiel sur l'homme et sur l'environnement et de l'usage auxquels ils sont destinés. Il devient alors nécessaire de connaître les risques potentiels représentés par la pollution des sols (DRIRE, 2008, 2009).

D'une manière générale, les craintes suscitées par les sites pollués sont à la mesure de notre méconnaissance du comportement, du devenir et des effets à long terme des contaminants incriminés. Même si la typologie de la pollution est globalement bien définie, la fraction de la pollution identifiée reste partielle. Les questions récurrentes posées lors des évaluations de risques concernent la biodisponibilité des polluants, leurs interactions possibles, et les effets potentiels de la pollution non caractérisée. Les mêmes questions se posent lors des traitements de remédiation - physique, chimique ou thermique - des sols pollués. Est-ce que l'abaissement du niveau de pollution attesté par des indicateurs types garantit bien l'innocuité du sol traité ? Le traitement n'a-t-il pas engendré des produits de transformation toxiques ?

Qu'en est-il des effets des produits résiduels, compte tenu de leur spéciation, leur forme chimique, leur biodisponibilité et leurs interactions ?

La réponse à ces questions implique l'évaluation des effets de l'ensemble des contaminants biodisponibles des sols à l'aide d'une approche biologique, venant compléter les analyses physico-chimiques. L'écotoxicité de la fraction de la pollution du sol mobilisable par l'eau et présente dans les extraits aqueux (lixiviats, percolats) a tout d'abord été évaluée car elle est susceptible de menacer la santé humaine. Les effets sont mesurés sur les organismes aquatiques, la mutagénicité sur bactéries pouvant être prise en compte dans le cas de matrices contaminées par des substances génotoxiques. L'écotoxicité de la matrice « sol » a ensuite été évaluée en mesurant les effets sur la germination, la croissance des plantes supérieures, sur la survie, la reproduction d'invertébrés terrestres comme les vers de terre et les collemboles. Il apparaît aujourd'hui nécessaire de mieux appréhender les effets à long terme éventuels des sols pollués sur les espèces terrestres et leurs effets au niveau populationnel.

Lors des récents congrès et ateliers nationaux et internationaux portant sur le sujet, des recommandations ont été faites en terme de priorités de recherche pour l'évaluation des risques des sols pollués (Spurgeon *et al.*, 2003, Van Gestel & Weeks, 2004, Belkessam, 2005). Elles ont souligné la nécessité de i) travailler sur les échantillons de sols contaminés sur les sites et non sur sols dopés, ii) orienter les recherches sur l'étude des sols avec une typologie de contamination majoritairement organique, les pollutions métalliques ayant déjà fait l'objet de nombreux travaux, iii) identifier les biomarqueurs de toxicité qui soient représentatifs des perturbations de la dynamique des populations des invertébrés, et des vers de terre en particulier.

*Avant de présenter les objectifs de notre étude et les résultats obtenus, nous présenterons dans le prochain chapitre (synthèse bibliographique) la problématique liée aux sites et sols pollués, les différentes étapes dans l'évaluation des risques et la réhabilitation des friches industrielles. Enfin, nous détaillerons l'écotoxicité et la génotoxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des métaux lourds vis-à-vis des organismes terrestres.*

*Synthèse*  
*bibliographique*

# Synthèse bibliographique

## II. 1. Problématique liée aux sites et sols pollués.

Mines, usines sidérurgiques, métallurgiques, pétrochimiques, combustions de matière carbonée, usines à gaz, décharges sauvages, traitement du bois, activités domestiques... . Nombreuses sont les activités humaines qui durant des décennies ont rejeté dans l'environnement des quantités importantes de micropolluants, faute de techniques et de réglementation stricte en matière de protection. Ces micropolluants se sont accumulés au fil du temps au niveau des sols où ils atteignent des teneurs supérieures à celles des fonds géochimiques. Les hydrocarbures, notamment les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les produits chlorés et les métaux lourds sont les principaux polluants trouvés dans les sols contaminés (BASOL, <http://basol.ecologie.gouv.fr/home.htm>).

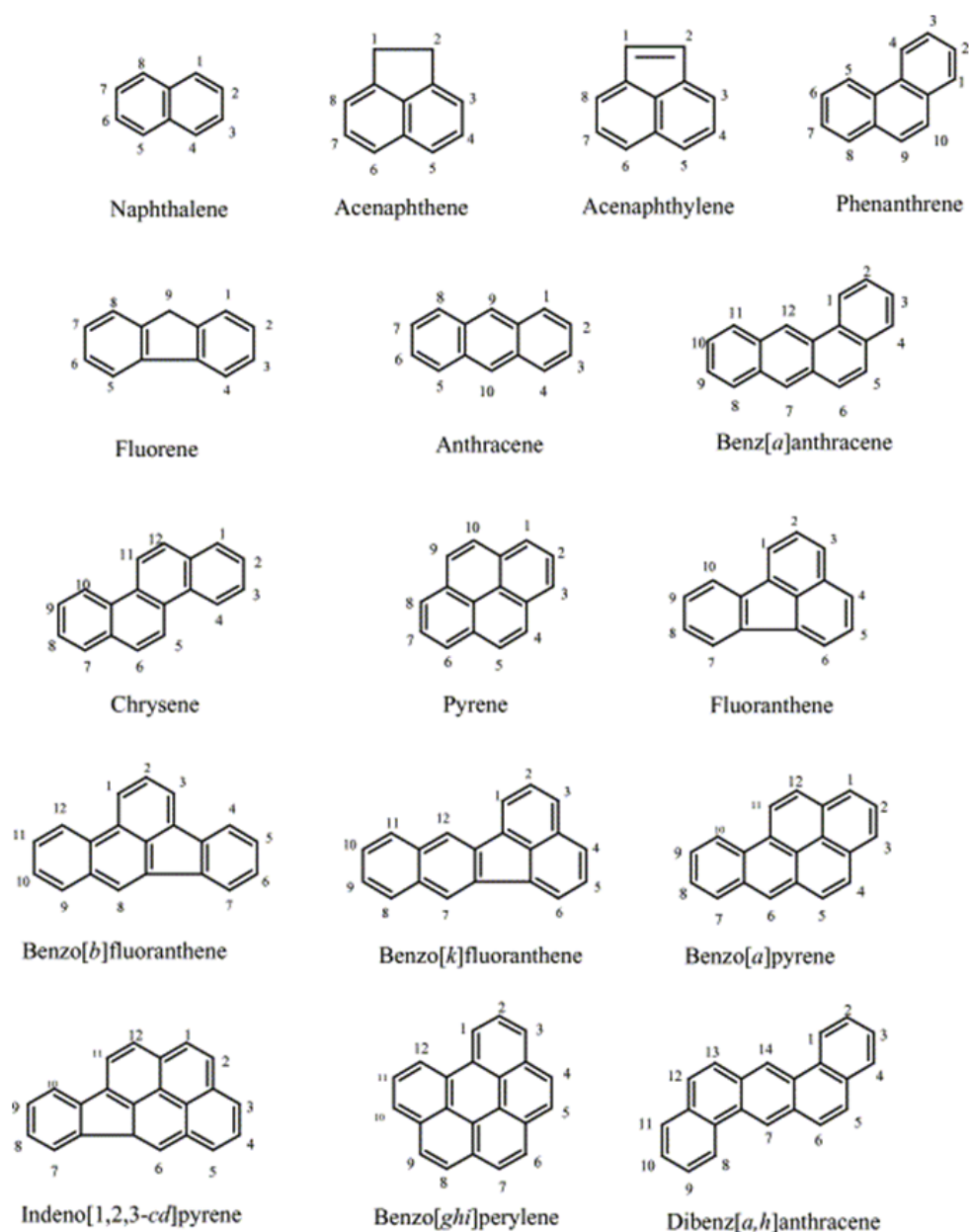
### II.1.1. Les Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP)

#### Origine des HAP

Les HAP constituent une vaste famille de composés organiques, neutres, apolaires, formés par la fusion de plusieurs noyaux benzéniques (2 à 6 cycles) à configuration angulaire ou linéaire, et renfermant seulement des atomes d'hydrogène et de carbone. Le nombre de HAP identifiés à ce jour dépasse la centaine. Bien qu'ils soient naturellement présents dans l'environnement (sols de forêts de sapins, de hêtres, éruption volcanique), les HAP sont essentiellement d'origine pyrolytique. Les HAP sont générés par des processus de combustion incomplète de matières carbonées à haute température. Ils sont donc très présents sur les sites de cokéfaction, les usines à gaz et les sites carbochimiques. Les goudrons de houille renferment, pour une partie importante, des HAP et d'autres composés en plus faible proportion tels que les hydrocarbures mono aromatiques volatils (benzène, éthylbenzène, toluène, xylènes ou BTEX), les phénols... (Costes & Druelle, 1997). Suite à des déversements accidentels ou volontaires à l'époque du fonctionnement des sites industriels ou lors de leur démantèlement, les goudrons qui étaient généralement stockés dans des cuves enterrées se sont répandus dans les sols et les sous-sols (Rollin & Quiot, 2005).

En raison de la diversité des HAP, seize d'entre eux sont prioritairement mesurés dans le cadre d'études sanitaires et environnementales (US-EPA, 1982). Il s'agit du :

*Naphtalène* (2 noyaux aromatiques), *Acénaphthène*, *Acénaphthylène*, *Anthracène*, *Fluorène*, *Phénanthrène* (3 noyaux aromatiques), *Benzo[a]anthracène*, *Chrysène*, *Fluoranthène*, *Pyrène*, (4 noyaux aromatiques), *Benzo[a]pyrène*, *Benzo[b]fluoranthène*, *Benzo[k]fluoranthène*, *Dibenzo[ah]anthracène* (5 noyaux aromatiques), *Benzo[ghi]pérylène* et *Indeno[1,2,3-cd]pyrène* (6 noyaux aromatiques) (figure 1).



**Figure 1** : Structure des 16 hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) prioritaires, définis par l'US-EPA (dénomination anglaise).

### Comportement et devenir des HAP dans les sols

Les HAP ont comme caractéristiques communes des points de fusion et d'ébullition élevés, une faible volatilité et hydrosolubilité. Cette dernière diminue lorsque le poids moléculaire augmente (tableau I, page 6). On distingue :

- Les HAP dits légers ou de faible poids moléculaire (de 128 à 178 g/mol soit 2 ou 3 noyaux aromatiques), qui ont la plus grande volatilité et hydrosolubilité.
- Les HAP de poids moléculaire intermédiaire (de l'ordre de 202 g/mol soit 4 noyaux aromatiques)
- Les HAP de poids moléculaire élevé (de l'ordre de 228-278 g/mol soit 5 ou 6 noyaux aromatiques) qui ont la plus faible hydrosolubilité.

Les HAP présentent des coefficients de partage octanol/eau ( $K_{ow}$ ) très élevés qui leur confèrent une forte liposolubilité. Les HAP sont donc potentiellement bioaccumulables par les organismes. La persistance des HAP dans les sols est d'autant plus importante que les congénères sont de poids moléculaire élevé. Malgré une stabilité relativement élevée dans les sols, différents processus physico-chimiques (volatilisation, photo-oxydation, lixiviation, lessivage des sols) et biologiques (biodégradation, influence de la faune et de la flore) peuvent modifier la structure, le comportement, le devenir et la toxicité des HAP dans les sols.

La biodégradation et la co-métabolisation des HAP par les microorganismes du sol, bactéries et champignons, constituent la principale voie de dégradation des HAP. La biodégradation se fait essentiellement par voie aérobie et dans une moindre mesure par voie anaérobie. La biodégradabilité des HAP est fonction du coefficient de partage/octanol eau. Les HAP de faible poids moléculaire (2 et 3 noyaux aromatiques) sont davantage soumis à la biodégradation que les HAP de poids moléculaire plus élevé (4 et 5-6 noyaux aromatiques). La biodégradation du naphthalène (2 noyaux aromatiques) et du phénanthrène (3 noyaux aromatiques) est bien connue. Des souches bactériennes de type Gram négatif comme les *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter* isolées à partir de sols pollués ont montré leur capacité à métaboliser ces HAP, par l'intervention notamment de dioxygénases (Fritsche & Hofrichter, 2000).

**Tableau I** : Propriétés physico-chimiques des 16 HAP prioritaires définis par l'US-EPA.

HAP	Nb noyaux	Abréviation	N°	Poids moléculaire (g/mol)	Log K <sub>oc</sub> <sup>b</sup> sans unité	Solubilité (mg/L)	Log K <sub>ow</sub> <sup>a</sup> (sans unité)	Pression vapeur (Pa à 25°C)
Naphtalène	2	NA	91-20-3	128	3.11	31.7	3.4	10.4
Acénaphtylène	3	ACL	208-96-8	152	3.83	-	4.07	8.9X10 <sup>-1</sup>
Acenaphtène	3	ACL	82-32-9	154	3.79	3.93	3.92	2,9X10 <sup>-1</sup>
Fluorène	3	FL	96-73-7	166	4.15	1.98	4.18	8.0X10 <sup>-2</sup>
Phénanthrène	3	PHE	85-01-8	178	4.22	1.29	4.6	1.6X10 <sup>-2</sup>
Anthracène	3	ATR	120-12-7	178	4.41	0.073	4.5	8.0X10 <sup>-4</sup>
Fluoranthène	4	FA	206-44-0	202	4.74	0.26	5.22	1.2X10 <sup>-3</sup>
Pyrène	4	PY	129-00-0	202	4.82	0.135	5.18	6.0X10 <sup>-4</sup>
Benzo[a]anthracène	4	BaA	56-55-3	228	5.25	0.014	5.61	2.8X10 <sup>-5</sup>
Chrysène	4	CHR	218-01-9	228	5.37	0.002	5.91	8.4X10 <sup>-5</sup>
Benzo[b]fluoranthène	5	BbFA	205-99-2	252	5.89	0.001	6.12	6,7X10 <sup>-5</sup>
Benzo[k]fluoranthène	5	BkFA	207-08-9	252	5.89	0.0008	6.84	1.3X10 <sup>-8</sup>
Benzo[a]pyrène	5	BaP	50-32-8	252	5.71	0.0038	6.5	7.3X10 <sup>-7</sup>
Dibenzo[a,h]anthracène	5	DBahA	53-70-3	278	5.97	0.0005	6.5	1.3X10 <sup>-8</sup> (20°C)
Benzo[g,h,i]perylène	6	BghiP	191-24-2	276	-	0.00026	7.1	1.4X10 <sup>-8</sup>
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	6	IP	193-39-5	276	6.14	0.0062	6.58	1.3X10 <sup>-8</sup> (20°C)

<sup>a</sup> donnée de *Environmental Health Criteria 202* (IPCS, 1998)

<sup>b</sup> données de Sverdrup *et al.* (2002b)

La biodégradation des HAP de poids moléculaire élevé (> 4 noyaux aromatiques) est plus lente (de plusieurs mois à plusieurs années) et peut conduire à la formation de métabolites plus ou moins toxiques. Peu de données existent sur les bactéries capables de biodégrader ces HAP de poids moléculaire élevé (Juhasz & Naidu, 2000). Il s'agirait principalement de bactéries de type Gram positif telles que les actinomycètes appartenant aux genres *Mycobacterium*, *Rhodococcus*... . Un consortium bactérien capable de minéraliser rapidement le pyrène a été isolé à partir de sédiments de la Moselle. Ce consortium est composé d'une vingtaine de souches. Pagnout *et al.* (2006, 2007) ont montré que la souche *Mycobacterium* sp. SNP11, proche de *Mycobacterium gilvum*, a un fort potentiel de biodégradation du pyrène. Ces souches bactériennes ont une paroi riche en acides mycoliques, leur permettant une forte adhésion et une biodégradation facilitée des polluants hydrophobes.

Les champignons filamenteux, incluant des zygomycètes, ascomycètes et des basidiomycètes, dont les champignons vecteurs de la pourriture blanche (ex : *Trametes versicolor*), ont la capacité de dégrader les HAP de poids moléculaire élevé (> 3 noyaux aromatiques) et plus généralement les HAP faiblement biodisponibles. Ces champignons attaquent la structure des HAP par la production d'enzymes extracellulaires de type lignine peroxydases, laccases.... . Ces champignons présentent un réel intérêt dans la bioremédiation de sols anciennement contaminés (Rama *et al.*, 2001 ; Mougín, 2002 ; Mougín *et al.*, 2003 ; Potin *et al.*, 2004).

Différents paramètres influencent la biodégradation des HAP dans les sols contaminés. Il peut s'agir de paramètres inhérents aux microorganismes du sol tels que la nature, la diversité de la flore bactérienne et fongique. La biodégradation des HAP dans les sols est également influencée par les caractéristiques intrinsèques du sol, telles que le pH, la température, les teneurs en oxygène, en eau et en nutriments (RECORD, 2007). La biodisponibilité des HAP est également un facteur limitant leur biodégradabilité. Les HAP sont peu mobiles dans les sols car facilement adsorbés sur les matrices solides et notamment la matière organique (Nowak *et al.*, 2003 ; Rollin & Quiot, 2005). Les HAP adsorbés sont faiblement disponibles et biodégradables par les microorganismes, du fait des fortes interactions hydrophobes entre le polluant et le sol (RECORD, 2007). L'âge de la pollution est également une limite à la biodisponibilité des HAP. Avec le vieillissement, les polluants vont accéder à des sites d'adsorption du sol peu accessibles aux microorganismes. L'atténuation naturelle des HAP dans les sols est dépendante à la fois des caractéristiques physico-chimiques des polluants et des sols considérés (Nowak *et al.*, 2003 ; Semple *et al.*, 2003).



## II.1.2. Les métaux lourds

### Origine des métaux lourds

Les métaux lourds et métalloïdes sont présents de façon naturelle dans les sols car ils proviennent de l'altération de la roche-mère du sous-sol. L'extraction des minerais est une source importante de contamination des écosystèmes terrestres et aquatiques. Alors que les teneurs en nickel sont inférieures à 100 mg/kg dans la majorité des sols, les sols ultramafiques ou miniers de Nouvelle-Calédonie présentent des teneurs totales en nickel de l'ordre de 3 à 5 g/kg de sol (L'Huillier & Edighoffer, 1996 ; Hery *et al.*, 2003).

Le stockage de déchets industriels miniers, de fonderies de métaux, les retombées atmosphériques des poussières des industries métallurgiques sont également des sources de contamination des sols par les métaux lourds. Les métaux lourds sont également présents dans les charbons destinés à la production du coke, combustible utilisé par les fonderies et les hauts fourneaux sidérurgiques. Le cadmium, le manganèse, le cobalt, le chrome, le cuivre, le plomb, le mercure, le nickel et le zinc sont les métaux lourds les plus fréquemment retrouvés à de fortes concentrations dans les sols de friches industrielles (Jeannot *et al.*, 2001 ; Rollin & Quiot, 2005).

### Comportement et devenir des métaux lourds dans les sols

La spéciation chimique des métaux lourds, c'est-à-dire leur répartition entre différents états d'oxydation ou de complexation, détermine principalement leur distribution dans les phases aqueuses ou solides du sol. Les propriétés physico-chimiques des sols telles que le pH, le potentiel d'oxydo-réduction influencent la spéciation des métaux lourds et conditionnent généralement leur solubilité, leur mobilité ainsi que leur toxicité vis-à-vis des organismes. Un pH acide favorise la mise en solution des sels métalliques et accroît leur toxicité. Le chrome sous sa forme hexavalente (CrVI) est plus mobile et toxique vis-à-vis des organismes que le chrome trivalent (CrIII).

La biodisponibilité et l'écotoxicité des métaux lourds dépendent également de leurs interactions avec les fractions organiques et/ou minérales du sol. Les minéraux argileux possèdent de grandes capacités d'échanges cationiques. Par adsorption, les argiles peuvent retenir une quantité importante de métaux lourds. Etant de bons adsorbants, les différents oxydes et hydroxydes métalliques présents dans les sols (fer, aluminium, manganèse...)

jouent aussi un rôle important dans la rétention des ions métalliques. Les carbonates présents dans les sols peuvent également incorporer dans leur maille cristalline des cations métalliques, réduisant ainsi leur biodisponibilité et leur toxicité. De même que pour les HAP, la matière organique du sol peut adsorber efficacement par complexation les ions métalliques avec un haut degré de sélectivité. Il peut se former de fortes liaisons ioniques ou covalentes, réduisant la mobilité et la toxicité des métaux lourds. La force et la réversibilité de la liaison dépendent du ligand organique mis en jeu. Dans les sols, il existe de nombreux ligands organiques de type carboxylique, phénolique, carbonyle, capables de se lier aux métaux lourds (Deschamps *et al.*, 2006).

La composition chimico-minéralogique du sol est un paramètre important qui va influencer la biodisponibilité et l'écotoxicité des métaux lourds. Ces éléments n'étant pas biodégradables, ils constituent des composés extrêmement stables dans l'environnement (Lemière *et al.*, 2001 ; Nowak *et al.*, 2003).

### **II.1.3. HAP et métaux lourds dans les sols industriels**

C'est au cours du XIX<sup>ème</sup> Siècle que les concentrations en HAP dans les sols industrialisés ont commencé à augmenter, avec un pic dans les années 1950-1960 (Juhasz & Naidu, 2000). Le tableau II (page 10) présente les résultats d'études sur les teneurs en HAP dans des sols industriels résultant d'une contamination ancienne ou récente. Le type d'activité entreprise ainsi que la proportion relative des HAP à 2, 3, 4 ou 5-6 noyaux aromatiques ont été pris en considération.

**Tableau II** : Teneurs en HAP totaux (en mg/kg) et proportion relative (2, 3, 4, 5-6 noyaux aromatiques) des congénères des HAP dans des sols, suivant les activités industrielles.

Sols contaminés	$\Sigma_{16 \text{ HAP}}$ (mg/kg)	Proportion HAP (%)				Références
		2	3	4	5-6	
cokeries	2634	0,5	27,5	<b>52</b>	20	Présente étude
	1539	2	25	<b>48</b>	25	
cokerie	5326	0,5	10	<b>48,5</b>	41	Smith et al. [2006]
cokerie en activité	1141	1	35	<b>39</b>	25	Mendonça & Picado [2002]
Distillation goudron de houille	2894	20	<b>44</b>	28	8	Lors et al. [2009]
stockage et traitement du bois	2800	2	<b>42</b>	40	16	Sayles et al. [1999]
usines à gaz	310	0	23	35	<b>42</b>	Haeseler et al. [1999]
<i>sols plus ou moins à proximité de la source de contamination</i>	877	0	9	44	<b>47</b>	
	4673	2	<b>47</b>	44	7	
	6732	11	21	<b>44</b>	29	
production de créosote	5863	20	<b>46</b>	34	0	Juhasz & Naidu [2000] *
stockage et traitement du bois	18704	21	<b>58</b>	19	2	
usine à gaz	7337	0	10	<b>46</b>	44	
usine à gaz	974	0	15	<b>52</b>	33	
usine à gaz	451	21	28	<b>34</b>	17	
pétrochimie	821	22	<b>41</b>	33	4	

En gras est indiquée la proportion en HAP la plus importante dans le sol. \* Juhasz & Naidu (2000) ont repris différentes études qui ont analysé les concentrations en HAP dans les sols. Ces auteurs n'ont renseigné que les concentrations de 15 congénères des HAP (le Benzo[g,h,i]pérylène, à 6 noyaux aromatiques, est manquant).

Les teneurs en HAP dans les sols varient sensiblement de quelques centaines à plusieurs milliers de mg/kg de sol. Ces teneurs en HAP dans les sols sont de 6 à 370 fois supérieures à la valeur de référence qui est de 50 mg HAP/kg de sol préconisée au niveau national (BRGM, 2007). Les teneurs en HAP dans les sols dépendent principalement du type d'activité industrielle. Les industries de traitement du bois sont parmi les plus polluantes (Juhasz & Naidu, 2000). Les activités de cokeries, de production de créosote (huiles extraites par distillation de goudron brut dans un four à coke, qui peuvent être composées à 85% d'HAP) ainsi que les anciennes usines à gaz émettent également de grandes quantités d'HAP dans les sols. Cette industrie du gaz fut au XIX<sup>ème</sup> Siècle un progrès décisif et un élément clé de la révolution industrielle. Le charbon permettait d'obtenir par pyrogénéation le gaz de ville capable d'éclairer, de chauffer et de cuire les aliments. Le remplacement ultérieur par du gaz

naturel plus énergétique, plus sûr et de production plus propre, a entraîné la fermeture des usines à gaz (Costes & Druelle, 1997).

Nous avons tenté de comparer la distribution des HAP dans ces différents sols industriels. Il est apparu que les congénères des HAP à 3 et 4 noyaux aromatiques étaient les plus représentés, avec un pourcentage relatif d'HAP à 3 noyaux aromatiques compris entre 9% et 58% et d'HAP à 4 noyaux aromatiques compris entre 19% et 52%. Haeseler *et al.* (1999) ont montré dans leur étude que les sols les plus éloignés de la source de contamination (usine à gaz) étaient principalement contaminés en HAP à 5-6 noyaux aromatiques, représentant un pourcentage relatif compris entre 42% et 47%. La contamination des sols à proximité des sites industriels peut donc être importante. Elle diminue de façon exponentielle avec l'éloignement de la source de contamination et dépend principalement des modes de transport et de la concentration en polluants (Crépineau *et al.*, 2003). Dans toutes les études, le phénanthrène a présenté la teneur la plus élevée parmi les congénères des HAP à 3 noyaux aromatiques, quel que soit le type d'activité industrielle. Il en a été de même pour le fluoranthène, représentant les HAP à 4 noyaux aromatiques. Ces études ont également montré que les teneurs en benzo[b]fluoranthène et en benzo[a]pyrène étaient supérieures aux teneurs des autres congénères des HAP à 5-6 noyaux aromatiques (Sayles *et al.*, 1999 ; Mendonça & Picado, 2002 ; Smith *et al.*, 2006).

Si le phénanthrène et le fluoranthène ne sont pas considérés comme cancérigènes (groupe 3) chez l'Homme et les mammifères par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer (IARC, 1987), leur génotoxicité est fortement suspectée par l'IARC et le comité scientifique européen de l'alimentation humaine (EC SCF, 2002). Le benzo[b]fluoranthène et le benzo[a]pyrène sont considérés par le SCF et l'IARC comme génotoxiques et cancérigènes possible (groupe 2B) pour le benzo[b]fluoranthène et probable (groupe 2A) pour le benzo[a]pyrène (tableau III, page 12).

**Tableau III:** Génotoxicité et cancérogénicité des 16 HAP prioritaires définis par l'US-EPA.

HAP	Nb noyaux	TEFs <sup>a</sup>	Classification de cancérogénicité		Classification de génotoxicité
			(IARC) <sup>b</sup>	(US EPA) <sup>c</sup>	(SCF) <sup>d</sup>
Naphtalène	2	0.001			PNG
Acénaphthylène	3	0.001		D	DI
Acénaphthène	3	0.001			DI
Fluorène	3	0.001	3	D	DI
Phénanthrène	3	0.001	3	D	E
Anthracène	3	0.01	3	D	L
Fluoranthène	4	0.001	3	D	E
Pyrène	4	0.001	3	D	NG
Benzo[a]anthracène	4	0.1	2A	B2	G
Chrysène	4	0.01	3	B2	G
Benzo[b]fluoranthène	5	0.1	2B	B2	G
Benzo[k]fluoranthène	5	0.1	2B	B2	G
Benzo[a]pyrène	5	1	2A	B2	G
Dibenzo[a,h]anthracène	5	5	2B	B2	G
Benzo[g,h,i]perylène	6	0.01	3	D	G
Indeno[1,2,3-cd]pyrène	6	0.1	2B	B2	G

<sup>a</sup> Facteur d'équivalent toxique en B[a]P selon Nisbet & LaGoy (1992)

<sup>b</sup> IARC (*International Agency for Research on Cancer*):

- 2A: Probablement cancérigène pour les humains
- 2B: peut-être cancérigène pour les humains
- 3: non classifiable

<sup>c</sup> US-EPA, IRIS (*Integrated Risk Information System*):

- B2: Probablement cancérigène pour les humains
- D: non classifiable

<sup>d</sup> EC, SCF (*Scientific Committee on Food*) (2002):

- PNG: Probablement non génotoxique
- DI: Base de donnée inadéquate pour l'évaluation
- L: preuve limitée
- E: suspecté
- NG: non génotoxique
- G: génotoxique

Le risque de cancer lié aux HAP est certainement l'un des plus anciennement connus, depuis la description en 1775 par le chirurgien britannique Percival Pott (1714-1788) des cancers de la peau et du scrotum chez les ramoneurs. Le pouvoir cancérigène des goudrons et des résidus de houille non brûlés a été confirmé 140 ans plus tard (1914-1916) par le médecin et biologiste japonais Yamagiwa (1863-1930). De nombreuses études sur les risques de cancer ont été réalisées parmi les populations de travailleurs professionnellement exposés. Les preuves les plus fortes de relation causale exposition – cancer portent sur les populations de travailleurs dans les cokeries et les anciennes usines à gaz (Costes & Druelle, 1997).

Outre l'exposition professionnelle, des facteurs liés aux modes de vie (alimentation, alcool, tabagisme actif et passif) peuvent également favoriser l'émergence de cancers. Le tabagisme est à l'origine de 90% des cancers du poumon chez les fumeurs de longue durée. Le tabagisme est également associé aux cancers de la langue, du larynx, du pharynx, de l'œsophage, du pancréas... (IARC, 2004, 2007). Les composés cancérigènes présents dans le tabac sont notamment des nitrosamines (4-(méthylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone), des amines aromatiques (4-aminobiphényl), des hydrocarbures comme le benzène, le B[a]P.

La génotoxicité des HAP chez les vertébrés résulte de la toxicité des métabolites réactifs formés à la suite des réactions de biotransformation s'effectuant chez les organismes exposés. Les métabolites réactifs se fixent sur les biomolécules, par exemple les molécules d'ADN, endommagent leur structure (formation d'adduits, de cassures,...) et altèrent leur fonctionnement. Les voies métaboliques d'activation des HAP a été largement explorée chez les mammifères et les vertébrés aquatiques (poissons) afin d'expliquer les effets cancérigènes des HAP lourds à 5 cycles aromatiques accolés ou plus (IARC, 1987 ; Miller & Miller, 1971). Chez les vertébrés, les HAP sont toxifiés suite à leur biotransformation, mais sont aussi rapidement éliminés. Bien que 90% des HAP émis dans l'environnement réside au niveau des sols (Zhu *et al.*, 2006), leur toxicité et leur génotoxicité sont encore mal connues chez les invertébrés terrestres, les vers de terre en particulier. Les sols industriels présentent le plus souvent une multicontamination par des polluants organiques (HAP, hydrocarbures monoaromatiques, aliphatiques) et inorganiques comme les métaux lourds. Certains métaux lourds sont également connus pour être cancérigènes chez l'homme tels que le cadmium, le nickel et le chrome hexavalent (IARC, 1990, 1993). De même que pour les HAP, leur génotoxicité vis-à-vis des organismes du sol est encore peu explorée.

Du fait de la rémanence et de la génotoxicité de ces composés organiques et inorganiques dans les sols, la réhabilitation des friches industrielles est devenue une question de santé publique et environnementale. La réhabilitation des friches industrielles n'est également pas étrangère aux facteurs socio-économiques (Scullion, 2006). Michel Mercier, ministre de l'espace rural et de l'aménagement du territoire, a signé le 7 janvier 2010 une convention foncière avec le groupe sidérurgique Arcelor-Mittal par laquelle le géant de la sidérurgie s'engage à discuter de l'utilisation de près de 500 hectares de friches industrielles qu'il détient sur ses sites mosellans (Gandrange, Illange et Belval). Ces friches industrielles pourraient faire partie du périmètre d'une future éco-agglomération (<http://www.lorraine.pref.gouv.fr/index.php?headingid=303>).

## II.2. Réhabilitation des friches industrielles

Historiquement, la préoccupation des autorités compétentes à la contamination des sols a été relativement faible, ce qui a pu conduire dans quelques cas à de véritables catastrophes écologiques. Dans la région de Sudbury au Canada, les émissions toxiques de fonderies ainsi que le dépôt de déchets miniers depuis la fin du XIX<sup>ème</sup> Siècle ont contaminé 50 000 hectares de sols en métaux lourds. Malgré les efforts intenses et les sommes investies dans des travaux de dépollution, cette zone sinistrée ne présente encore aujourd'hui qu'un très rare couvert végétal (Scullion, 2006).

En France, un siècle et demi d'histoire industrielle nous a légué des dizaines de milliers de sites anciens contaminés, potentiellement dangereux pour l'homme et son environnement. La réhabilitation des anciens sites industriels et miniers est une préoccupation relativement nouvelle pour les autorités compétentes, puisqu'elle date des années 1990. Les autorités ont commencé à s'intéresser à la réhabilitation des friches industrielles, à l'occasion de cas de pollutions devenus des « affaires médiatiques ». On peut noter l'exemple de la décharge de Montchanin en Saône-et-Loire où ont été déversés 600 000 tonnes de déchets industriels toxiques. C'est la 1<sup>ère</sup> installation de classe 1, pour les déchets industriels spéciaux, qui s'est ouverte en France en 1978. Après des années de procédures, les autorités décident en 1988 la fermeture du site en s'appuyant sur les observations des médecins locaux, d'une incidence jugée « élevée » de troubles respiratoires rebelles aux traitements. Diverses investigations sanitaires ont été conduites pour tenter de caractériser la réalité et l'ampleur des conséquences sanitaires de la décharge. Des analyses épidémiologiques, par la concordance des résultats relatifs à la morbidité irritative respiratoire (cohérente avec les données concernant la toxicité des COV), ont fortement appuyé l'hypothèse d'un impact des émissions d'hydrocarbures lors de l'activité de la décharge et plus marginalement depuis sa cessation d'activité (Zmirou *et al.*, 2003).

L'objectif que la France s'est fixée est de :

- recenser l'ensemble des sites qui sont potentiellement pollués (BASOL : Base de données sur les sites et sols pollués)
- sélectionner ceux qui sont à étudier en priorité
- organiser leur réhabilitation, en concertation avec les industriels concernés et dans le respect des principes suivants : réhabilitation en fonction de l'impact effectif

provoqué par le site, réhabilitation suivant l'usage actuel ou futur prévu pour le site, réhabilitation à un coût économiquement acceptable

La réhabilitation d'un ancien site industriel passe nécessairement par les trois étapes suivantes :

- l'étude du sol qui a pour objectif de connaître l'état de pollution du sous-sol et le contexte environnemental du site.
- l'évaluation des risques qui a pour objectif d'évaluer l'impact réel des polluants, à court et à long terme, sur l'homme et sur l'environnement. Les différentes étapes de l'évaluation des risques seront détaillées dans la section suivante.
- Le traitement du site en lui-même, si nécessaire, qui est fonction des résultats de l'évaluation des risques et du devenir du site. La réhabilitation d'un site comprend classiquement la vidange des ouvrages de stockage, l'élimination ou le confinement des polluants ayant un impact sur la santé humaine et l'environnement et la surveillance du site.

La réhabilitation d'un site peut impliquer des solutions de natures différentes :

- simple surveillance du site (si aucun risque n'a été constaté),
- limitation des usages de certaines zones du site,
- réduction de la mobilité des polluants par un confinement ou par l'envoi en décharges,
- élimination des polluants par traitements.

C'est une combinaison de différentes solutions qui est envisagée en tenant compte des coûts et de l'efficacité globale des traitements du point de vue environnemental. Les traitements peuvent être réalisés hors sites (centres collectifs, décharges), sur sites (thermique, biologique, lavage, confinement), ou *in situ* (venting, stripping).

**Le traitement thermique** des sols contaminés peut se faire, soit dans un centre collectif de déchets, soit sur site. Le processus résulte d'un ensemble de réactions physico-chimiques d'oxydoréduction à des températures plus ou moins élevées. Les traitements thermiques sont particulièrement efficaces pour dépolluer les sols contaminés en HAP. L'incinération du sol pollué à une température supérieure à 1000°C est rapide, permet l'élimination des composés volatils mais est relativement coûteux. La désorption thermique des sols contaminés est une



alternative intéressante. Ce procédé consiste à chauffer indirectement le sol à des températures de l'ordre de 400-500°C. Le niveau de température est suffisamment faible pour éviter les phénomènes de vitrification qui ont lieu à des températures plus élevées.

**Le lavage** des sols contaminés consiste en une mobilisation des polluants soit par solubilisation à l'eau, aux solvants ou avec des acides-bases, soit par la formation d'une émulsion avec des tensio-actifs (ou surfactants), soit par transformation chimique avec des oxydants ou des réducteurs, par action directe dans le sol. Les effluents contaminés sont ensuite récupérés puis traités. Cette technique peut être utilisée pour une large gamme de contaminants en raison d'un large éventail d'agents chimiques potentiellement utilisables pour provoquer ou accélérer la mobilité des contaminants. Cependant, cette technique implique une remobilisation, voire une transformation des contaminants pour pouvoir les extraire avec la phase liquide. Il faut donc garantir la récupération de l'intégralité des percolats de la phase liquide contaminée (ADEME, techniques de traitement des sols pollués, <http://www2.ademe.fr/servlet/KBaseShow?sort=-1&cid=96&m=3&catid=10157>).

**Le traitement biologique** des sols contaminés, qui repose sur le pouvoir d'autoépuration naturel des micro-organismes (champignons, bactéries), suscite actuellement un grand intérêt. L'étape ultime est l'élimination complète (minéralisation) des polluants. Pour optimiser le processus naturel de biodégradation, il est indispensable de connaître les différents facteurs influençant son bon déroulement. Ces facteurs, comme nous l'avons vu précédemment, peuvent être liés à la nature du sol à savoir la composition granulométrique, aux caractéristiques physico-chimiques de la phase minérale et organique du sol, aux caractéristiques géotechniques (porosité, densité) et biologiques (richesse et diversité microbienne). Le pH, les teneurs en nutriments, en oxygène, la température du sol jouent un rôle important dans la biodégradation des polluants organiques des sols. La nature des polluants, leur concentration, leur distribution dans le sol (en solution, adsorbés aux particules, à la matière organique du sol), et leur caractéristique physico-chimique influencent également les capacités de biodégradation des micro-organismes du sol.

Le traitement biologique des sols peut être réalisé dans des bioréacteurs qui présentent l'avantage de pouvoir contrôler les paramètres de culture (pH, température, nutriments), l'oxygénation, le contact entre les polluants et les microorganismes... Le traitement biologique peut se faire *in situ* sans que le sol contaminé soit excavé. La flore microbienne adaptée à la biodégradation des HAP peut être stimulée sur le site même grâce à l'injection

d'oxygène et de nutriments. Le traitement biologique peut se faire enfin sur site. Le sol excavé est disposé en couches plus ou moins épaisses sur un parterre étanche. Deux types de traitements sont fréquemment utilisés : le traitement en terre dynamique (landfarming) ou en terre statique (bioterre).

Les capacités des plantes, et des micro-organismes associés, pour immobiliser via l'accumulation ou la séquestration, pour extraire ou transformer par dégradation, volatilisation les polluants du sol font actuellement l'objet de nombreuses études. Ce sont des techniques intéressantes qui permettent de décontaminer des terres contaminées à la fois en HAP et en métaux lourds. Elles ont l'avantage d'être plus respectueuses de la qualité des sols que les traitements chimiques, thermiques. Elles pourraient de surcroît changer l'image des anciens sites industriels qui seraient revégétalisés. Si ces techniques permettent de traiter des surfaces contaminées importantes, elles sont cependant lentes et incomplètes (Costes & Druelle, 1997 ; Norini, 2007).

### **II.3. Evaluation des risques des sols contaminés**

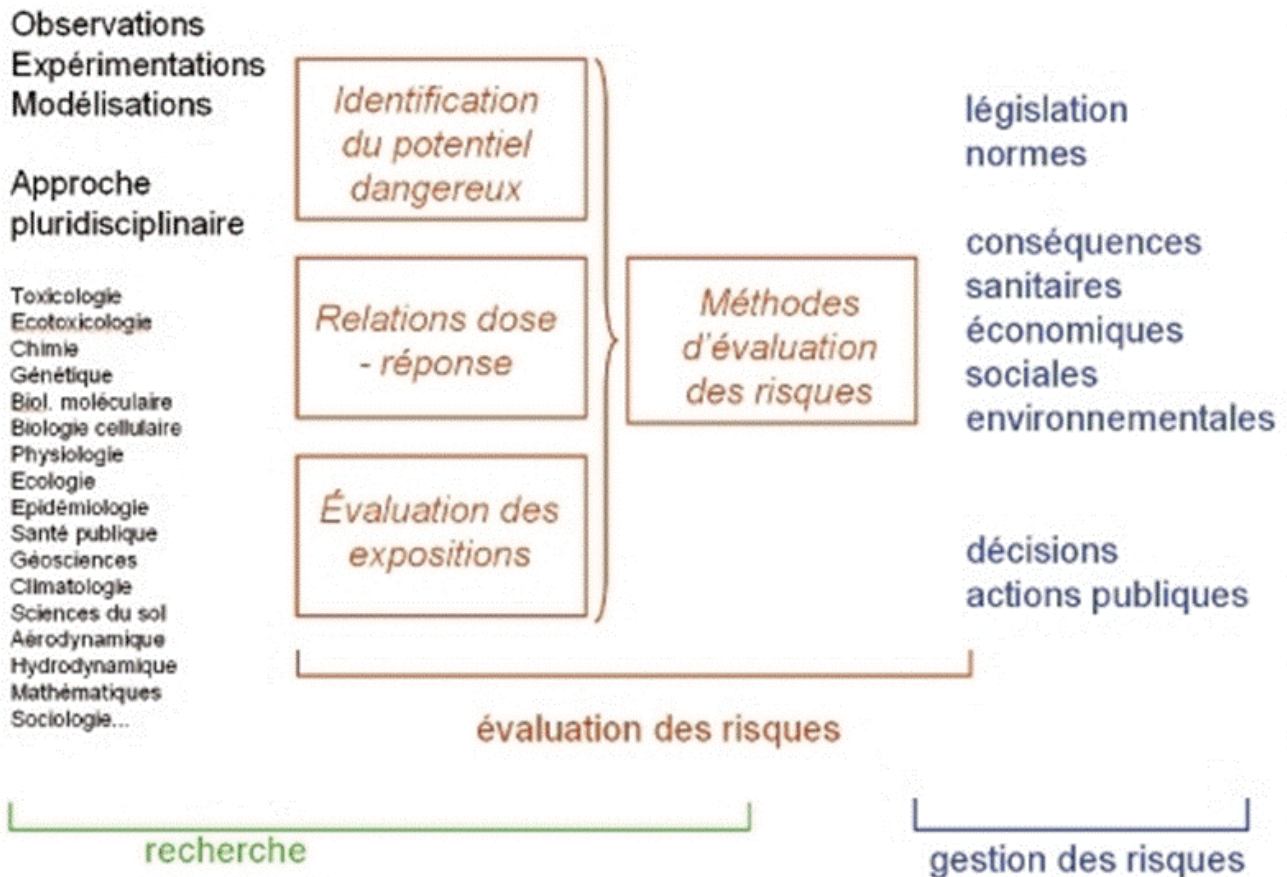
L'évaluation des risques est une phase essentielle dans la réhabilitation des sites. Elle permet à l'ensemble des acteurs, impliqués dans la réhabilitation, de prendre les décisions quant au devenir et aux éventuelles mesures préventives et curatives à appliquer.

#### **II.3.1. Notions de danger, d'exposition, de risque**

L'évaluation des risques qui fait autorité au niveau mondial a été définie en premier lieu par l'académie des Etats-Unis (NRC, 1983). Elle décompose le processus d'évaluation en 4 étapes (figure 2, page 18):

- **Identification des dangers**
- **Relation dose (concentration) – effet (réponse)**
- **Evaluation de l'exposition**
- **Caractérisation des risques**

C'est une approche générale appliquée à l'évaluation des risques de substances chimiques, de déchets ou de matrices contaminées pour la santé humaine et pour l'environnement (Jauzein *et al.*, 1999; ADEME, 2002).



**Figure 2 :** Les différentes étapes dans la démarche d'évaluation des risques  
(source internet : <http://chrono-environnement.univ-fcomte.fr/IMG/jpg/Fig41.jpg>).

**L'identification des dangers** correspond à l'identification des effets indésirables ou adverses qu'un échantillon est intrinsèquement capable de provoquer. La première étape consiste à mettre en évidence la nature des effets toxiques susceptibles de se produire en cas d'exposition d'un organisme vivant, et de les analyser. La deuxième étape est la quantification des effets en fonction des conditions d'exposition : niveaux, voies, durées et modalités (continues, discontinues) d'exposition. Pour une espèce donnée, différents types de dangers ou d'effets peuvent être recensés, selon les fonctions ou les systèmes biologiques altérés : viabilité, reproduction, croissance, immunotoxicité, effets génomiques, endocriniens. L'identification des dangers nécessite d'identifier les valeurs environnementales actuelles de protection et de sélectionner les voies par lesquelles ces valeurs peuvent être mesurées et évaluées (US-EPA, 1996).

**L'évaluation des relations dose (concentration) / effet (réponse)** consiste à estimer la relation entre la dose, ou le niveau d'exposition à des polluants, et l'incidence ou la gravité d'un effet.

**L'évaluation de l'exposition** au plan environnemental implique de connaître les sources d'émission des polluants et de les quantifier, de connaître leur distribution entre les différents compartiments de l'environnement, et de déterminer les produits de dégradation et de transformation. Ces éléments sont indispensables pour évaluer les concentrations ou doses auxquelles les populations humaines ou les autres composantes de l'environnement sont exposés ou susceptibles de l'être. L'exposition est fonction de la biodisponibilité des polluants au niveau des sols. Il s'agit donc d'un paramètre important à prendre en considération. La biodisponibilité des polluants des sols sera discutée dans la section suivante.

**La caractérisation du risque** consiste à intégrer les trois étapes précédentes afin d'estimer et de décrire la probabilité d'apparition d'effets indésirables en raison de l'exposition réelle ou prévisible à des polluants. L'évaluation des risques sert donc à faire en sorte, ou à vérifier, que l'exposition des populations à un échantillon (sol) potentiellement toxique soit sans conséquence néfaste à long terme, c'est-à-dire que les niveaux d'exposition restent en dessous des concentrations susceptibles d'entraîner une toxicité.

Lorsqu'il s'agit d'une situation de pollution historique et avérée, dans le cas des sols de friches industrielles par exemple, l'évaluation du risque repose sur une **démarche rétrospective**. Celle-ci, menée à *posteriori*, concerne les pollutions existantes dont on veut connaître les risques pour l'environnement. L'évaluation rétrospective des risques écologiques liés aux polluants du sol met généralement en œuvre les outils suivants :

**Des caractérisations analytiques** permettant de mesurer les teneurs en substances polluantes dans la matrice ou des paramètres globaux qui donnent une information plus ou moins détaillée sur la présence de certains ou d'un ensemble de substances polluantes,

**Des essais de comportement** (ou du devenir) comme les tests de lixiviation ou de dégradabilité permettant d'évaluer le danger de transfert de pollution dans les eaux et/ou l'évolution possible de la matrice sous l'influence de facteurs physico-chimiques ou biologiques contrôlés. Récemment, un protocole de lixiviation en vue d'essais chimiques et écotoxicologiques ultérieurs des sols et matériaux du sol a été normalisé au niveau international (ISO 18772, 2008).

**Des essais biologiques** qui mesurent les effets potentiels ou la bioaccumulation des polluants sur des organismes cibles représentant à la fois le milieu aquatique (mesure sur lixiviats) et le milieu terrestre.

### **II.3.2. Approche physico-chimique de la pollution des sols**

L'analyse physicochimique de la pollution des sols demeure essentielle car elle permet de déterminer les principaux types de polluants et leur niveau de concentration. Cependant, elle suppose une connaissance préalable de l'historique des terrains étudiés (nature des activités ou des occupations passées) et que les polluants présents dans ces matrices aient tous été identifiés et soient en nombre relativement restreint, ce qui est rarement le cas (Fernández *et al.*, 2005). L'analyse physico-chimique n'est pas exhaustive, d'autant qu'elle inclut rarement les sous-produits de biodégradation ou de transformation des polluants, conduisant à une sous-estimation des risques (Fernández *et al.*, 2005). Elle est généralement effectuée après extraction complète des polluants présents dans les échantillons de sols (extraction par solvants organiques notamment) et ne reflète donc pas les quantités de polluants réellement (bio)disponibles dans les sols (Bispo *et al.*, 1999; Reid *et al.*, 2000; Bergknut, 2006). Ce point est d'autant plus important que la biodisponibilité des polluants dans les sols diminue avec le temps et que la toxicité des sols âgés (anciennement pollués) est atténuée, comparée à celle de sols récemment contaminés. Les analyses physico-chimiques ne permettent pas non plus d'identifier les effets d'interaction possibles entre les polluants qui peuvent conduire à des phénomènes de synergie ou d'antagonisme (Fernández *et al.*, 2005).

L'évaluation physico-chimique seule de la pollution des sols se révèle donc insuffisante. Or les contraintes réglementaires dans le domaine des sols pollués reposent principalement sur ces critères de qualité physico-chimique des milieux. Les valeurs guides qui sont utilisées comme référentiel dans la remédiation des sols contaminés prennent en compte uniquement les teneurs en polluants, parfois modulée en fonction de l'utilisation du site, mais très rarement la sensibilité de l'environnement ou la situation de la pollution. La pollution peut être localisée en surface et/ou en profondeur, confinée dans une couche d'argile ou dans un terrain très perméable. L'emploi de ces valeurs guides peut dans certains cas entraîner des traitements inutiles, coûteux, parfois nocifs du point de vue environnemental (mobilisation de pollutions piégées ou inertes) (Costes & Druelle, 1997). Ces valeurs guides ne devraient pas

être les seuls critères de décision de traitement de remédiation ou d'objectifs de décontamination. La diminution du risque réel des polluants du sol ainsi que la restauration des fonctions du sol, modulée en fonction de l'usage futur des sols, devrait être le but ultime des schémas de remédiation (Scullion, 2008).

Pour une évaluation détaillée du risque représenté par les polluants des sols, il est nécessaire de mesurer leurs effets biologiques, écotoxicologiques en complément des analyses physico-chimiques (ADEME, 2002 ; Jauzein *et al.*, 1999 ; Semple *et al.*, 2003).

### II.3.3. Approche biologique-écotoxicologique de la pollution des sols

La caractérisation en laboratoire du danger écotoxique des sols contaminés requiert deux approches complémentaires : l'étude écotoxicologique des **échantillons solides** d'une part et celle de **leurs extraits aqueux** d'autre part. Le tableau IV (page 22) présente les différents essais d'écotoxicité appliqués aux sols pollués, qui sont normalisés au niveau national et international. L'écotoxicité des sols est mesurée à la fois sur des organismes aquatiques et terrestres, de niveaux trophiques - producteur, consommateur, décomposeur- différents. La toxicité peut être étudiée à court ou à long terme et différents critères sont mesurés tels que des activités enzymatiques, des dommages génétiques, des paramètres physiologiques comme la croissance, la reproduction ou la survie des organismes exposés... .

Les sols contaminés ne constituent pas un réservoir statique de polluants. Ces derniers peuvent être transférés verticalement (percolation) ou horizontalement (lessivage superficiel ou circulation des nappes phréatiques) vers les eaux ou terres avoisinantes. L'intérêt des essais d'écotoxicologie aquatique réside dans l'estimation de la nature et de la quantité de polluants susceptibles d'être mobilisés dans la phase aqueuse et dans l'évaluation de la fonction de rétention des sols contaminés (Maxam *et al.*, 2000 ; Van Gestel *et al.*, 2001). Les essais sur organismes aquatiques sont relativement rapides et peu coûteux. Le panel actuellement disponible de tests de toxicité validés et normalisés est plus élevé dans le domaine aquatique que terrestre, notamment en ce qui concerne l'étude de la génotoxicité. Néanmoins, le risque écotoxique associé aux lixiviats et percolats ne peut être extrapolé à la matrice sol. Il apparaît alors nécessaire d'étudier en parallèle l'écotoxicité sur les organismes terrestres (Leitgib *et al.*, 2007).

**Tableau IV :** Liste des essais d'écotoxicité des sols et des fractions aqueuses (lixiviats/percolats) normalisés au niveau national et international.

	Niveau trophique	Critères d'effet	Organismes utilisés	Durée d'exposition	Normes
Tests d'écotoxicité sur la matrice sol	Producteur	germination-croissance	Plantes (mono et dicotylédones)	17 jours	ISO 11269-2 (2005)
		élongation racinaire	Orge ( <i>H. vulgare</i> )	5 jours	ISO 11269-1 (1993)
	Consommateur	mortalité-biomasse	Vers de terre ( <i>E. fetida</i> )	14 jours	ISO 11268-1 (1993)
			Collemboles ( <i>F. candida</i> )	28 jours	ISO 11267 (1999)
		croissance	Escargots ( <i>H. aspersa</i> )	28 jours	ISO 15952 (2006)
		reproduction	Vers de terre ( <i>E. fetida</i> )	28 et 56 jours	ISO 11268-2 (1998)
			Collemboles ( <i>F. candida</i> )	28 jours	ISO 11267 (1999)
			Enchytraeides ( <i>E. albidus</i> )	6 semaines	ISO 16387 (2004)
	Décomposeur	Activités enzymatiques	Bactéries	6 heures	ISO 11266 (1994) ISO 14328 (1997)
	Tests d'écotoxicité sur les lixiviats/percolats de sol	Producteur	croissance	Algues unicellulaires ( <i>P. subcapitata</i> )	72 heures
Lentilles d'eau ( <i>L. minor</i> )				96 heures	ISO 20079 (2005)
Génotoxicité - micronoyaux			Plantes ( <i>V. faba</i> )	min. 30 heures	AFNOR T90-327 (2004)
Consommateur		mortalité	Poissons ( <i>D. rerio</i> )	96 heures	ISO 7346 (1996)
			Daphnies ( <i>D. magna</i> )	24 et 48 heures	AFNOR NF EN ISO 6341 (1996)
		reproduction	Daphnies ( <i>C. dubia</i> )	7 jours	AFNOR NF T90-376 (2000)
			Daphnies ( <i>D. magna</i> )	21 jours	ISO 10706 (2000)
		croissance	Rotifères ( <i>B. calicyflorus</i> )	48 heures	ISO 20666 (2008)
		Génotoxicité - micronoyaux	Larves d'amphibiens ( <i>X. laevis</i> , <i>P. waltl</i> )	12 jours	ISO 21427-1 (2006)
Décomposeur		luminescence (Microtox)	Bactéries ( <i>V. fischeri</i> )	15 et 30 minutes	AFNOR NF EN ISO 11348-3 (1999)
		Génotoxicité - mutants Ames	Bactéries ( <i>S. typhimurium</i> )	72 h. à 5 jours	Environnement Canada (1993)
		Génotoxicité - mutants Umu	Bactéries ( <i>S. typhimurium</i> )	4 heures	ISO 13829 (2000)

La toxicité des polluants dans la matrice solide ne dépend pas seulement de leur nature et de leur concentration mais aussi, en grande partie, de leur biodisponibilité. La biodisponibilité des polluants est étroitement liée aux paramètres physico-chimiques des sols tels que le pH, la température, les teneurs et la composition en matière organique, la granulométrie, l'hygrométrie du sol. Ces facteurs influencent les phénomènes de solubilisation, de précipitation, d'adsorption, d'oxydo-réduction, d'hydrolyse ou de complexation des contaminants souvent présents à l'état de mélanges complexes. Les essais d'écotoxicité terrestre, réalisés directement sur la matrice solide, permettent de mieux rendre compte de la biodisponibilité des polluants au sein de l'échantillon. Le transfert des polluants vers le compartiment aquatique est lui aussi dépendant de ces multiples facteurs.

Du fait de la diversité de sensibilité des espèces aux polluants, il est intéressant d'utiliser une batterie de tests biologiques incluant au moins une espèce du règne animal, une espèce du règne végétal et des populations microbiennes, appartenant à des niveaux trophiques différents : producteur, consommateur primaire et décomposeur (ISO 15799, 2001). Ces essais permettent d'intégrer l'effet de nombreuses variables environnementales sous la forme d'une réponse toxicologique unique (Cook *et al.*, 2002).

#### **II.4. Importance et mesure de la biodisponibilité des polluants**

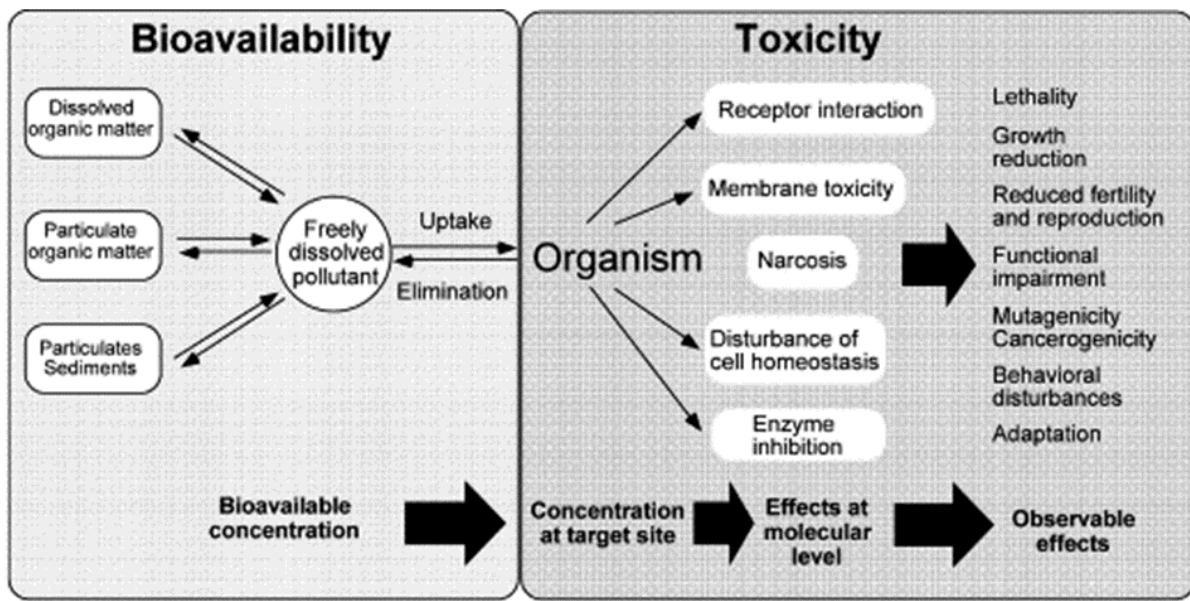
Les sols sont des matrices environnementales fortement hétérogènes avec des gradients de pH, de matière organique, de distribution granulométrique (% argile) des particules du sol... qui varient dans le temps et l'espace. Ces caractéristiques physico-chimiques du sol influencent le comportement et la biodisponibilité des polluants vis-à-vis des organismes du sol (Lanno *et al.*, 2004).

La signification de la biodisponibilité des polluants et des méthodes de mesure ou de calcul a fait l'objet d'études et de discussions au cours de ces dernières années (Bergknut *et al.*, 2007). Une définition large de la biodisponibilité des polluants pourrait être la capacité d'un polluant à pénétrer au sein d'un récepteur biologique qui est dépendante de la voie et du temps d'exposition ainsi que de la matrice contenant le polluant.

Alexander (2000) a démontré deux voies de séquestration possible des polluants dans les sols pour expliquer la diminution de leur biodisponibilité vis-à-vis des organismes: la liaison



des polluants avec la matière organique du sol et leur séquestration dans les micropores du sol. Avec le vieillissement, les constituants spécifiques du sol interagissent de manière dynamique avec les polluants du sol, les rendant ainsi non disponibles pour les récepteurs biologiques. Seule la fraction non séquestrée de la pollution est biodisponible et peut éventuellement interagir avec les organismes du sol (figure 3).



**Figure 3:** Biodisponibilité et toxicité des polluants des sols vis-à-vis des organismes (d'après Fent, 2003).

L'approche physico-chimique mesure les teneurs totales des polluants dans les sols et non la fraction biodisponible des polluants (Alexander, 2000). Seules les mesures sur les organismes peuvent déterminer si un polluant est réellement biodisponible. La mesure chimique seule sans corrélation avec une réponse biologique ne permet pas de mimer ces effets biologiques et d'estimer la biodisponibilité des polluants (Bergknut *et al.*, 2007).

Il peut être intéressant de déterminer la bioaccumulation des polluants du sol par les organismes car elle prend en compte à la fois les facteurs biotiques (métabolisme) et abiotiques (pH, matière organique du sol...) qui influencent la biodisponibilité des polluants. Les concentrations internes des polluants mesurées dépendent à la fois des mécanismes d'accumulation et d'excrétion. L'excrétion des polluants n'étant pas mesurée, la fraction des polluants biodisponibles peut-être beaucoup plus importante que celle révélée par la mesure

des concentrations. De plus, la mesure de la bioaccumulation ne renseigne pas sur la réponse des organismes face au stress de la pollution. Les organismes peuvent mettre en place des systèmes de défense qui leur permettent de tolérer le stress chimique engendré par les polluants bioaccumulés (Amiard-Triquet *et al.*, 2008). Il peut s'agir par exemple de l'induction de métallothionéines, protéines qui ont une forte affinité pour lier les polluants métalliques, de l'induction d'enzymes de biotransformation des polluants hydrophobes comme les HAP telles que les mono-oxygénases à cytochrome P450.

La mesure des réponses biologiques témoigne du degré d'impact des polluants du sol au niveau des populations exposées. Cette mesure ne prend en compte que la fraction de la pollution bioaccumulée par l'organisme qui atteint et interagit avec les sites d'action toxique. La mesure des réponses biologiques est donc un outil pertinent d'évaluation de la biodisponibilité des polluants. La réponse des organismes à la pollution des sols peut être mesurée à l'aide de biomarqueurs tels que l'inhibition, l'induction d'enzymes telles que celles citées ci-dessus, l'induction de dommages moléculaires, cellulaires... . Ces altérations précoces peuvent engendrer des perturbations au niveau physiologique touchant la dynamique de croissance, de reproduction voire la survie des populations exposées (figure 3). Les résultats des essais d'écotoxicité présentés auparavant renseignent sur la réponse des individus à la pollution des sols. Ces dommages au niveau individuel peuvent avoir des conséquences écologiques, avec par exemple la modification voire la disparition des populations ou des communautés.

Bien que prometteuses, il est nécessaire aujourd'hui de mieux comprendre le lien entre les réponses biologiques aux différents niveaux d'organisation et de relier ces réponses avec les mesures chimiques de la pollution des sols. C'est à ce titre que les réponses biologiques pourront être utilisées d'un point de vue réglementaire (Lanno *et al.*, 2004).

La biodisponibilité des polluants est un facteur clé à prendre en compte, qui dépend à la fois des caractéristiques physico-chimiques des polluants, des sols et des organismes étudiés. L'écotoxicité des polluants étant liée à leur biodisponibilité, nous avons différencié dans la section suivante les données d'écotoxicité des polluants (HAP et métaux lourds) mesurées à partir de sols dopés de celles mesurées à partir de sols contaminés.

## II.5. Ecotoxicité des sols contaminés

La contamination métallique des sols a fait l'objet du plus grand nombre d'études, compte tenu des méthodes d'analyse performantes disponibles à l'heure actuelle. La pollution organique des sols est en effet plus difficile à appréhender, du fait de sa complexité aggravée par la présence de produits de (bio)dégradation.

### II.5.1. Sols dopés en métaux lourds

#### Études chez les invertébrés terrestres

La toxicité des métaux lourds a été largement étudiée chez les invertébrés terrestres tels que les vers de terre (*E. fetida*), les collemboles (*F. candida*, *F. fimetaria*) ou les enchytrées (*E. albidus*, *E. crypticus*). Ces études sont réalisées en grande partie à court-terme, avec l'emploi de substrats artificiels ou naturels artificiellement dopés en métaux, un seul élément métallique en général.

- Survie des vers de terre

La survie des vers de terre *E. fetida* est un des principaux critères étudiés et fait l'objet d'une norme au niveau international (ISO 11268-1, 1993 ; OECD, 1984). Le paramètre mesuré est la concentration de polluant dans le milieu (sol) qui entraîne une inhibition de 50% de la survie des populations exposées, après 14 jours d'exposition en général (CL<sub>50</sub>). De nombreuses études ont révélé le caractère létal des métaux chez les vers de terre adultes exposés à des sols artificiels ou naturels dopés, comme pour le:

- Cadmium (Cd) : CL<sub>50</sub> = 300-642 mg/kg (Conder & Lanno, 2003; Spurgeon *et al.*, 1994)
- Chrome trivalent (CrIII) : CL<sub>50</sub> = 1635-1902 mg/kg (Sivakumar & Subbhuraam, 2005)
- Chrome hexavalent (CrVI) : CL<sub>50</sub> = 219-257 mg/kg (Sivakumar & Subbhuraam, 2005)
- Cuivre (Cu) : CL<sub>50</sub> = 249-683 mg/kg (Lukkari *et al.*, 2005 ; Maboeta *et al.*, 2004 ; Spurgeon *et al.*, 1994)
- Plomb (Pb) : CL<sub>50</sub> = 3760-5392 mg/kg (Davies *et al.*, 2003 ; Spurgeon *et al.*, 1994 ; Spurgeon & Hopkin, 1995)

- Zinc (Zn) :  $CL_{50} = 745-1131$  mg/kg (Ma *et al.*, 2002 ; Panda *et al.*, 1999 ; Spurgeon *et al.*, 1994, 1997).

Parallèlement aux effets sur la survie, il est également intéressant d'étudier l'inhibition de la biomasse des vers de terre, qui est un paramètre sublétalement plus sensible que la survie (Maboeta *et al.*, 2004). De la même façon est déterminée la concentration en polluant dans le milieu (sol) responsable de l'inhibition de 50% de la biomasse des vers de terre adultes exposés ( $CE_{50}$ ). Une inhibition de la biomasse des vers adultes a été observée à des concentrations comprises entre 118 et 325 mg/kg pour le cuivre (Arnold *et al.*, 2003), 1242 et 2249 mg/kg pour le plomb (Davies *et al.*, 2003 ; Spurgeon & Hopkin, 1995) par exemple, qui sont inférieures à celles touchant la survie des vers de terre (comme indiquées ci-dessus).

Plusieurs auteurs ont préconisé d'étudier les effets de la contamination des sols sur la survie des vers juvéniles, ceux-ci étant reconnus comme plus sensibles que leurs homologues adultes (Eom *et al.*, 2007 ; Spurgeon & Hopkin, 1996). D'autres auteurs estiment aussi plus intéressant d'étudier la survie chez une espèce de ver de terre autre que *E. fetida*, celle-ci étant moins sensible à la contamination des sols que *A. caliginosa*, *L. rubellus* ou *L. terrestris* par exemple (Langdon *et al.*, 2005 ; Spurgeon *et al.*, 2000). Le choix du ver de compost *E. fetida* dans les essais normalisés d'écotoxicité des sols s'explique par sa facilité d'élevage et son cycle de vie court, en comparaison des autres espèces. Sa capacité à dégrader la matière organique est mise à profit pour le compostage. D'autres paramètres peuvent donc être facilement mesurés chez ce ver, comme la reproduction.

- Reproduction des vers de terre, collemboles et enchytrées

La reproduction du ver de terre *E. fetida* fait également l'objet d'une norme au niveau international (ISO 11268-2, 1998 ; OECD, 2004a). Cet essai d'écotoxicité consiste à mesurer les effets de la contamination des sols ( $CE_{50}$ ) sur la production de cocons et de juvéniles après 28 et 56 jours d'exposition, respectivement. Cet essai de reproduction a l'avantage d'être plus sensible que l'essai de survie, la reproduction des vers étant impactée à des concentrations sub-létales. De la même façon, il peut être intéressant d'étudier l'inhibition de la croissance et de la maturation sexuelle des vers de terre, comme l'ont montré différents auteurs après l'exposition des vers *E. fetida* ou *L. rubellus* à des sols dopés en cuivre (Helling *et al.*, 2000, Spurgeon *et al.*, 2004).

La réponse et la sensibilité des vers de terre à la contamination des sols doit être comparée à celles d'autres invertébrés terrestres, tels que les collemboles ou les enchytrées. La reproduction de ces organismes a également fait l'objet d'une normalisation au niveau international (ISO 11267, 1999 ; ISO 16387, 2004 ; OECD, 2004b ; OECD, 2009).

De nombreuses études ont montré une inhibition de la reproduction après exposition de ces organismes à des sols, artificiels ou naturels, dopés en métaux (Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn...). Une partie de ces études a été résumée dans le tableau V (pages 29 & 30). Des différences de toxicité parfois importantes peuvent être observées en fonction de l'espèce considérée (*E. fetida*, *E. andrei*, *L. terrestris*, *L. rubellus*... pour les vers de terre, *F. candida*, *F. fimetaria* pour les collemboles), du temps d'exposition, de l'anion associé au cation métallique (nitrate, sulfate, carbonate), de la nature et des propriétés physico-chimiques du sol testé (sol artificiel ISO, OCDE, fumier, sol naturel, pH, % MO). Lock & Janssen (2002a, 2002b) ont montré par exemple une plus grande sensibilité (reproduction) des invertébrés terrestres à un sol artificiel (ISO) dopé en nickel dans l'ordre suivant : *E. albidus* > *E. fetida* > *F. candida*, dopé au chrome trivalent dans l'ordre suivant : *F. candida* > *E. albidus* > *E. fetida*.

**Tableau V:** Etudes sur l'inhibition de la reproduction (cocons, juvéniles), de la croissance et de la maturation sexuelle d'invertébrés terrestres exposés à des sols (artificiels ou naturels) dopés en métaux lourds.

Sol	Métaux lourds	Espèce	Temps d'exposition	Paramètre	Concentrations (mg/kg)	Références
<b>Sol artificiel dopé</b>						
OCDE	Cd	<i>E. andrei</i>	3 sem	cocons juvéniles	LOEC = 10 LOEC = 18	Van Gestel et al. [1992]
		<i>E. fetida</i>	56 j	cocons	CE <sub>50</sub> = 46	Spurgeon et al. [1994]
OCDE		<i>F. candida</i>	28 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 480-780	Sandifer & Hopkin [1996, 1997]
OCDE		<i>F. candida</i>	28 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 351	Greenslade & Vaughan [2003]
ISO		<i>F. candida</i>	35 / 49 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 114 / 105	Crouau & Cazes [2003]
ISO		<i>F. candida</i>	35 j	juvéniles	CE <sub>50/20</sub> = 113 / 56	Crouau & Moia [2006]
ISO		<i>F. candida</i>	33 - 34 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 129	Crouau et al. [1999]
ISO	CrIII	<i>E. andrei</i>	3 sem	cocons juvéniles	LOEC = 1000 LOEC = 100	Van Gestel et al. [1992]
ISO		<i>E. fetida</i>	21 j	cocons	CE <sub>50</sub> = 892	Lock & Janssen [2002a]
		<i>E. albidus</i>	6 sem	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 637	
		<i>F. candida</i>	28 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 604	
OCDE	Cu	<i>E. andrei</i>	28 et 56 j	coc. & juv.	LOEC = 320	Kula & Larink [1997]
OCDE		<i>E. fetida</i>	56 j	cocons	CE <sub>50</sub> = 53	Spurgeon et al. [1994]
OCDE		<i>F. candida</i>	28 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 640-1480	Sandifer & Hopkin [1996, 1997]
OCDE		<i>F. candida</i>	28 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 751	Greenslade & Vaughan [2003]
Fumier		<i>E. fetida</i>	56 j	croissance maturation sex. cocons juvéniles	LOEC = 8,92 LOEC = 39,47 LOEC = 8,92 LOEC = 15,92	Helling et al. [2000]
ISO	Ni	<i>E. fetida</i>	21 j	cocons	CE <sub>50</sub> = 362 mg/kg	Lock & Janssen [2002b]
		<i>E. albidus</i>	6 sem	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 275	
		<i>F. candida</i>	28 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 476	
Fumier	Pb	<i>E. eugeniae</i>	34, 48, 62 j	croissance	Inhibition [Pb max] = 2000	Maboeta et al. [1999]
Fumier		<i>E. fetida</i>	36 mois	coc. & juv.	Inhibition [Pbmax] = 1323	Reinecke et al. [2001]
OCDE		<i>E. fetida</i>	56 j	cocons	CE <sub>50</sub> = 1940	Spurgeon et al. [1994]
OCDE		<i>F. candida</i>	28 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 1360-3160	Sandifer & Hopkin [1996, 1997]
OCDE		<i>F. candida</i>	28 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 2560	Greenslade & Vaughan [2003]
Fumier	Zn	<i>E. fetida</i>	36 mois	coc. & juv.	Inhibition [Zn max] = 1087	Reinecke et al. [2001]
OCDE		<i>E. fetida</i>	56 j	cocons	CE <sub>50</sub> = 276	Spurgeon et al. [1994]
OCDE		<i>F. candida</i>	28 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 590-900	Sandifer & Hopkin [1996, 1997]
OCDE		<i>F. candida</i>	28 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 865	Greenslade & Vaughan [2003]
OCDE		<i>F. candida</i>	2, 4, 6 sem 4, 6 sem	croissance juvéniles	CE <sub>50</sub> = 1220-1661 CE <sub>50</sub> = 626-683	Van Gestel & Hensbergen [1997]

## Suite Tableau V

Sol	Métaux lourds	Espèce	Temps d'exposition	Paramètre	Concentrations (mg/kg)	Références
<b>Sol naturel dopé</b>						
Limon-argileux	Cd	<i>L. rubellus</i>	de 0 à 294 j	maturation sex.	LOEC = 800	Spurgeon et al. [2004]
Marne sableuse		<i>L. rubellus</i>		juvéniles	CE <sub>50</sub> = 50	Ma et al. [1984]
Sol de forêt (MO: 21,6%)		<i>A. caliginosa</i>	6 sem	croissance	CE <sub>50</sub> = 22,5	Khalil et al. [1996]
Limon-argileux	Cu	<i>L. rubellus</i>	de 0 à 294 j	maturation sex.	LOEC = 640	Spurgeon et al. [2004]
				croissance	LOEC = 160	
Sableux		<i>L. rubellus</i>	6 sem	cocons	LOEC = 131	Ma et al. [1984]
Sol de forêt (MO: 21,6%)		<i>A. caliginosa</i>	6 sem	croissance	CE <sub>50</sub> = 51,5	Khalil et al. [1996]
LUFA 2,2		<i>E. andrei</i>	29 et 56 j	coc. & juv.	LOEC = 10 & 3,2	Kula & Larink [1997]
Argile (13%), MO (4,5%)	<i>F. fimetaria</i>	21 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 1400	Bruus Pedersen & Van Gestel [2001]	
LUFA	Ni	<i>F. fimetaria</i>	21 j	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 450	Scott-Fordsmann et al. [1999]
Limoneux	Pb	<i>E. fetida</i>	28 j	cocons	CE <sub>50</sub> = 993, NOEC = 625	Davies et al. [2003]
Marne sableuse	Zn	<i>D. willsi</i>	120 j	coc. & juv.	LOEC = 200	Panda et al. [1999]
Marne sableuse		<i>A. caliginosa</i>	42 j	cocons	CE50 = 442	Spurgeon et al. [2000]
		<i>L. rubellus</i>		cocons	CE50 = 599	
		<i>L. terrestris</i>		cocons	CE50 = 1029	
		<i>E. fetida</i>		cocons	CE50 = 1898	
Sol de forêt (MO : 21,6%)		<i>A. caliginosa</i>	6 sem	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 155	Khalil et al. [1996]
BUFA	<i>F. candida</i>	4 / 6 sem	juvéniles	CE <sub>50</sub> = 185 / 210	Smit & Van Gestel [1997]	
LUFA			juvéniles	CE <sub>50</sub> = 348 / 363		

Espèces d'invertébrés terrestresVers de terre du genre *Eisenia* - *E. fetida*, *E. andrei*, *E. eugeniae*Vers de terre du genre *Lumbricus* - *L. rubellus*, *L. terrestris*Vers de terre du genre *Aporrectodea* - *A. caliginosa*Vers de terre du genre *Drawida* - *D. willsi*Collemboles du genre *Folsomia* - *F. candida*, *F. fimetaria*Enchytrées du genre *Enchytraeus* - *E. albidus*

MO : Matière Organique

BUFA, LUFA(2.2) : Sols naturels Standards

### Etudes chez les plantes supérieures

Pour l'évaluation des risques des sols contaminés en métaux lourds (ou en polluants organiques) vis-à-vis des organismes photosynthétiques, les différents instituts de normalisation (ISO 11269-2, 2005; OECD, 2006) préconisent d'étudier la toxicité chez les plantes supérieures terrestres, en plus des invertébrés. Les plantes modèles généralement étudiées sont l'avoine *A. sativa*, le blé *T. aestivum*, le chou *B. chinensis*, la laitue *L. sativa*, le maïs *Z. mays*, l'oignon *A. cepa*, l'orge *H. vulgare*, le ray-grass *L. perenne*, le soja *G. max*, la tomate *L. esculentum*... ou bien alors des plantes d'importance économique ou écologique vis-à-vis du site impacté. Les principaux paramètres mesurés chez les plantes sont la germination, la croissance, l'élongation racinaire ou foliaire.

Plusieurs études ont montré la phytotoxicité des métaux lourds en sols dopés. De manière générale, la germination des plantes est un paramètre moins sensible que la croissance (An, 2004 ; López-Luna *et al.*, 2009). Ainsi An (2004) n'a mis en évidence aucune inhibition de la germination par le cadmium mais une inhibition de la croissance des feuilles ( $CE_{50} = 61-268$  mg Cd/kg) et des racines ( $CE_{50} = 39-208$  mg Cd/kg) de 4 espèces de plantes cultivées (le maïs, le blé, le concombre et le sorgho) après 5 jours d'exposition à un sol de type marne sableuse. Les valeurs de  $CE_{50}$  correspondent à celles de la plante la plus sensible : le sorgho commun *S. bicolor* et la moins sensible : le maïs *Z. mays*. López-Luna *et al.* (2009) ont également observé une plus grande sensibilité du sorgho *S. sudanense*, en comparaison à l'avoine et au blé, à une exposition de 7 jours à un sol naturel dopé en chrome trivalent ou hexavalent sur la croissance racinaire ou foliaire. Comme pour les vers de terre (Sivakumar & Subbhuraam, 2005), le chrome sous sa forme hexavalente est apparu plus toxique pour les plantes (inhibition de la croissance racinaire et foliaire,  $CE_{50} = 126-316$  mg/kg &  $274-408$  mg CrVI/kg respectivement) que sa forme trivalente (inhibition de la croissance racinaire et foliaire,  $CE_{50} = 1089-2216$  &  $2546-3643$  mg CrIII/kg, respectivement). Ces auteurs ont également observé une plus grande inhibition de la croissance des racines (plus sensible) en comparaison de celle des feuilles. Ait Ali *et al.* (2004) ont montré par exemple une inhibition de la croissance racinaire chez l'orge *H. vulgare* après 14 jours d'exposition à un sol artificiel dopé en cuivre ( $CE_{50} = 13.7$  mg/kg) mais aucune inhibition de la germination ou de la croissance des feuilles ( $CE_{50} > 305$  mg/kg).



## II.5.2. Sols contaminés en métaux lourds

L'écotoxicité de sols « de terrain » multi-contaminés en métaux lourds a également été étudiée, notamment chez les vers de terre (Feisthauer *et al.*, 2006 ; Nahmani *et al.*, 2007 ; Spurgeon & Hopkin, 1996). Nahmani *et al.* (2007) ont étudié l'inhibition de la survie, de la biomasse, de la production et de l'éclosion des cocons chez le ver de terre *E. fetida* après 42 jours d'exposition à 8 sols de sites métallifères (7 de mines désaffectées, 1 de fonderie plomb/zinc). Ces sols multi-contaminés en métaux ont des concentrations variant de 2.38-347 mg/kg pour le cadmium, de 22.9-161 mg/kg pour le cuivre, de 348-42700 mg/kg pour le plomb et de 321-33400 mg/kg pour le zinc notamment. Ces auteurs ont montré que les propriétés des sols étaient en partie responsables des effets toxiques constatés. Les métaux, comme la plupart des micropolluants organiques et inorganiques, sont plus toxiques dans les sols à tendance sableuse (*sand*) en comparaison de ceux à tendance limoneuse (*silt*) ou argileuse (*clay*). La biomasse des vers de terre adultes a été affectée sur l'ensemble des sols étudiés (n = 7) avec des valeurs de CE<sub>50</sub> de 161 ± 10 mg Cd/kg, de 6670 ± 162 mg Pb/kg et de 17600 ± 1630 mg Zn/kg. Ces valeurs sont supérieures à celles obtenues en condition dopée, notamment pour le plomb (Davies *et al.*, 2003 ; Spurgeon & Hopkin, 1995), indiquant que la biodisponibilité et la toxicité des métaux dans les sols contaminés est diminuée en comparaison des sols dopés. Ces auteurs ont également observés une inhibition de la production et de l'éclosion des cocons.

Spurgeon & Hopkin (1996) ont étudié les effets sur la survie, la croissance, la maturation sexuelle et la production de cocons chez des vers juvéniles, *E. fetida*, exposés durant 20 semaines à 7 sols contaminés en métaux lourds, plus ou moins proches d'une fonderie de plomb/zinc (la même que celle dans l'étude de Nahmani *et al.*, 2007). Les sols présentaient des propriétés physico-chimiques proches, avec des concentrations en métaux qui variaient en fonction de la distance à la source d'exposition entre 0.9-312.2 mg Cd/kg, 36-2610 mg Cu/kg, 245-16000 mg Pb/kg et 657-32900 mg Zn/kg notamment. Les concentrations en métaux dans ces sols, surtout celles en zinc, se sont révélées létales pour les vers de terre juvéniles. Un retard dans la croissance et la maturité sexuelle ainsi qu'une inhibition de la production de cocons ont été observés.

L'écotoxicité des sols contaminés en métaux lourds a également fait l'objet d'études chez les autres organismes terrestres. Leitgib *et al.* (2007) ont par exemple montré l'écotoxicité d'un sol provenant d'un ancien site minier contaminé notamment en Cd (8 mg/kg), en Cu (336 mg/kg), en Pb (1497 mg/kg) et en Zn (1035 mg/kg). La contamination a affecté

l'élongation racinaire et foliaire ( $DE_{50} = 4.3$  &  $4.6$  g de sol contaminé dans le milieu d'essai) de la moutarde *Sinapsis alba* après 3 jours d'exposition et dans une moindre mesure la survie des collemboles *Folsomia candida* après 14 jours d'exposition ( $DL_{50} = 13.8$  g de sol contaminé dans le milieu d'essai). Schultz *et al.* (2004) ont montré une plus grande sensibilité des enchytrées *Enchytraeus sp.* (survie et reproduction) à l'écotoxicité de deux sols provenant d'anciens sites de traitement de bois contaminés en métaux lourds (768 et 23330 mg Cu/kg ; 682 et 2140 mg Cr/kg ; 79 et 966 mg Zn/kg) en comparaison aux collemboles *F. candida* (survie et reproduction) et à la laitue (germination).

### II.5.3. Sols dopés en HAP

#### Etudes chez les invertébrés terrestres

La toxicité des HAP en condition dopée a fait l'objet d'études sur la survie et la reproduction des invertébrés terrestres (vers de terre, collemboles) dont certaines sont résumées dans le tableau VI (page 34). Une inhibition de la biomasse ainsi que de la reproduction a été observée chez le ver de terre *E. fetida* et le collembole *F. candida* après exposition à un sol artificiel dopé en phénanthrène (Crouau *et al.*, 1999 ; Shin & Kim, 2001 ; Zheng *et al.*, 2008). La toxicité des HAP a également été étudiée dans des sols naturels dopés. Sverdrup *et al.* (2001, 2002a, 2002b) ont comparé la réponse des vers de terre *E. veneta*, des collemboles *F. fimetaria* et des enchytrées *E. crypticus* exposés à 4 HAP notamment : le fluorène, le phénanthrène, le fluoranthène et le pyrène. Ils ont montré que les collemboles étaient les invertébrés les plus sensibles aux HAP par rapport aux vers de terre, que ce soit pour des paramètres létaux (survie :  $CL_{50}$  entre 1.8 et 5.1 fois plus sensible chez les collemboles que chez les vers de terre) ou sub-létaux (croissance et reproduction :  $CE_{10}$  entre 1.1 et 4.4 fois plus sensible chez les collemboles que chez les vers de terre). La survie des enchytrées n'a pas été affectée à des concentrations supérieures à 1800 mg/kg alors que la reproduction ( $CE_{50}$ ) a été inhibée à des concentrations de HAP comprises entre 21 et 80 mg/kg. La toxicité des HAP de poids moléculaire plus élevé a également été étudiée en sols dopés chez les vers de terre. Différents auteurs ont étudié l'écotoxicité de sols dopés en hydrocarbures par du pétrole brut (*crude oil*) de densité plus ou moins élevée. Les teneurs en hydrocarbures totaux variaient de 4200 à 26600 mg/kg. La survie des vers de terre après 14 jours d'exposition aux sols contaminés est apparue plus sensible que la germination ou même

**Tableau VI:** Etudes sur l'inhibition de la survie, de la biomasse, de la croissance et de la reproduction d'invertébrés terrestres exposés à des sols dopés en HAP: vers de terre du genre *Eisenia* (*E. fetida*, *E. veneta*) et du genre *Lumbricus* (*L. rubellus*) - collemboles du genre *Folsomia* (*F. candida*, *F. fimetaria*).

Sol	Paramètres	Espèce	Temps d'exposition	Paramètres (mg/kg)	Références
<b>Sol artificiel dopé</b>					
OCDE	Phénanthrène	<i>E. fetida</i>	7 j 10 sem	Inhibition biomasse Inhibition production juvéniles (47%)	Shin & Kim [2001]
ISO	Phénanthrène	<i>E. fetida</i>	4 sem	Inhibition biomasse	Zheng <i>et al.</i> [2008]
ISO	Phénanthrène	<i>F. candida</i>	33 j	CE <sub>50</sub> = 175	Crouau <i>et al.</i> [1999]
<b>Sol naturel dopé</b>					
Limoneux	Pyrène	<i>L. rubellus</i>	42 j	CL <sub>50</sub> = 283 CE <sub>50</sub> cocons = 90,3	Brown <i>et al.</i> [2004]
Marne-sableuse	Fluorène	<i>E. veneta</i>	28 j	CL <sub>50</sub> = 69 ; CE <sub>10</sub> = 31 (croissance)	Sverdrup <i>et al.</i> [2002b]
	Phénanthrène			CL <sub>50</sub> = 134 ; CE <sub>10</sub> = 25	
	Fluoranthène			CL <sub>50</sub> = 416 ; CE <sub>10</sub> = 113	
	Pyrène			CL <sub>50</sub> = 155 ; CE <sub>10</sub> = 38	
Marne-sableuse	Fluorène	<i>F. fimetaria</i>	21 j	CL <sub>50</sub> Flu = 39 ; CE <sub>10</sub> = 7,7 (reproduction)	Sverdrup <i>et al.</i> [2001, 2002a]
	Phénanthrène			CL <sub>50</sub> Phe = 41 ; CE <sub>10</sub> = 23	
	Fluoranthène			CL <sub>50</sub> Flt = 81 ; CE <sub>10</sub> = 37	
	Pyrène			CL <sub>50</sub> Pyr = 53 ; CE <sub>10</sub> = 10	
Marne-sableuse	Fluorène	<i>F. candida</i>	21 j	CE <sub>50</sub> Flu = 71	Sorensen & Holmstrup [2005]
	Pyrène			CE <sub>50</sub> Pyr = 51	
Sableux	Pyrène	<i>F. fimetaria</i>	21 j	CE <sub>50</sub> = 23 ; CE <sub>10</sub> = 15	Jensen & Sverdrup [2002]
LUFA 2.2	Phénanthrène	<i>F. candida</i>	28 j	CL <sub>50</sub> = 38,5 ; CE <sub>50</sub> = 28	Leon Paumen <i>et al.</i> [2008]
LUFA 2,2	Naphtalène	<i>F. candida</i>	28 j	CL <sub>50</sub> = 52,5 ; CE <sub>50</sub> = 11,3	Droge <i>et al.</i> [2006]
	Phénanthrène			CL <sub>50</sub> = 65 ; CE <sub>50</sub> = 45,8	
	Pyrène			CL <sub>50</sub> = 150 ; CE <sub>50</sub> = 21	

LUFA 2.2 : Sol Naturel Standard

la croissance de plantes supérieures après 14 ou 21 jours (Dorn & Salanitro, 2000 ; Dorn *et al.*, 1998 ; Salanitro *et al.*, 1997). Ces auteurs ont par ailleurs montré un abaissement de l'écotoxicité des sols dopés vis-à-vis des organismes après un traitement de bioremédiation de 8 à 10 mois (stimulation de la biodégradation microbienne par l'ajout de fertilisants azotés et phosphorés).

#### Etudes chez les plantes supérieures

Différentes études ont montré la phytotoxicité des HAP en condition dopée (tableau VII, page 36). L'inhibition de la germination et de la croissance des plantes a été observée après exposition à des sols dopés par un ou plusieurs HAP (Baek *et al.*, 2004 ; Maila & Cloete, 2002 ; Maliszewska-Kordybach & Smreczak, 2003 ; Smith *et al.*, 2006 ; Sverdrup *et al.*, 2003), par du créosote ou de l'huile de moteurs, contaminés en hydrocarbures (Huang *et al.*, 2004 ; Banks & Schultz, 2005). L'ensemble de ces études a montré une différence de sensibilité entre les espèces testées, par exemple une meilleure sensibilité des légumineuses (trèfle blanc *T. repens*, trèfle violet ou des prés *T. pratense*) en comparaison aux graminées (ray-grass anglais *L. perenne*, fétuque, *Fetuca sp.*) (Smith *et al.*, 2006). Comme pour les métaux, les études qui ont comparé la germination et la croissance des plantes exposées ont montré que ce dernier paramètre était le plus sensible (Gong *et al.*, 2001 ; Smith *et al.*, 2006). De même, la croissance racinaire est davantage affectée que la croissance foliaire.

**Tableau VII :** Etudes sur l'inhibition de la croissance (racines, feuilles) et de la germination de plantes supérieures exposées à des sols dopés en HAP ou en hydrocarbures totaux.

Sol	HAP	Espèces	Temps d'exposition	Paramètres	Références
Marne sableuse HAP	Fluorène Phénanthrène Fluoranthène Pyrène	Plantes supérieures (3 sp)	21 j	Inhibition croissance CE <sub>20</sub> = 55 mg/kg CE <sub>20</sub> = 37 mg/kg CE <sub>20</sub> = 140 mg/kg CE <sub>20</sub> = 49 mg/kg	Sverdrup et al. [2003]
Sableux HAP	Naphtalène, Phénanthrène ou Pyrène (< 1000 mg/kg)	maïs ( <i>Z. mays</i> ) haricot ( <i>P. nipponesis</i> )	14 j	Inhibition croissance maïs plus sensible que haricot	Baek et al. [2004]
Marne sableuse mélange HAP	Σ 5 HAP * (< 1000 mg/kg) (Naph, Pyr, Flu, Phe, Ant)	cresson alénois <i>L. sativum</i>	3 j	CE <sub>50</sub> = 150-300 mg/kg (germination) CE <sub>50</sub> = 50-150 mg/kg (émergence)	Maila & Cloete [2002]
Marne sableuse mélange HAP	Σ 4 HAP ** (< 100 mg/kg) (Naph, Ant, Pyr, Chr)	Plantes supérieures (6 sp)	15 j	Inhibition élongation racinaire CE <sub>20</sub> = 130 mg/kg ( <i>tomate L. esculentum</i> ) CE <sub>20</sub> = 116 mg/kg (haricot <i>P. vulgaris</i> )	Maliszewska-Kordybach & Smreczak [2003]
Sableux mélange HAP & Sableux goudron de houille	Σ 7 HAP *** (= 1000 mg/kg) (Naph, Ace, Flu, Phe, Ant, Flt, Pyr) Σ 16 HAP = 1619 mg/kg	Plantes supérieures (7 sp) Plantes supérieures (7 sp)	12 sem 12 sem	Inhibition croissance légumineuses plus sensibles que graminées	Smith et al. [2006]
Sol (granulométrie n.c.) créosote	Hydrocarbures : < 3 g/kg	Graminées (3 sp)	30 j 120 j	Inhibition germination (> 50%) Inhibition croissance (> 50%)	Huang et al. [2004]
Marneux huiles de moteur	Hydrocarbures : 24 000 mg/kg	Plantes supérieures (5 sp)	5 j	Inhibition germination (>90%) Laitue ( <i>L. sativa</i> ) plus sensible	Banks & Schultz [2005]

Légende : n.c. = non communiquée ; sp = nombre d'espèces testées

\*, \*\*, \*\*\* : Ace : Acénaphène; Ant : Anthracène; Chr : Chrysène; Flt : Fluoranthène; Flu : Fluorène; Naph : Naphtalène; Phe : Phénanthrène; Pyr : Pyrène

## II.5.4 Sols contaminés en HAP

L'écotoxicité de sols industriels multi-contaminés en hydrocarbures, et notamment en HAP, a fait l'objet d'études chez les invertébrés terrestres comme les vers de terre ou les collemboles et chez les plantes supérieures (tableau VIII, page 38). Ces sols industriels présentent des teneurs variables mais élevées en HAP ( $\Sigma_{16\text{HAP}} = 1141\text{-}5326$  mg/kg) et en hydrocarbures totaux (TPH = 3900-30700 mg/kg) en fonction de leurs activités passées et/ou actuelles. Cependant, certains auteurs ont montré que l'écotoxicité n'était pas aussi importante que pouvait le suggérer les teneurs en polluants. Saseck *et al.* (2003) ont observé par exemple un pourcentage de survie égal à 73% chez le vers de terre *E. fetida* après 14 jours d'exposition à un sol contaminé en HAP ( $\Sigma_{12\text{HAP}} = 610$  mg/kg) provenant d'une ancienne usine à gaz. Parmi les congénères des HAP mesurés dans ce sol, les teneurs en phénanthrène et pyrène sont respectivement de 169 et 131.7 mg/kg de sol. Dans leur étude, Sverdrup *et al.* (2002b) ont montré, en condition dopée, qu'à des teneurs quasi-identiques le phénanthrène (134 mg/kg) et le pyrène (155 mg/kg) induisaient une inhibition de 50% de la survie des vers de terre (*E. veneta*). Malgré la présence de plusieurs HAP dans le sol multi-contaminé, l'inhibition de la survie des vers a été inférieure à celle obtenue en sol dopé. Ceci indiquerait donc que la biodisponibilité des HAP et donc leur toxicité est diminuée dans les matrices anciennement contaminées, et qu'il est criticable de prédire avec exactitude la toxicité de ces composés dans les sols à partir de résultats obtenus en condition dopée. Plusieurs auteurs ont étudié l'efficacité des traitements de remédiation de sols multi-contaminés en HAP ou plus généralement en hydrocarbures en utilisant à la fois une approche analytique (mesure des polluants) et une approche écotoxicologique chez les organismes terrestres, notamment chez les vers de terre (Sayles *et al.*, 1999 ; Saterback *et al.*, 2003 ; Charrois *et al.*, 2001). Booth *et al.* (2009) ont montré une diminution de la teneur en hydrocarbures totaux (TPH = 7630 et 2270 mg/kg avant et après traitement de bioremédiation) et de l'écotoxicité vis-à-vis des vers de terre *A. caliginosa* (survie, reproduction, croissance, maturation sexuelle) d'un sol issu d'un site de stockage de produits chimiques. Charrois *et al.* (2003) ont montré qu'un sol fortement contaminé en hydrocarbures par du pétrole brut (TPH = 14400-15800 mg/kg) était toxique pour les vers de terre (mortalité totale) et 4 espèces de plantes supérieures (inhibition de la germination et de la croissance des plantes). Après un traitement de biodégradation de 480 jours du sol contaminé, les teneurs en hydrocarbures dans le sol traité ont fortement diminué (TPH = 1760-5720 mg/kg) ainsi que les effets toxiques (pas de mortalité des vers de terre, inhibition de la germination de 10% et de la croissance de 4%-21% chez la laitue).

**Tableau VIII:** Etudes sur l'inhibition de la survie, de la croissance, de la reproduction et de la maturation sexuelle d'invertébrés terrestres et de la croissance et de la germination des plantes supérieures, exposés à des sols multi-contaminés (notamment en HAP et en hydrocarbures totaux).

Sol	Polluants	Organisme	Temps d'exposition	Paramètres	Références
Sol (granulométrie n.c.) <i>ancienne cokerie</i>	$\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 5326 \text{ mg/kg}$	Plantes supérieures (7 sp)	12 sem	Inhibition croissance Plus grande sensibilité des légumineuses	Smith et al. [2006]
Sol (granulométrie n.c.) <i>cokerie</i>	$\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 1141 \text{ mg/kg}$	Laitue <i>L. sativa</i>	5 j	EC <sub>50</sub> = 53% (germination)	Mendonça & Picado [2002]
Sol sablo-argileux <i>créosote</i>	$\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 1300-1500 \text{ mg/kg}$	ver de terre <i>E. fetida</i>	14 j	Mortalité totale à 3,1%	Charrois et al. [2001]
Sol sableux <i>ancienne usine à gaz</i>	$\Sigma_{12 \text{ HAP}} = 610 \text{ mg/kg}$	ver de terre <i>E. fetida</i> moutarde <i>B. alba</i>	14 j 5 j	% Survie = 73% % Germination = 75,7%	Sasek et al. [2003]
Sol sableux <i>ancienne usine à gaz</i>	$\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 1584-3251 \text{ mg/kg}$	Plantes supérieures (7 sp)	60 j	Inhibition croissance Plus grande sensibilité colza ( <i>B. napus</i> ), luzerne ( <i>M. sativa</i> ), trèfle blanc ( <i>T. repens</i> )	Henner et al. [1999]
Sol sableux <i>ancienne usine de traitement du bois</i>	$\Sigma_{19 \text{ PAH}} = 2800 \text{ mg/kg}$	Laitue <i>L. sativa</i> Avoine <i>A. sativa</i> ver de terre <i>E. fetida</i> ver de terre <i>L. terrestris</i>	5 j 14 j	CE <sub>50</sub> laitue = 97% (élongation racinaire) CE <sub>50</sub> avoine = 84% CL <sub>50</sub> <i>E. fetida</i> = 32,9% (survie) CL <sub>50</sub> <i>L. terrestris</i> = 12,8%	Sayles et al. [1999]
Sol sableux <i>site de stockage fuel, pétrole</i>	TPH = 7630 mg/kg	ver de terre <i>A. caliginosa</i>	4 sem	LOEC survie = 25% LOEC croissance = 1% (ad), 10% (juv) LOEC cocons = 10% LOEC maturation sexuelle = 10%	Booth et al. [2009]
Sols (granulométrie n.c.) <i>huiles transformées</i>	TPH = 30700 mg/kg	collembole <i>F. candida</i> moutarde <i>S. alba</i>	14 j 3 j	CL <sub>50</sub> = 13,1 g de sol contaminé (survie) CE <sub>50</sub> élongation = 2,4 g (racine), 1,2 g (feuille)	Leitgib et al. [2007]
<i>mazout</i>	TPH = 3900 mg/kg	collembole <i>F. candida</i> moutarde <i>S. alba</i>	14 j 3 j	CL <sub>50</sub> = 12,5g de sol contaminé (survie) Non toxique	

Légende : Granulométrie n.c. : granulométrie non communiquée ; TPH : Total Petroleum Hydrocarbons (teneurs en hydrocarbures totaux).

## II.6. Génotoxicité des sols contaminés

Différents essais ont été développés pour mettre en évidence la génotoxicité et la mutagénicité des sols pollués. Les tests bactériens (tests d'Ames, *umu*, SOS chromotest, Mutatox) et le test de micronoyaux sur plantes supérieures (*Tradescantia sp.*, *Vicia faba*) ou sur larves d'amphibiens (*Pleurodeles waltl*, *Xenopus laevis*) ont été les plus utilisés et se sont révélés pertinents dans l'évaluation de la génotoxicité/mutagénicité des polluants des sols, des HAP en particulier (Békaert *et al.*, 1999 ; Bispo *et al.*, 1999 ; Cotelte *et al.*, 1999 ; Mendonça & Picado, 2002 ; Mouchet *et al.*, 2006 ; Plaza *et al.*, 2005 ; Sasek *et al.*, 2003 ; Sayles *et al.*, 1999). Ces différents essais estiment le caractère génotoxique/mutagène de la fraction aqueuse ou organique (extraction par le dichlorométhane, par le méthanol) de la pollution des sols. S'il est essentiel de déterminer le caractère génotoxique/mutagène des polluants susceptibles de se retrouver et de contaminer les eaux de surface ou souterraines, cette évaluation ne représente qu'une partie de la pollution des sols et doit être complétée par l'évaluation du potentiel génotoxique de la fraction solide polluée. Or, aucun essai normalisé n'existe aujourd'hui pour évaluer la génotoxicité des polluants du sol non mobilisables. La suite de ce rapport présente les études réalisées pour déterminer la génotoxicité/mutagénicité des matrices solides principalement vis-à-vis des organismes terrestres.

### II.6.1. Etudes chez les vers de terre

Si la biotransformation et la génotoxicité des HAP sont relativement bien connues chez les mammifères et poissons, il n'en est pas de même chez les invertébrés terrestres comme les vers de terre. L'induction des enzymes de biotransformation de type CYP1A qui sert d'indicateur d'exposition aux HAP et aux organochlorés chez les vertébrés n'a pas lieu ou est controversée chez les vers de terre *E. fetida* (Achazi *et al.*, 1998), *E. andrei* (Saint-Denis *et al.*, 1999, 2000) ou *L. rubellus* (Brown *et al.*, 2004). Peu d'informations existent sur le métabolisme des HAP chez les vers de terre. Plusieurs auteurs ont mis en évidence l'implication des glutathion S-transférases (GST) dans les mécanismes de biotransformation des substances organiques (Saint Denis *et al.*, 1998 ; Stenersen *et al.*, 1979). Plus récemment, Stroomberg *et al.* (2004) ont étudié les mécanismes de biotransformation du pyrène chez les vers de terre *E. andrei*, les isopodes *P. scaber* et les collemboles *F. candida* et mis en évidence la formation de métabolites oxydés et conjugués sous forme de glucosides chez les



isopodes et les collemboles. Ces auteurs ont souligné l'extrême variété des mécanismes de biotransformation des invertébrés, qui restent paradoxalement inexplorés.

La génotoxicité des métaux lourds chez les vers de terre serait due à deux mécanismes d'action : 1) la formation d'espèces réactives à l'oxygène (ROS) qui interagissent avec la molécule d'ADN et 2) l'inhibition des systèmes de réparation des dommages à l'ADN (Reinecke & Reinecke, 2004).

### Mesure du taux d'adduits à l'ADN

Le marquage au  $^{32}$  Phosphore des adduits à l'ADN a été la première technique employée pour mettre en évidence la génotoxicité des sols contaminés chez les vers de terre. Van Schooten *et al.* (1995) ont montré chez le ver de terre *L. terrestris* après 1, 2 et 4 semaines d'exposition à un sol industriel contaminé en HAP ( $\sum_{16 \text{ HAP}} \approx 130 \text{ mg/kg}$ ) que la teneur totale en HAP dans les tissus des vers ainsi que le taux d'adduits à l'ADN augmentaient avec la durée d'exposition. Après 4 semaines, le taux d'adduits à l'ADN était de 1.5 pour  $10^8$  nucléotides. Ces auteurs ont également montré que les vers de terre bioaccumulaient dans leurs tissus les HAP de haut poids moléculaire, les plus lipophiles (5 et 6 noyaux aromatiques) alors que le sol industriel était essentiellement contaminé par des HAP à 4 noyaux aromatiques, notamment le pyrène. Walsch *et al.* (1995) ont également montré la formation d'adduits à l'ADN (36.5 et 57.7 adduits pour  $10^9$  nucléotides) chez le ver de terre *L. terrestris* après respectivement 2 et 3 semaines d'exposition à un sol industriel fortement contaminé en HAP ( $\sum_{16 \text{ HAP}} = 3500 \text{ mg/kg}$ ). Un sol provenant d'une décharge illégale de produits chimiques et fortement contaminé en HAP ( $\sum_{16 \text{ HAP}} \approx 6000 \text{ mg/kg}$ ) s'est également révélé génotoxique pour les vers *L. terrestris* (entre 56.1 et 69.1 adduits pour  $10^9$  nucléotides) après 1 semaine d'exposition et *E. fetida* (34.4 et 31.3 adduits pour  $10^9$  nucléotides) après 1 et 2 semaines d'exposition respectivement (Walsch *et al.*, 1997).

Plus récemment, Martin *et al.* (2005) ont montré chez une autre espèce de ver de terre – *A. longa* – une augmentation dose-dépendante des adduits à l'ADN après 24 heures d'exposition à un sol dopé en B[a]P à des concentrations de 0.1, 1 et 10 mg/kg. Ces concentrations sont bien inférieures à celles des études précédentes. Le taux d'adduits à l'ADN était respectivement de 4.66-5.08, 7.26-7.91 et 10.54-11.49 pour  $10^8$  nucléotides.

En raison de son coût élevé, du faible nombre d'échantillons pouvant être analysés et surtout de la radioactivité du  $^{32}$ Phosphore, cette technique de détection des dommages à

l'ADN chez les vers de terre été délaissée au profit notamment de l'essai comet ou *single-cell gel electrophoresis assay* (SCGE).

#### Mesure des dommages à l'ADN par l'essai comet

L'essai comet ou *single-cell gel electrophoresis assay* (SCGE) mesure le degré de dommages à l'ADN des cellules. Ostling & Johanson (1984) ont développé cet essai en condition de pH neutre afin de mesurer les dommages double brins de l'ADN. Singh *et al.* (1988) ont développé cet essai en conditions alcalines (pH > 13), méthode la plus appliquée aujourd'hui car plus sensible. En effet, la version alcaline de l'essai comet permet de mesurer à la fois les dommages double-brins, simple brin et l'expression des sites alcali-labiles de la molécule d'ADN. Ce biomarqueur de génotoxicité est de plus en plus étudié chez les organismes terrestres dont les vers de terre, comme en atteste le nombre croissant de travaux au fil des années. L'espèce *E. fetida* est celle qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études. Les dommages à l'ADN chez les vers de terre ont été mesurés sur différents types cellulaires. Quelques auteurs ont étudié les dommages à l'ADN au niveau de cellules germinales mâles (Bustos-Obregon & Goicochea, 2002), de cellules du jabot-gésier (Martin *et al.*, 2005) ou de l'intestin (Button *et al.*, 2009 ; Martin *et al.*, 2005) des vers de terre. Cependant, l'essai comet chez les vers de terre porte essentiellement sur les coelomocytes. Les coelomocytes jouent un rôle important dans les réactions immunitaires telles que la phagocytose, l'encapsulation et la nodulation de corps étrangers, dans la production de substances bactéricides, dans le maintien de la balance ionique et du pH du fluide coelomique et de l'hémolymphe, dans le transport et le stockage de substances nutritives, de glycogène (Adamowicz & Wojtaszek, 2001 ; Affar *et al.*, 1998 ; Cossarizza *et al.*, 1996 ; Fugère *et al.*, 1996 ; Valembois *et al.*, 1992, 1994 ; Ville *et al.*, 1995). Les coelomocytes, localisés au niveau du coelome et de l'épithélium du tube digestif des vers de terre, sont pertinents dans l'étude de la génotoxicité car ils sont à la fois exposés aux polluants ingérés par les organismes et aux polluants qui diffusent à travers les pores du tégument.

Les dommages à l'ADN mis en évidence par l'essai comet ont principalement été mesurés après exposition des vers à des sols pollués. Le tableau IX (page 42) résume les principales études chez les vers de terre en condition dopée.

**Tableau IX** : Etudes de génotoxicité (essai comet) chez les vers de terre exposés à des matrices dopées en HAP ou en métaux lourds.

Matrice dopée Polluant	Espèce	Temps d'exposition	Paramètre	Concentrations génétoxiques	Références
Sol naturel Benzo[a]pyrène	<i>A. longa</i> cellules intestinales	24h <i>in vivo</i>	TL	0,1; 1; 10 mg/kg	Martin et al. [2005]
Sol OCDE Phénanthrène	<i>E. andrei</i>	14j <i>in vivo</i>	TL, % tDNA, ETM, OTM	0,5; 2,5; 12,5 mg/kg	Zhu et al. [2006]
Sol OCDE Cd	<i>E. andrei</i>	14j <i>in vivo</i>	TL, % tDNA, ETM OTM	50 mg/kg 10; 50 mg/kg	Zhu et al. [2006]
Sol OCDE Cd	<i>E. fetida</i>	7j <i>in vivo</i>	% tDNA	0,1; 1; 10 mg/kg	Li et al. [2009]
Eau de sol artificiel Cd	<i>A. caliginosa</i> <i>D. rubidus</i> <i>E. fetida</i>	48h <i>in vivo</i>	% tDNA	20 mg/L	Fourie et al. [2007]
Eau de sol artificiel Cd	<i>E. fetida</i>	48h <i>in vivo</i>	% tDNA	2,5; 5; 10; 20 mg/L	Voua Otomo & Reinecke [2009]
Eau de sol artificiel NiCl <sub>2</sub>	<i>E. fetida</i>	48h <i>in vivo</i>	TL	2; 6; 12 µg/L	Reinecke & Reinecke [2004]
Fumier NiCl <sub>2</sub>	<i>E. fetida</i>	4 sem <i>in vivo</i>	TL	60, 240, 480 mg/kg	Reinecke & Reinecke [2004]
Fumier CrVI	<i>D. curgensis</i>	1, 7 & 14j <i>in vivo</i>	% noyaux avec ADN endommagé	1 to 100 mg/kg	Manerikar et al. [2008]

Légende : Les dommages à l'ADN ont été mesurés sur les coelomocytes (sauf indication contraire). Paramètres mesurés (TL : tail length ; % tDNA : Pourcentage d'ADN dans la queue de la comète ; ETM : extent tail moment ; OTM : olive tail moment).

La génotoxicité des métaux lourds en condition dopée a fait l'objet du plus grand nombre d'études chez les vers de terre. Différents auteurs ont mis en évidence la génotoxicité du cadmium (Di Marzio *et al.*, 2005 ; Fourie *et al.*, 2007 ; Li *et al.*, 2009 ; Voua Otomo & Reinecke, 2009 ; Zhu *et al.*, 2006), du nickel (Reinecke & Reinecke, 2004) et du chrome hexavalent (Manerikar *et al.*, 2008) chez les vers de terre. Des congénères des HAP tels que le B[a]P (Martin *et al.*, 2005), le phénanthrene (Zhu *et al.*, 2006) ont montré des effets génotoxiques chez les vers de terre à des teneurs proches ou inférieures à 10 mg/kg. La génotoxicité des pesticides en condition dopée a également fait l'objet de plusieurs études chez les vers de terre (Casabé *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2009 ; Song *et al.*, 2009 ; Xiao *et al.*, 2006a).

Les résultats de génotoxicité de matrices multi-contaminées ont été synthétisés dans le tableau X (page 44). Une augmentation des dommages à l'ADN a été observée au niveau des coelomocytes de vers de terre exposées *in vitro* à des lixiviats contaminés en métaux lourds issus d'un sol industriel (Di Marzio *et al.*, 2007) ou de déchets d'une centrale thermique (Manerikar *et al.*, 2008). La génotoxicité de sols de décharges (Verschaeve & Gilles, 2005), de zones industrielles (Di Marzio *et al.*, 2005 ; Qiao *et al.*, 2007 ; Xiao *et al.*, 2006) ou plus spécifiquement de cokeries (Salagovic *et al.*, 1996) contaminés par différents polluants organiques a été mise en évidence par la même méthodologie.

#### Mesure de la 8-hydroxydéoxyguanosine

L'induction de la 8-hydroxydéoxyguanosine (8-OH-dG), qui traduit des dommages oxydatifs à la molécule d'ADN, a fait l'objet d'une étude récemment chez les vers de terre en condition dopée. Nakashima *et al.* (2008) ont mesuré par chromatographie liquide haute performance (HPLC) l'induction de la 8-OH-dG au niveau des vésicules séminales du ver de terre *E. fetida* après 3 mois d'exposition à un sol dopé au cadmium à une concentration de 10 mg/kg de sol.

**Tableau X** : Etudes de génotoxicité (essai comet) chez les vers de terre exposés à des sols multi-contaminés.

Polluants	Espèce	Temps d'exposition	Paramètre	Concentrations génotoxiques	Références
Sol contaminé provenant d'une décharge illégale <i>benzene, aniline</i>	<i>E. fetida</i>	48h <i>in vivo</i>	TL	Génotoxicité du sol <i>n.c.</i>	Verschaeve & Gilles [1995]
Sol de cokerie <i>HAP</i>	<i>E. fetida</i>	48h <i>in vivo</i>	ETM	Génotoxicité aux concentrations de 25% et 70% de sol contaminé <i>n.c.</i>	Salagovic et al. [1996]
Sédiment de rivière contaminé avec des effluents industriels	<i>E. fetida</i>	48h <i>in vivo</i>	ratio LW	Génotoxicité des échantillons <i>n.c.</i>	Rajaguru et al. [2003]
Sol contaminé en HAP	<i>E. fetida</i>	14; 21j <i>in vivo</i>	% tDNA, ETM, TL	$\sum_{16 \text{ HAP}} = 96 \text{ mg/kg}$	Di Marzio et al. [2005]
Sol d'une zone industrielle <i>polluants organiques</i>	<i>E. fetida</i>	72h <i>in vivo</i>	ETM	$\sum_{16 \text{ HAP}} = 0,20\text{-}5,19 \text{ } \mu\text{g/g}$ $\sum_{\text{HCH}} = 3,39\text{-}1050,41 \text{ ng/g}$ $\sum_{\text{DDT}} = 0,27\text{-}799,39 \text{ ng/g}$	Xiao et al. [2006b]
Sols irrigués par des eaux usées <i>polluants organiques</i>	<i>E. fetida</i>	1; 3; 7; 14j <i>in vivo</i>	ETM	$\sum_{16 \text{ HAP}} = 67,2\text{-}228,4 \text{ ng/g}$ Total OCPs = 0,8-15,8 ng/g	Qiao et al. [2007]

Légende : Les dommages à l'ADN ont été mesurés sur les coelomocytes. Paramètres mesurés (% tDNA : Pourcentage d'ADN dans la queue de la comète ; TL : tail length ; ETM : extent tail moment ; ratio L/W : ratio length/width). *n.c.* : concentrations non communiquées.

## II.6.2. Etude chez les plantes

### Induction des micronoyaux (MN) et aberrations chromosomiques (CA)

Les essais micronoyaux sur plantes portent essentiellement sur les extraits aqueux de sols contaminés (Cotelle *et al.*, 1999 ; Song *et al.*, 2006). Des auteurs ont montré que cet essai de micronoyaux pouvait être appliqué aux matrices solides. Une induction du nombre de micronoyaux au niveau des cellules du méristème racinaire a été observée après 3 jours d'exposition de l'espèce *Tradescantia* à des sols industriels (fonderies, mines) contaminés en métaux lourds (concentrations minimales-maximales mesurées dans les sols : Cd = 0.2-25 mg/kg, Cr = 23-56 mg/kg, Ni = 22-96 mg/kg, Pb = 55-10779 mg/kg, Zn = 17-5121 mg/kg), alors que la fève *V. faba* et l'oignon *A. cepa* ne se sont pas révélés sensibles (après 3 ou 14 jours d'exposition) (Knasmüller *et al.*, 1998 ; Steinkellner *et al.*, 1998). Des effets mutagènes ont également été observés chez *Tradescantia* après 3 jours d'exposition à deux sols dopés par plusieurs métaux lourds (Cd = 4.2-4.8 mg/kg, Cr = 17-45 mg/kg, Cu = 128-129 mg/kg, Ni = 63-87 mg/kg, Pb = 23-33 mg/kg, Zn = 356-388 mg/kg). Des sols multi-contaminés provenant d'anciennes mines de cuivre/plomb, d'anciennes fonderies de plomb/zinc et d'anciennes industries chimiques/minières (Cd  $\approx$  0.2-90 mg/kg, Cr  $\approx$  10-214 mg/kg, Cu  $\approx$  6-1808 mg/kg, Ni  $\approx$  10-213 mg/kg, Pb  $\approx$  54-28144 mg/kg, Zn  $\approx$  94-23727 mg/kg) se sont également révélés mutagènes chez *Tradescantia* (Majer *et al.*, 2002).

Song *et al.* (2007) ont montré une induction des micronoyaux dans les cellules racinaires de la fève *V. faba* après 5 jours d'exposition à des sols de rizières irrigués par des eaux usées multi-contaminées ( $\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 0,9-2,8 \text{ mg/kg}$  ;  $\Sigma_{\text{PCB}} = 12-20,1 \text{ ng/kg}$ , Cd = 1,4-2 mg/kg). La mutagénicité de trois sols, essentiellement contaminés en HAP ( $\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 2-561 \text{ mg/kg}$ ) avant ou après un traitement de bioremédiation a également été étudiée par ces auteurs. Les résultats obtenus ont été relativement différents. Le sol le moins contaminé en HAP ( $\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 2-2.5 \text{ mg/kg}$ ) s'est révélé mutagène avant le traitement de bioremédiation. Ce dernier n'a eu aucune incidence sur la teneur en HAP du sol et a éliminé le caractère mutagène de la pollution. Le 2<sup>nd</sup> sol étudié ( $\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 267-294 \text{ mg/kg}$ ) n'a montré aucune mutagénicité, avant ou après bioremédiation. Ce traitement, comme pour le 1<sup>er</sup> sol, n'a eu aucune incidence sur les teneurs en HAP. Le dernier sol étudié ( $\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 561 \text{ mg/kg}$ ) s'est révélé toxique pour les plantes (mortalité des plants). Le traitement de bioremédiation a éliminé plus de 98% de la teneur en HAP ( $\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 9.4 \text{ mg/kg}$ ) et le caractère toxique du sol mais pas sa mutagénicité. White &

Claxton (2004) ont montré que la remédiation des sols pouvait soit éliminer ou au contraire mobiliser les polluants génotoxiques/mutagènes des sols. Récemment, Marcato-Romain *et al.* (2009) ont observé une induction des micronoyaux des cellules du méristème racinaire chez la fève *V. faba* après 2 jours d'exposition à des sols industriels contaminés en métaux lourds (Cd = 6 mg/kg; Cr = 62 mg/kg; Ni = 33 mg/kg; Pb = 1933 mg/kg, Zn = 87 mg/kg) ou en HAP ( $\Sigma_{16} \text{HAP} = 610 \text{ mg/kg}$ ). Les extraits aqueux ont montré en général une plus grande mutagénicité que les sols correspondants. Les auteurs recommandent l'utilisation du test micronoyaux en milieu solide car il intègre les propriétés physico-chimiques des sols telles que le caractère anticlastogène des substances humiques (Ferrara *et al.*, 2000). La mutagénicité des extraits aqueux est également réaliste et reflète la fraction mutagène extractible par les précipitations.

Une étude a montré une augmentation du pourcentage d'aberrations chromosomiques et de l'index mitotique des cellules du méristème racinaire de la fève *V. faba* après 5 jours d'exposition à un sol dopé par 5 et 10% d'un lixiviat de déchets de tannerie contaminés en métaux lourds (Cd = 0.8 mg/kg ; Cr = 25400 mg/kg ; Ni = 775 mg/kg; Pb = 100 mg/kg ; Zn = 222 mg/kg) (Chandra *et al.*, 2004).

#### Mesure des dommages à l'ADN par l'essai comet

Les principales études portent sur la génotoxicité des métaux lourds en solution tels que le cadmium, le chrome trivalent ou hexavalent, le plomb chez la fève *V. faba* (Koppen & Verschaeve, 1996, Lin *et al.*, 2007), le tabac *N. tabacum var. xanthi* (Gichner *et al.*, 2004, 2008a), la pomme de terre *S. tuberosum L. cultivar Korela* (Gichner *et al.*, 2008b), l'oignon *A. cepa* (Seth *et al.*, 2008). Lin *et al.* (2005) ont montré des dommages à l'ADN au niveau des racines de la fève *V. faba* après 2 heures d'exposition à un sol dopé en cadmium à des concentrations comprises entre 0.5 et 2 mg/kg. Gichner *et al.* (2006) ont montré une augmentation des dommages à l'ADN au niveau des feuilles de tabac (*N. tabacum var. xanthi*) et de pomme de terre (*S. tuberosum var. Korela*) après 4, 8 et 12 semaines d'exposition à un sol contaminé en métaux lourds (Cd = 11 mg/kg ; Cu = 556 mg/kg ; Pb = 12190 mg/kg ; Zn = 1292 mg/kg). Liu *et al.* (2004) ont montré la génotoxicité d'un sol dopé au 1,2,4-trichlorobenzène (hydrocarbure aromatique halogéné) à des concentrations comprises entre 50 et 300 mg/kg au niveau des cellules racinaires de soja *G. max*.

Modifications des quantités et des séquences d'ADN par cytométrie en flux et AFLP

Pour mettre en évidence la génotoxicité de métaux lourds (Cd, CrVI, Ni) chez le trèfle blanc *T. repens*, Citterio *et al.* (2002) ont utilisé deux techniques de biologie moléculaire : la cytométrie en flux (FCM) ainsi que l'AFLP (*amplified fragment-length polymorphism*).

La cytométrie en flux permet de quantifier les variations de la quantité d'ADN, plus précisément la perte d'ADN nucléaire. L'AFLP permet de quantifier les changements au niveau de la séquence d'ADN. Ces auteurs ont montré la perte d'ADN nucléaire et l'augmentation des débris d'ADN dans les pousses et les racines de trèfle après 15 jours d'exposition à un sol dopé en chrome hexavalent à des concentrations de 25 et 50 mg/kg et à un sol dopé en cadmium à des concentrations de 17.5 et 52.5 mg/kg. Des variations de la séquence d'ADN génomique ont été observées dans les pousses et les racines de trèfle exposées au nickel (50 et 100 mg/kg), au cadmium (17.5 et 52.5 mg/kg) et au chrome hexavalent (25, 50 et 100 mg/kg). Ces auteurs ont montré par la même méthodologie la génotoxicité de sols industriels (sidérurgies) principalement contaminés en métaux (Cd =  $132 \pm 61$  mg/kg ; Cr =  $4810 \pm 1662$  mg/kg; Cu =  $20 \pm 6$  mg/kg ; Ni =  $799 \pm 276$  mg/kg ; Pb =  $51 \pm 16$  mg/kg) après 15 jours d'exposition des pousses et des racines de trèfle.

Aina *et al.* (2006) ont montré par la même méthodologie la génotoxicité en condition dopée du naphtalène (à 25, 50 et 100 mg/kg) et du B[a]P (à 5, 10 et 20 mg/kg) chez le trèfle blanc *T. repens* après 15 jours d'exposition. Les variations de la séquence d'ADN ont été plus importantes au niveau des racines que des feuilles, suggérant ainsi que la translocation des HAP et de leurs métabolites génotoxiques est relativement limitée chez cette espèce.



# *Objectifs*

## Objectifs de la recherche

L'inventaire des sites et sols pollués par des activités industrielles (BASOL), ordonné par le Ministère de l'Ecologie, de l'Energie, du Développement Durable et de la Mer (MEEDDM), place la Lorraine au 4<sup>ème</sup> rang des régions françaises les plus sinistrées, avec près de 300 sites contaminés (soit 7.4%) (<http://basol.environnement.gouv.fr/tableaux/home.htm>). La Lorraine est une région de tradition minière et industrielle avec l'extraction du fer, du charbon et les différentes activités sidérurgiques, métallurgiques... Les sols des friches industrielles sont caractérisés par de fortes teneurs en éléments traces métalliques ainsi qu'en hydrocarbures dont les HAP (DRIRE, 2008, 2009). Si les congénères des HAP de haut poids moléculaire (5 et 6 noyaux aromatiques) et les métaux lourds comme le cadmium, le chrome hexavalent ou le nickel sont connus pour leur génotoxicité et leur cancérogénicité vis-à-vis de l'Homme et des mammifères (IARC, 1987, 1990, 1993), leur génotoxicité et leurs effets à plus long terme sont encore mal connus chez les invertébrés terrestres, notamment chez les vers de terre.

**La génotoxicité des polluants peut entraîner des modifications de l'expression du génome. L'hypothèse selon laquelle ces altérations génomiques sont susceptibles d'entraîner des perturbations physiologiques touchant la dynamique de croissance des populations exposées mérite d'être étudiée. Si une relation peut être établie entre des effets génotoxiques au niveau cellulaire et des effets populationnels à long terme, il devient alors intéressant d'étudier les marqueurs de génotoxicité comme indicateurs prédictifs de dysfonctionnement écologique.**

Le sujet de recherche concernait l'impact de sols pollués par des substances génotoxiques telles que les HAP et/ou les métaux lourds sur les invertébrés terrestres, et l'établissement des relations « **biodisponibilité/génotoxicité/effets populationnels** ». Les études ont porté sur les vers de terre qui sont un maillon important des écosystèmes terrestres et des indicateurs de la qualité des sols. L'espèce *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) a été choisie pour les études réalisées en laboratoire, étant une espèce recommandée dans les essais normalisés d'écotoxicité des sols.

Les études sur les organismes ont été réalisées en laboratoire sur des échantillons de **sols provenant de deux sites anciennement contaminés** par des activités de cokeries:

- 1) échantillons de sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM) contaminés essentiellement en HAP lourds,
- 2) échantillons de sol de la cokerie de Neuves-Maisons contaminés par des HAP et/ou des métaux lourds, avant (sol NM) et après traitement de thermodésorption (sol NMDT).

Cette étude a été réalisée dans le cadre du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (GISFI) présidé par J-L Morel et du projet Multipolysite coordonné par C. Leyval. Ce projet de recherche concerne l'étude *in situ* et à long terme du devenir et des conséquences environnementales de la multipollution d'un sol. L'influence de la phytoremédiation sur le devenir, le comportement et l'écotoxicité des polluants des sols de la cokerie de Neuves-Maisons, non traité (sol NM) et thermodésorbé (sol NMDT), est étudiée en parcelles expérimentales (figure 4). Différents traitements de phytoremédiation tels que l'influence de la luzerne *Medicago sativa* en présence ou non d'un mycorhize (*Glomus intraracides*) dans la phytodégradation des HAP, l'influence du tabouret calaminaire (*Thlaspi caerulescens*), plante hyperaccumulatrice de métaux sont étudiés.



**Figure 4 :** Dispositif de parcelles de la station expérimentale du GISFI pour les études de phytoremédiation.

L'objectif de notre étude était de démontrer :

- 1) l'intérêt des biomarqueurs de génotoxicité en tant qu'**indicateur de biodisponibilité** des polluants,
- 2) le bien-fondé du suivi de la génotoxicité en tant qu'**indicateur précoce** de perturbations physiologiques touchant la dynamique de croissance et de reproduction des populations,
- 3) **le seuil de réponse des biomarqueurs de génotoxicité sans effet au niveau populationnel.**

Les effets génotoxiques ont été étudiés parallèlement aux effets sur la survie des vers adultes et juvéniles, et sur la dynamique de croissance et de reproduction des populations exposées. Il était important d'établir une relation entre l'exposition du ver *E. fetida* à différentes concentrations des échantillons de sol à étudier et la génotoxicité. Les concentrations d'exposition étudiées devaient donc être compatibles avec la survie, la croissance et la reproduction des organismes.

Une première partie de ce travail a consisté à étudier les effets de la contamination des sols sur la survie et la reproduction des vers de terre, afin d'établir la gamme de concentrations testées pour les essais de génotoxicité. La réponse des vers de terre a été replacée dans le contexte plus général de l'écotoxicité des sols. En parallèle, les effets sur la germination et la croissance de plantes supérieures ainsi que sur la reproduction des collemboles ont été mesurés (**Résultats V.1.**).

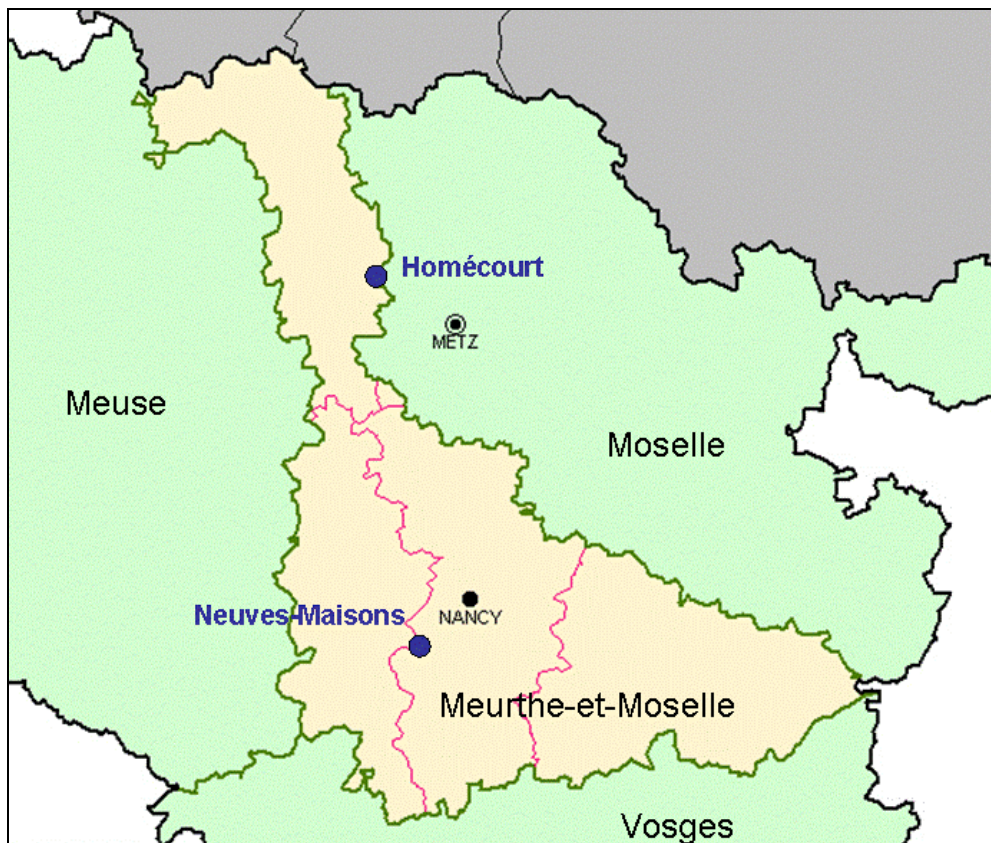
La seconde partie de ce travail a consisté à étudier la génotoxicité du sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM), essentiellement contaminé en HAP (**Résultats V.2.**) et des sols de la cokerie de Neuves-Maisons, contaminés en HAP et/ou en métaux lourds, avant (sol NM) et après (sol NMDT) un traitement par thermodésorption (**Résultats V.3.**).

# *Matériel et Méthodes*

# Matériel et Méthodes

## IV.1. Description et historique des sites étudiés

Les sols étudiés ont été collectés sur deux anciens sites industriels situés en Meurthe-et-Moselle (54) (figure 5). Le coke est obtenu par distillation de la houille (ou charbon à coke) dans un four à l'abri de l'air. Sa cuisson se fait à une température de 1200-1350°C et dure entre 16 h et 40 h. Le coke est principalement utilisé en sidérurgie comme combustible à fort pouvoir calorifique. Le minerai de fer est réduit dans un haut-fourneau pour obtenir la fonte qui est ensuite transformée en acier. Les sols ont été fournis au Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (GISFI) par la société Bail Industrie, qui gère les friches industrielles françaises du groupe Arcelor.



**Figure 5 :** Localisation des friches industrielles où ont été prélevés les sols étudiés

Le premier site industriel étudié est situé à Homécourt au nord de Metz (49°13'25''Nord ; 5°59'36''Est). Le site d'Homécourt a hébergé deux cokeries successives. La première cokerie a été mise en service en 1922 et comprenait deux batteries de 70 fours à coke chacune (270 000 tonnes de coke par an). En 1934, un gazomètre a été construit. Les installations ont été remises en état dans les années 1950 pour produire 350 000 tonnes de coke par an. En 1962, la 2<sup>nd</sup>e cokerie a été mise en place sur les fondations de la 1<sup>ère</sup> et était composée de 4 batteries de 21 fours chacune (450 000 tonnes de coke par an et 220 millions de m<sup>3</sup> de gaz par an). La cokerie a cessé ses activités en 1981 et a été démantelée entre 1984 et 1985 (documentation Bail Industrie, dans Norini, 2007). La station expérimentale du GISFI s'est implantée au niveau de cet ancien site industriel (figure 6, page 53).

Le second site industriel est situé à Neuves-Maisons au sud de Nancy (48°37'01''Nord ; 6°06'16''Est). Ce site industriel a hébergé différentes activités au cours de son histoire, dont des activités de cokerie. Le 1<sup>er</sup> haut fourneau fut construit en 1874, suivi d'un 2<sup>nd</sup> en 1882 et de deux autres en 1898. A partir de 1902, plusieurs installations voient le jour (aciéries, laminoirs, centrale électrique ainsi que d'autres hauts fourneaux portant le nombre total à 7). Les deux premiers fourneaux construits sont arrêtés en 1931 alors que la production de fonte et d'acier était respectivement de 8 119 000 tonnes et 9 700 000 tonnes en 1929. En 1983, les activités de cokeries ont été stoppées.



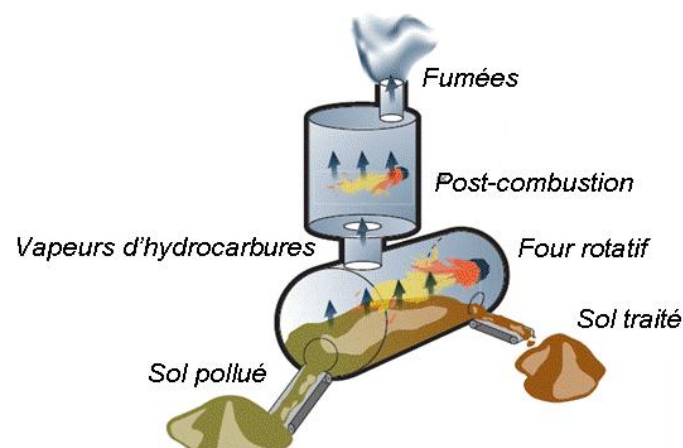
**Figure 6** : Photographies du site de la cokerie d'Homécourt (54) avant son démantèlement (haut). La station expérimentale du Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles s'est installée sur le site de la cokerie après son démantèlement (bas) (source GISFI, <http://www.gisfi.fr>).



## IV.2. Echantillonnage des sols

En avril 2004, les terres de l'ancien site industriel d'Homécourt ont été excavées. Des échantillons de sols (noté dans la présente étude sol HOM) ont été triés, criblés à 80 mm, tamisés à 4 mm puis homogénéisés. Ils ont ensuite été stockés à 13°C en laboratoire pour les analyses physico-chimiques et écotoxicologiques.

Les terres du site de Neuves-Maisons ont de la même façon été excavées, triées, criblées à 80 mm puis stockées sur le site du crassier pendant plusieurs années (2000-2004). Une partie de la terre excavée a été traitée dans une unité mobile de désorption thermique (Deep Green) (figure 7). Des échantillons de sols, bruts (noté sol NM) et thermodésorbés (noté sol NMDT), ont été ensuite acheminés sur le site pilote du GISFI. Ces échantillons de sol, comme ceux de la cokerie d'Homécourt, ont été tamisés à 4 mm, homogénéisés et stockés à 13°C en laboratoire jusqu'à leur utilisation.



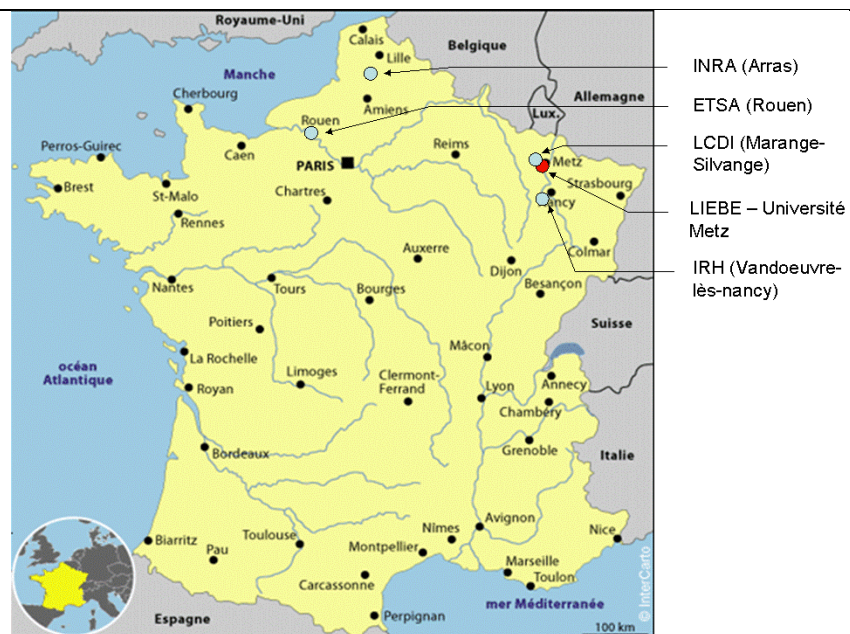
**Figure 7** : Installation mobile de désorption thermique pour le traitement de sols contaminés (source DRIRE Lorraine, <http://217.167.195.132/webdrire/files/DEI/Bilan02SSpollues.pdf>).

### **IV.3. Analyse physico-chimique des sols**

L'analyse physico-chimique des sols étudiés a été réalisée par différents laboratoires, (tableau XI et figure 8, page 56). Les caractéristiques physico-chimiques des sols de la cokerie d'Homécourt, de Neuves-Maisons et de Neuves-Maisons thermodésorbé sont présentées dans les Annexes 1, 2, et 3 respectivement. Le sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM) est essentiellement contaminé en HAP. Le sol brut (sol NM) de la cokerie de Neuves-Maisons est contaminé à la fois en HAP, à une teneur quasi-équivalente à celle du sol HOM, et en métaux lourds, à des concentrations supérieures à celles du sol HOM. Le sol thermodésorbé (sol NMDT) est essentiellement contaminé en métaux lourds, à des concentrations similaires à celles du sol brut (sol NM).

Les 16 congénères des HAP, listés comme polluants prioritaires dans les sols par l'Agence américaine de protection de l'environnement (US-EPA), ont été mesurés par HPLC-fluorescence au sein du laboratoire IRH Environnement (Institut de Recherche en Hydrobiologie, Vandœuvre-lès-Nancy, France). La quantification des HAP dans les sols a été réalisée en accord avec le protocole normalisé au niveau national XP X 33-012 (2000). Les échantillons de sols ont été séchés à 40°C, tamisés à 2 mm puis broyés à 250 µm. L'extraction des HAP a été réalisée par une technique SAE (Accelerated Solvent Extractor 200, Dionex, Sunnyvale, USA), permettant une extraction solide/liquide à 100°C sous pression de 136 bars, avec comme solvants (ratio 50:50, v:v) le dichlorométhane et l'hexane. Après extraction des solvants, les extraits ont été dissous dans de l'acétonitrile. Les HAP sont ensuite séparés et mesurés par chromatographie liquide haute performance (HPLC), couplée à un spectrofluorimètre et un détecteur UV. **La concentration totale en HAP (en mg/kg sol sec) correspond à la somme des concentrations des 16 HAP analysés.**

Les teneurs en métaux lourds dans les sols ont été dosées par spectrométrie d'émission atomique à source plasma (ICP-SAE) pour le Co, Cr, Cu, Ni, Zn et par spectrométrie de masse à source plasma (ICP-MS) pour le Cd, Mo, Pb, Tl au sein de l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA, Arras, France, <http://www.inra.fr/>). La spéciation du chrome a été étudiée spécifiquement. Les teneurs en chrome hexavalent (CrVI) dans les sols ont été analysées par spectrométrie d'absorption moléculaire (SAM), en accord avec le protocole normalisé au niveau national NF T 90043 (1988) au sein du laboratoire LCDI Environnement (Marange-Silvange, France).



**Figure 8** : Localisation des différentes institutions impliquées dans l'analyse physico-chimique des sols.

**Tableau XI** : Institutions impliquées dans les analyses physico-chimiques des sols contaminés et du substrat de référence ISO.

Type d'échantillon	Composés	Instituts	Méthodes
Sols Homécourt - Neuves-Maisons	Métaux lourds	INRA (Arras)	ICP-SAE ou MS
	Chrome hexavalent	LCDI (Marange-Silvange)	SAM
	HAP	IRH (Vandœuvre-lès-Nancy)	HPLC-UV
	Caractéristiques physico-chimiques <i>texture, granulométrie, pH...</i>	INRA (Arras)	Standards ISO, français
Sol artificiel ISO	Métaux lourds HAP Caractéristiques physico-chimique	ETSA (Rouen)	ICP-SAE ou MS GC-MS Standards ISO, français

Les caractéristiques physico-chimiques des sols telles que le carbone organique total, le pH, la granulométrie, la texture... ont été analysées en accord avec les protocoles ISO normalisés, par l'INRA d'Arras.

Les teneurs en HAP, métaux lourds ainsi que les propriétés intrinsèques du sol artificiel ISO utilisé dans les essais d'écotoxicité des vers de terre, ont été analysées par le laboratoire ETSA (Rouen, France).

## IV.4. Matériel biologique

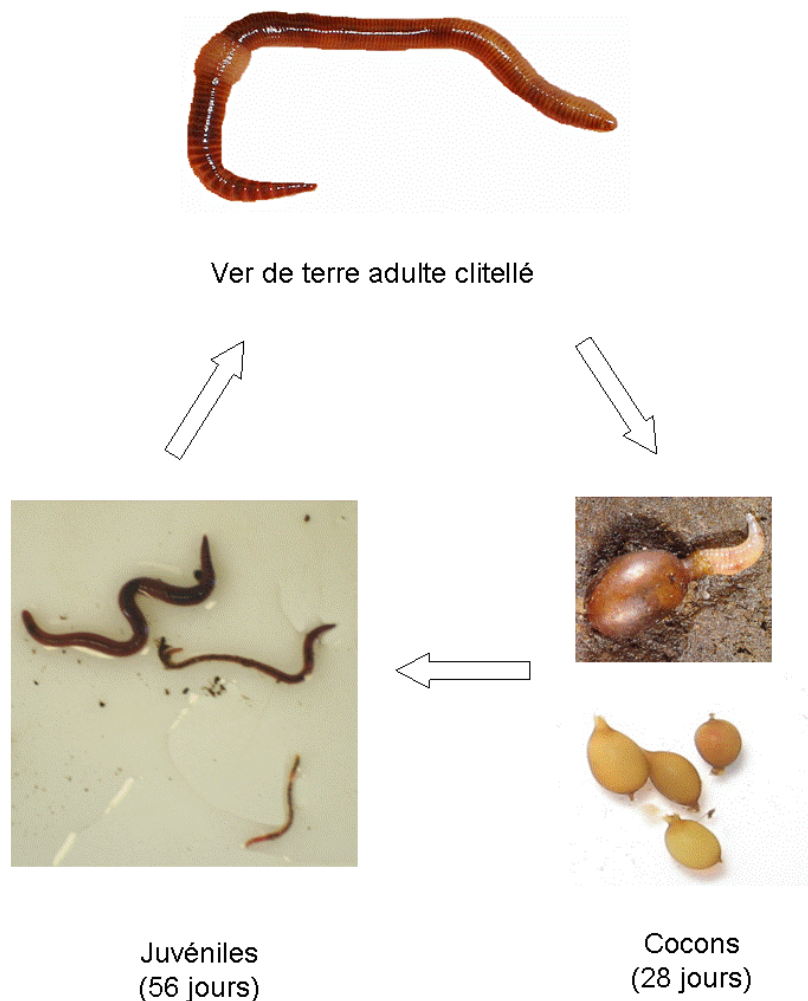
### IV.4.1. Systématique

Règne : Animalia  
Embranchement : Annelidae  
Classe : Oligochaeta  
Sous-Classe : Diplotesticulata  
Super-Ordre : Megadrili  
Ordre : Opisthopora  
Sous-Ordre : Lumbricina  
Famille : Lumbricidae  
Genre : Eisenia  
Espèce : *Eisenia fetida* (Savigny, 1826)

### IV.4.2. Description de l'espèce

Les vers de terre (annélides oligochètes) sont des organismes fousseurs. Leur activité et leur écologie en font des acteurs majeurs dans la structuration des sols. Ils ont un rôle fondamental dans l'aération, la circulation de différents gaz, solutés.... De plus, ils influencent la fertilité des sols mais aussi l'activité et la diversité des microorganismes du sol. De par leur rôle écololgique, les vers de terre sont reconnus comme étant de bons indicateurs de la qualité des sols en écotoxicologie (ADEME, 1998).

L'écotoxicité des trois sols de friches industrielles a été étudiée chez le ver de terre *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (figure 9). *Eisenia fetida* est un ver de terre de petite taille, qui vit au niveau des litières à la surface du sol et se nourrit principalement de la matière organique en décomposition (ver épigé). On l'appelle également « ver rouge » ou « ver de fumier ». Cette espèce a un cycle de vie relativement court, comparé à d'autres espèces de vers de terre. Les vers de terre déposent des cocons dans lesquels plusieurs œufs peuvent se développer. Il s'agit donc d'une espèce prolifique. Les juvéniles éclosent en général un mois après la formation du cocon et atteignent la maturité sexuelle après 3 mois. L'élevage en laboratoire de ce ver de terre est aisé. Pour ces raisons, *E. fetida* a été choisi en tant que représentant des vers de terre dans les essais d'écotoxicité terrestre normalisés au niveau international. Cette espèce a également un rôle économique puisqu'elle est utilisée à la fois dans le lombricompostage des déchets et comme appât pour la pêche.



**Figure 9** : Cycle de vie du ver de terre *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) (Photographie : LIEBE)

#### IV.4.3. Elevage du ver *Eisenia fetida*

Les vers de terre utilisés dans les essais d'écotoxicité et de génotoxicité des sols de friches industrielles proviennent de l'élevage du laboratoire LIEBE. Cet élevage est réalisé suivant le protocole détaillé dans l'annexe A (Exemple de technique d'élevage d'*E. fetida*) de la norme ISO 11268-1 (1993). Les vers de terre sont élevés dans des containers plastiques d'un volume de 20 litres, constitué à 50/50 (poids/poids) d'un mélange de crottin de cheval et de tourbe, dont le pH est compris entre 5 et 7, et humidifié avec de l'eau déminéralisée. Les vers de terre sont nourris avec du crottin de cheval séché, tamisé, exempt de toutes traces de pollution. L'élevage est réalisé dans un laboratoire isolé du LIEBE, à température ambiante. Les cocons sont isolés dès la production de manière à caractériser l'âge des juvéniles et des adultes produits et à constituer des lots d'organismes de même tranche d'âge pour les essais ultérieurs.

#### IV.5. Essais d'écotoxicité

Les essais d'écotoxicité ont consisté à déterminer les effets de la contamination des sols :

- sur la survie des vers de terre après 14 jours d'exposition, suivant le protocole normalisé au niveau international ISO 11268-1 (1993),
- sur la reproduction des vers de terre après 28 jours (cocons) et 56 jours (juvéniles) d'exposition (figure 9), suivant le protocole normalisé au niveau international ISO 11268-2 (1998).

Les essais sur la survie et la reproduction des vers de terre exposés aux échantillons de sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM) ont été réalisés avant cette étude par Eom *et al.* (2007).

Les concentrations testées pour les essais de survie et de reproduction des vers, exposés aux échantillons de sol, brut (sol NM) et thermodésorbé (sol NMDT), de la cokerie de Neuves-Maisons ont été les suivantes :

**0%, 10%, 50%, 75%, 100% de sol contaminé dans le milieu d'essai ISO (% w/w).**

Le milieu d'essai ISO est un substrat artificiel composé (en pourcentage de matière sèche):

- de tourbe finement moulue (10%)
- d'argile kaolinique (20%)
- de sable de Fontainebleau (70%)

La provenance et les caractéristiques de la tourbe sont détaillées en Annexe 4.

Pour assurer des conditions d'exposition comparables entre les différents traitements, le pH des sols a été ajusté dans la gamme de neutralité (6.5-7.0) à l'aide de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) à raison de 0.5% (pour les concentrations 0% et 10% de sol contaminé) et de 0.37% (pour les concentrations 50% et 75% de sol contaminé). Le pH des différents substrats testés a été mesuré au début et à la fin des expérimentations suivant le protocole normalisé au niveau international ISO 10390 (1994). Le substrat a été humidifié avec de l'eau déminéralisée jusqu'à atteindre au maximum 60% de sa capacité de rétention en eau totale (% CRE), déterminée conformément au protocole normalisé au niveau international ISO 11274 (1998). Les récipients ont été placés dans une chambre climatisée à une température moyenne de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  avec un cycle jour/nuit 16/8 heures et un éclairage lumineux compris entre 400-800 lux.

#### **IV.5.1. Essais sur la survie des vers de terre**

Les essais de survie ont été réalisés à la fois :

- sur des vers adultes, âgés de moins d'un an, d'un poids compris entre 300 et 600 mg et caractérisés par la présence d'un clitellum bien développé au niveau des segments 25-30 (figure 9).
- sur des vers juvéniles (figure 9), âgés de six semaines maximum, d'un poids total (10 individus) de 50 mg. La sélection de vers de terre d'âge similaire est possible du fait de la synchronisation de l'élevage du laboratoire LIEBE. Des cocons sont isolés et placés dans un container individuel contenant le même substrat que celui de l'élevage des vers adultes durant six semaines. Les vers nouvellement formés sont ensuite pesés et utilisés pour l'essai de survie.

Pour chaque concentration testée, quatre réplicats ont été effectués. Dix vers de terre par réplicat sont placés dans un cristalliseur en verre borosilicaté de 1 litre, contenant 500 g de substrat humidifié. Le contenu en eau est réajusté chaque semaine. Pour l'essai de survie des vers juvéniles, 200 g de substrat humidifié sont suffisants. Pour éviter la fuite des vers de terre du milieu d'exposition, les cristalliseurs sont recouverts d'un film alimentaire transparent, percé de dix trous fins ( $\varnothing 1 \text{ mm}$ ) pour permettre une aération. Après 14 jours d'exposition, les vers vivants sont sortis à la main du récipient d'essai et le pourcentage de survie est déterminé. Les vers de terre sont considérés vivants s'ils réagissent à une piqûre d'épingle appliquée au

niveau de la partie antérieure lorsqu'ils sont immobiles. La biomasse des vers est également mesurée avant et après la durée d'exposition.

#### **IV.5.2. Essais sur la reproduction des vers de terre**

Les essais de reproduction des vers de terre ont été réalisés suivant un protocole similaire à celui décrit précédemment. Après avoir été pesés, les vers de terre adultes (dix vers de terre par réplicat) sont exposés durant 28 jours aux différentes concentrations de sol contaminé dans le milieu d'essai ISO. Chaque semaine, 5 g de crottin de cheval séché, tamisé et exempt de toute trace de pollution est ajouté par récipient d'essai. Après 28 jours d'exposition, les vers de terre adultes sont sortis à la main. La biomasse ainsi que le pourcentage de survie des vers de terre sont déterminés. Les cocons produits durant cette période d'exposition sont également sortis à la main et comptabilisés. Les cocons sont ensuite remis dans le milieu d'essai pour une durée de 28 jours. Chaque semaine, 1 g de crottin est ajouté par récipient d'essai. A la fin de l'expérimentation (56 jours), les cocons éclos et non éclos ainsi que les vers juvéniles sont sortis à la main du milieu d'essai. Le pourcentage d'éclosion des cocons ainsi que le nombre de juvéniles produits est déterminé.

#### **IV.5.3. Critères d'écotoxicité des sols**

Pour chaque critère mesuré (survie adultes/juvéniles – 14 jours, production de cocons – 28 jours, production de juvéniles – 56 jours), les paramètres suivants ont été déterminés :

- la concentration de sol contaminé dans le milieu d'essai ISO (% w/w) qui provoque une inhibition de 10% (CE<sub>10</sub>) et 50% (CE<sub>50</sub>) du critère mesuré par rapport aux vers exposés au milieu d'essai témoin.
- la plus forte concentration testée de sol contaminé dans le milieu d'essai ISO (% w/w) qui n'induit pas d'inhibition significative du critère mesuré par rapport aux vers du milieu témoin (CSEO ou NOEC).
- la plus faible concentration testée de sol contaminé dans le milieu d'essai ISO (% w/w) qui induit une inhibition significative du critère mesuré par rapport aux vers du milieu témoin (LOEC).



Les valeurs de CE<sub>10</sub> et CE<sub>50</sub> ont été déterminées à partir de la macro Regtox, développée sous Excel, par Eric Vindimian du MEEDDM et disponible à l'adresse suivante : [http://eric.vindimian.9online.fr/fr\\_download.html](http://eric.vindimian.9online.fr/fr_download.html).

#### **IV.5.4. Validité des essais**

Les différents critères de validité des essais de survie et de reproduction ont été respectés :

- un pourcentage de mortalité des vers adultes du milieu témoin inférieur à 10%
- une perte moyenne de biomasse des vers adultes du milieu témoin inférieure à 20%
- une concentration en chloroacétamide (produit toxique de référence) dans le milieu ISO comprise entre 20 et 80 mg/kg de sol sec, responsable d'une inhibition de 50% de la survie des vers adultes (ISO 11268-1, 1993) - CL<sub>50</sub> calculée = 44 mg chloroacétamide/kg de sol sec
- une production de juvéniles par réplicat après 56 jours d'exposition au milieu témoin supérieure à 30
- un coefficient de variation de la production de juvéniles après 56 jours d'exposition au milieu témoin inférieur à 30% (entre les réplicats)
- une concentration en bénomyl (produit toxique de référence) comprise entre 5 et 20 mg/kg de sol sec dans le milieu ISO, responsable d'une inhibition significative de la production de juvéniles après 56 jours d'exposition (ISO 11268-2, 1998) – LOEC mesurée = 5 mg bénomyl/kg de sol sec .

### **IV.6. Essais de génotoxicité**

#### **IV.6.1. Exposition des vers**

Le protocole d'exposition des vers de terre lors des essais de génotoxicité est similaire à celui décrit précédemment (cf section IV.5.). Des vers de terre adultes, âgés de 12-15 mois, d'un poids homogène compris entre 300 et 600 mg, ont été exposés pendant 4 et 10 jours à différentes concentrations de sol contaminé dans le milieu d'essai ISO.

Pour le sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM), les concentrations testées ont été les suivantes :

**0%, 10%, 20% et 40% de sol contaminé dans le milieu d'essai ISO (% w/w)**

Pour le sol de la cokerie de Neuves-Maisons brut (sol NM) et thermodésorbé (sol NMDT), les concentrations testées ont été les suivantes :

**0%, 50%, 75% et 100% de sol contaminé dans le milieu d'essai ISO (% w/w)**

La mesure des dommages à l'ADN par l'essai comet a été réalisée sur 10 individus par concentration d'exposition testée quel que soit le sol de cokerie testé (10%, 20% et 40% pour le sol HOM ; 50%, 75% et 100% pour les sols NM et NMDT). Pour certains traitements, neuf individus seulement ont été analysés, du fait qu'un individu n'a pas donné un nombre suffisant de cellules pour permettre un tel essai. Des répétitions ont été effectuées pour plusieurs traitements, portant le nombre total d'individus testés par concentration à 18.

La génotoxicité a été mesurée en parallèle chez des individus témoins. Il nous a semblé préférable d'étudier systématiquement lors de chaque expérimentation la génotoxicité chez les individus témoins pour garantir la validité de nos résultats au cours du temps. Cette répétition des mesures explique le plus grand nombre de données obtenues chez les individus témoins par rapport aux individus exposés aux sols contaminés. La génotoxicité a été mesurée chez des individus témoins exposés pendant 4 (t4) et 10 (t10) jours au milieu d'essai ISO et chez des individus témoins du milieu d'élevage (t0).

Les dommages à l'ADN ont été mesurés chez 15 individus témoins lors de la 1<sup>ère</sup> étude de génotoxicité – sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM).

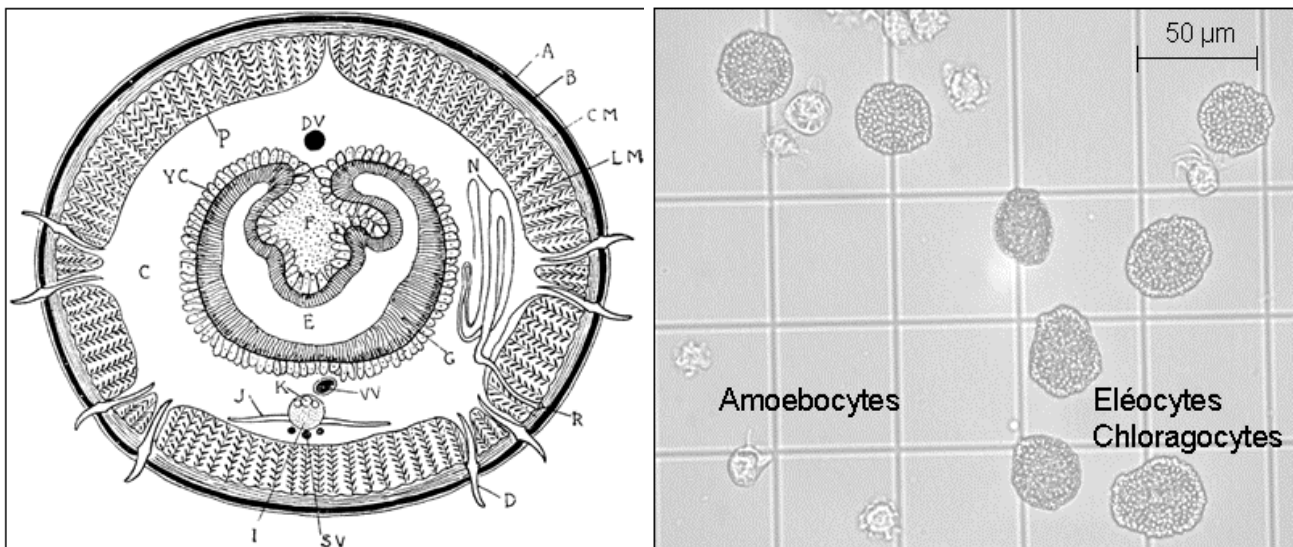
Les dommages à l'ADN ont été mesurés chez une quarantaine d'individus témoins lors de la 2<sup>nde</sup> étude de génotoxicité – sol brut (sol NM) ou thermodésorbé (sol NMDT) de la cokerie de Neuves-Maisons.

#### **IV.6.2. Récupération des coelomocytes de vers de terre**

Après exposition, les vers de terre sont récupérés puis lavés avec une solution de PBS (0.01 M, sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7.4) à 4°C. La partie terminale de l'organisme est délicatement massée afin d'éliminer la matière fécale du tube digestif, susceptible de contaminer la suspension cellulaire.

Les vers sont ensuite placés individuellement dans des tubes en polypropylène de 50 mL contenant 3 mL d'une solution de PBS (0.01 M, sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , pH 7.4) à 4°C. Les coelomocytes sont récupérés par une stimulation électrique non invasive des vers de terre, d'après un protocole modifié de Roch (1979). Le liquide coelomique contenant les coelomocytes est extrudé à travers les pores de l'épithélium par la contraction des muscles longitudinaux du ver de terre (figure 10). Trois stimulations de 5 secondes, à l'aide d'une pile électrique de 9 Volts, permettent de récupérer un nombre suffisant de cellules pour l'essai comet. Les cellules sont ensuite conservées à 4°C, à l'obscurité.

Les suspensions cellulaires obtenues sont dénombrées en microscopie optique ( $G \times 400$ ) sur cellule de Malassez (figure 10). La viabilité des cellules est déterminée à l'aide du test d'exclusion au bleu trypan (0.5% w/v). Les suspensions cellulaires dont le pourcentage de viabilité est inférieur à 90% sont écartées afin de ne pas induire de faux-positifs dans l'essai comet.



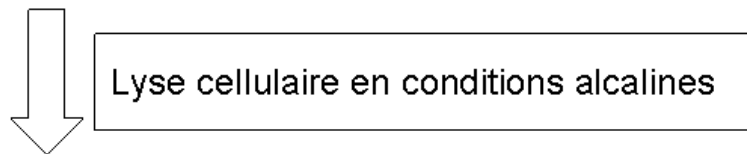
Légende figure (gauche) : A : cuticle ; B : epidermis ; CM : circular muscles ; LM : longitudinal muscles ; D : seta ; C : coelom ; YC : yellow cells ; F : typhlosole ; VV : supra-neural blood vessel ; SV : sub-neural vessel ; DV : dorsal vessel ; P : peritoneum ; E : cavity of gut ; G : endodermic lining of gut ; N : part of a nephridium ; R : opening of a nephridium ; I : the nerve-cord ; J : a nerve given off ; K : giant fibres in the nerve-cord.

**Figure 10 :** Coupe transversale (gauche) de ver de terre (source internet : [http://etc.usf.edu/clipart/47900/47924/47924\\_earthworm\\_lg.gif](http://etc.usf.edu/clipart/47900/47924/47924_earthworm_lg.gif)) et photographie (droite) de coelomocytes (de type amœbocytes ou élécocytes/chloragocytes) sur cellule de Malassez (Grossissement  $\times 400$ ).

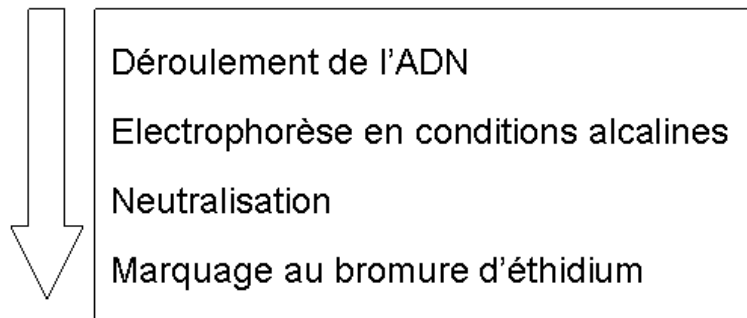
#### IV.6.3. Test Comet ou *Single-Cell Gel Electrophoresis assay* (SCGE)

Le test Comet ou *Single-Cell Gel Electrophoresis Assay* (SCGE) est une technique d'électrophorèse de nucléoïdes isolés en microgels d'agarose qui permet en condition alcaline ( $\text{pH} > 13$ ) la détection des cassures simple et double brins ainsi que l'expression des sites alcali-labiles de la molécule d'ADN. Le protocole suivant (figure 11) est inspiré des travaux de Singh *et al.* (1988). La composition des différents tampons et solutions mères utilisés pour cet essai est détaillée dans l'Annexe 5. Un standard interne (ou témoin positif) a été utilisé lors des essais de génotoxicité : celui-ci consiste en une exposition *in vitro* des coelomocytes à une solution de peroxyde d'hydrogène (25  $\mu\text{M}$ , 1 heure à 4°C et à l'obscurité). Le protocole suivant se déroule sous une lumière inactinique pour ne pas induire de dommages artéfactuels à la molécule d'ADN.

Cellules incluses dans le gel

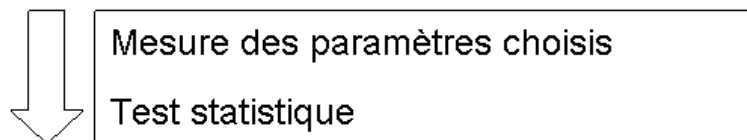


Nucléoïdes inclus dans le gel



Lecture des lames

(comètes / analyse d'image)



Interprétation - génotoxicité

**Figure 11:** Les différentes étapes du test Comet ou *Single-Cell Gel Electrophoresis assay*

#### IV.6.3.1. Dépôt des gels sur la lame

Les gels sont déposés sur la lame microscopique dans l'ordre suivant :

1<sup>ère</sup> couche : 80  $\mu$ L d'un gel d'agarose NMP (0.8%, w/v) dans une solution de PBS (0.01M, pH 7.4, sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) à une température supérieure à 80°C sont déposés la veille du test à l'aide d'un cône de micropipette. La polymérisation se fait à température ambiante. Cette opération permet une meilleure adhérence des cellules sur la préparation.

2<sup>ème</sup> couche : 90  $\mu$ L d'un mélange à volume égal, de la suspension cellulaire obtenue et d'un gel d'agarose LMP (1%, w/v) dans une solution de PBS (0.01M, pH 7.4, sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) sont déposés et recouvert d'une lamelle microscopique. La polymérisation se fait sur une plaque à 4°C durant 10 minutes pour assurer une parfaite polymérisation des gels. La lamelle est ensuite retirée délicatement. Cette dilution au 1/2 permet une visualisation optimale et un comptage aisé des comètes (absence de chevauchement des nucléoïdes) lors de la lecture des lames microscopiques.

3<sup>ème</sup> couche : 90  $\mu$ L d'un gel d'agarose LMP (0.5%, w/v) dans une solution de PBS (0.01M, pH 7.4, sans  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) sont déposés sur la lame microscopique puis recouvert d'une lamelle. La polymérisation se fait à 4°C durant 10 minutes. La lamelle est ensuite retirée délicatement.

*N.B. : Les solutions d'agarose bas point de fusion (LMP) sont maintenues à 37°C dans un bain-marie.*

#### IV.6.3.2. Lyse cellulaire

Les lames microscopiques sont ensuite plongées durant 2 heures dans une solution de lyse, maintenue à 4°C, afin de détruire la matrice extracellulaire et la membrane nucléaire. La solution de lyse est constituée de 2.5 M de NaCl, 100 mM de  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 mM de Tris (pH ajusté à 10 avec une solution de NaOH à 10 N) et 1% (w/v) de *N*-laurylsarcosinate, à laquelle est rajoutée extemporanément 10% (v/v) de DMSO et 1% (v/v) de Triton X-100.

Le NaCl va participer à l'élimination du matériel extracellulaire ainsi qu'à la dégradation des protéines, dont les histones, ce qui va relaxer la molécule d'ADN. Le  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  inhibe les

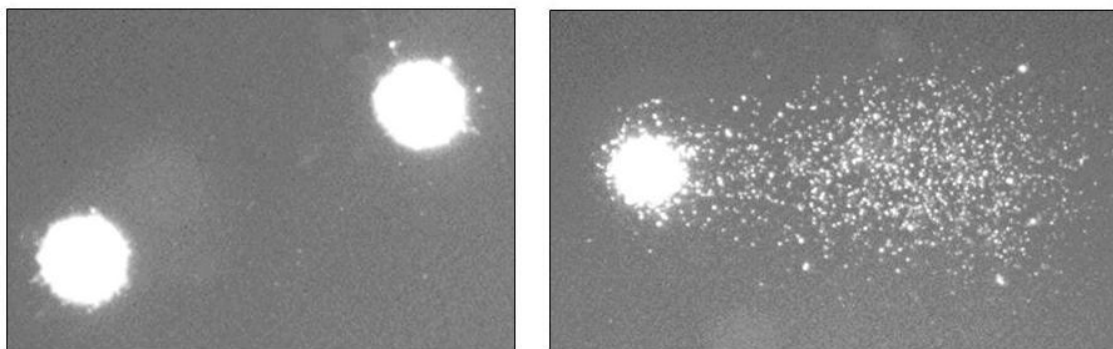
nucléases, enzymes qui dégradent la molécule d'ADN, en complexant les cofacteurs métalliques. Le NaOH et le Tris assurent les conditions alcalines. Le *N*-laurylsarcosinate inhibe les hexokinases et solubilise les protéines membranaires. Le DMSO est un antioxydant qui prévient la formation des radicaux libres de l'oxygène (ROS) pouvant endommager la molécule d'ADN. Le Triton X-100 est un détergent qui va assurer la perméabilisation des membranes cellulaires et nucléaires.

#### IV.6.3.3. Déroulement de l'ADN

Les lames microscopiques sont ensuite égoutées, rincées pendant 5 minutes dans le tampon d'électrophorèse frais, puis déposées dans la cuve électrophorétique. Le tampon d'électrophorèse est constitué de 300 mM de NaOH et 1 mM de Na<sub>2</sub>EDTA (pH 13). Le déroulement de l'ADN se fait durant 30 minutes. Le pH basique du tampon d'électrophorèse va rompre les liaisons hydrogènes entre les deux brins de la molécule d'ADN, qui va passer d'une forme bicaténaire à une forme monocaténaire. L'alcalinité du tampon permet la détection des cassures simple-brin ainsi que l'expression des sites alcali-labiles, des conditions neutres ne permettant que la détection des cassures double-brins.

#### IV.6.3.4. Electrophorèse

L'électrophorèse est réalisée durant 15 minutes à un voltage fixe de 20 V et une intensité de 300 mA. Les fragments libres de la molécule d'ADN et les molécules rattachées à la matrice nucléaire mais libres de migrer, vont diffuser dans le gel d'agarose vers l'anode du fait de la charge négative des groupements phosphates associés. Cette migration donne une figure caractéristique de comètes, plus ou moins longue selon l'intensité des dommages (figure 12).



**Figure 12** : ADN intact (à gauche) et ADN endommagé (à droite) de coelomocytes de vers de terre, donnant une figure caractéristique de comète (Photographie : Marc Bonnard).

#### IV.6.3.5. Neutralisation

Les lames microscopiques sont ensuite égoutées puis plongées dans une solution de neutralisation (0.4 M de Tris, pH 7.5) durant 10 minutes. Cette étape est renouvelée une fois. La neutralisation est une étape importante pour la lecture des lames. Elle permet un réappariement partiel des brins de la molécule d'ADN et élimine les alcalins et les détergents susceptibles d'interférer avec la fixation du bromure d'éthidium, fluorochrome intercalant utilisé dans cette étude.

#### IV.6.3.6. Déshydratation des lames (étape facultative)

Les lames sont ensuite déshydratées durant 5 minutes dans une solution d'éthanol absolu. Les lames sont conservées à l'obscurité et à l'abri de la poussière jusqu'à l'étape de lecture.

#### IV.6.3.7. Lecture des lames

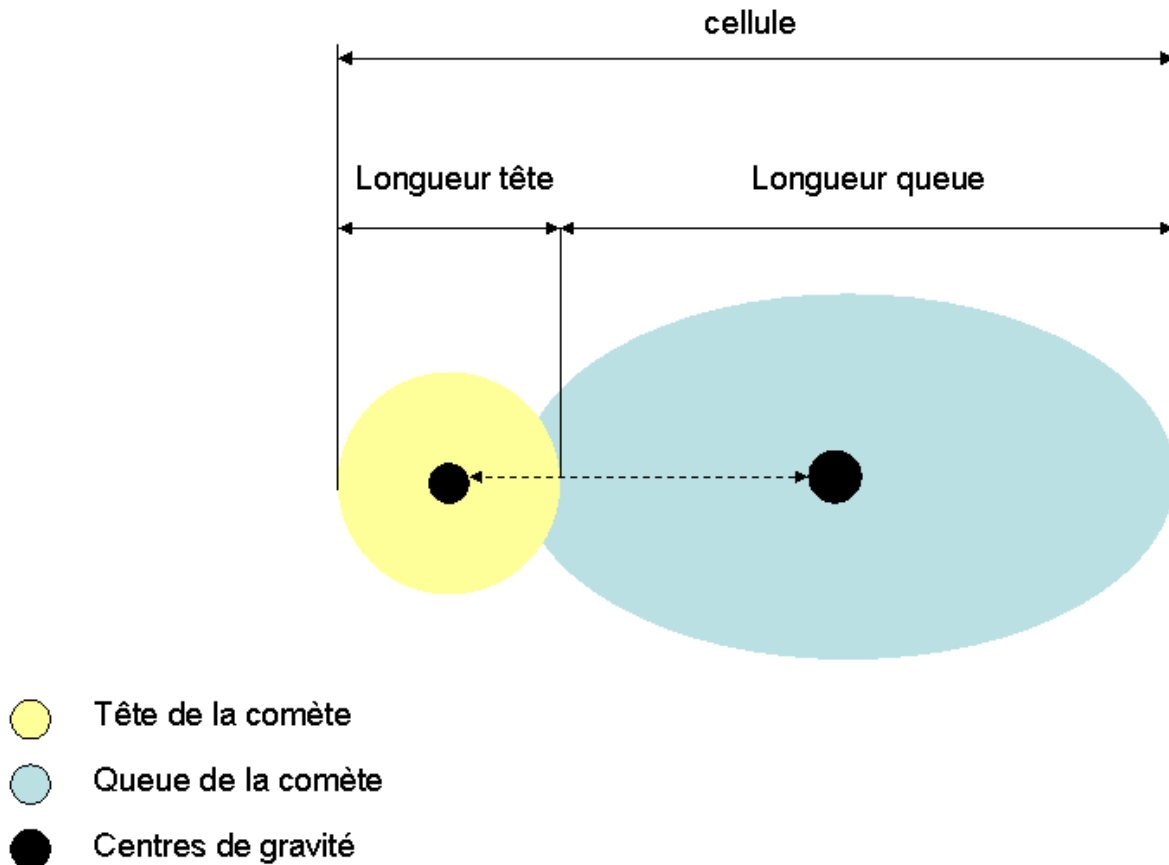
Les nucléoïdes sont colorés par 30 µL d'une solution de bromure d'éthidium (BeT) à une concentration de 20 µg/mL. La structure plane, de type phénanthridinique permet l'intercalation de ce fluorochrome entre les bases de l'ADN. Une lamelle est déposée sur la lame microscopique. La lecture est réalisée à l'aide d'un microscope (BX 60 Olympus) à épifluorescence, équipé d'un filtre dichroïque DM 570 (filtre d'excitation : BP 510-550 nm ; filtre barrière : BA 590 nm) relié à l'analyseur d'images par une caméra.

Durant ma thèse, l'équipement a été rénové. Le logiciel d'analyse d'images *Komet 3.1* (Kinetic Imaging Limited, Liverpool, UK) a été remplacé par le logiciel *Comet Assay IV*, (Perceptive Instruments, Steeple Bumpstead, Haverhill, Suffolk, UK).

Pour chaque individu, deux lames ont été réalisées. Les lames sont ensuite codées. Sur chaque lame, 50 nucléoïdes sont lus « en aveugle » sur la partie centrale du gel d'agarose.

#### IV.6.3.8. Expression des résultats et tests statistiques

Les logiciels d'analyse d'images permettent de caractériser à l'aide de plusieurs paramètres les comètes formées (figure 13).



**Figure 13 :** Représentation schématique d'une comète et des différents paramètres de mesure.

Les principaux paramètres étudiés sont :

- ✓ *% Tail DNA* : Pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (ADN endommagé)
- ✓ *Tail Length* : Longueur de la queue de la comète
- ✓ *Extent Tail Moment* : Produit du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète  $\times$  Longueur de la queue de la comète
- ✓ *Olive Tail Moment* : Produit du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète  $\times$  la distance séparant le centre de gravité de la tête de la comète de celui de la queue.

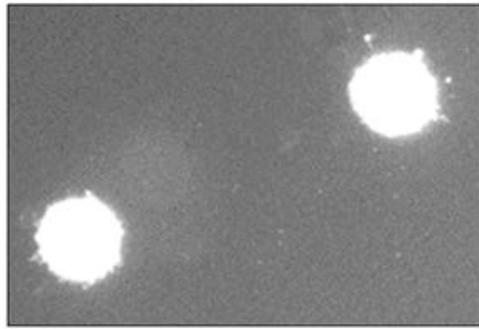


Nous avons choisi d'utiliser le pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (*% Tail DNA*) pour exprimer la génotoxicité. Ce paramètre de mesure permet de mieux se rendre compte des dommages occasionnés à la molécule d'ADN. Les autres paramètres (*Tail Length*, *Extent* ou *Olive Tail Moment*) sont exprimés en fonction de la distance de migration (en  $\mu\text{m}$ ). Ces paramètres sont également dépendantes des conditions électrophorétiques qui influencent la distance de migration des fragments endommagés. Le *% Tail DNA* est le paramètre recommandé par le *4th International Workshop on Genotoxicity testing* pour décrire les dommages à l'ADN dans les études réglementaires (Burlinson *et al.*, 2007; Kumaravel *et al.*, 2009).

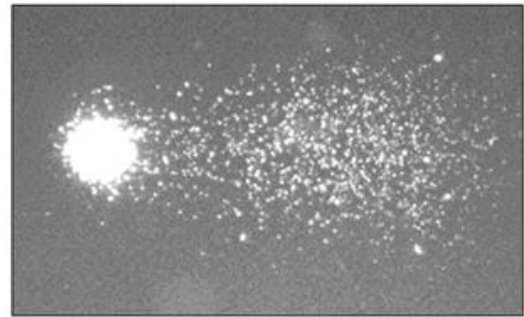
Les dommages à l'ADN ont été exprimés de deux façons :

- Par l'expression du Tail DNA moyen (moyenne des valeurs de Tail DNA des 100 nucléoïdes lus par individu). La comparaison des moyennes entre les différents traitements a été effectuée à l'aide d'une ANOVA (à un ou plusieurs facteurs) suivie d'un test post-hoc de comparaison multiple (HSD Tukey test ou LSD Fisher test) sur les données normalisées par une transformation logarithmique. La normalité des données ainsi que l'homogénéité des variances ont été vérifiées par les tests de Shapiro-Wilk et de Bartlett, respectivement.
- Par la distribution des nucléoïdes, en fonction des valeurs de Tail DNA, et suivant différentes classes de dommages à l'ADN définies par Lemièrre *et al.* (2005) : Classe 0 (%Tail DNA : 0%-20%) – cellule intacte ; Classe 1 (%Tail DNA : 20%-40%) – cellule faiblement endommagée ; Classe 2 (40%-60%) – cellule endommagée ; Classe 3 (%Tail DNA : 60%-80%) – cellule fortement endommagée ; Classe 4 (%Tail DNA : >80%) – cellules mortes ou moribondes (figure 14, page 71). La comparaison des classes de dommages entre les différents traitements a été effectuée à l'aide du test du  $\text{Chi}^2$ .

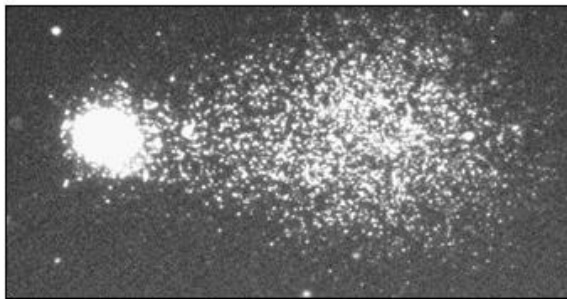
L'analyse statistique a été réalisée à l'aide des logiciels Statistica 6.0 et Excel 9.0.



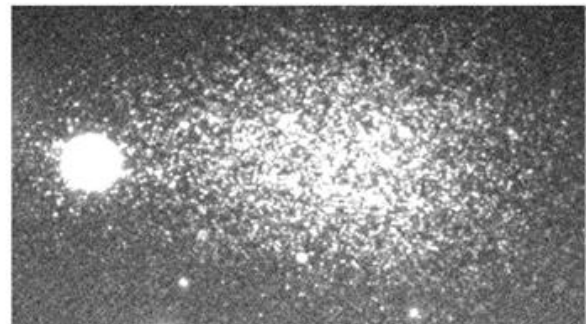
Classe 0 (0%-20%)  
ADN intact



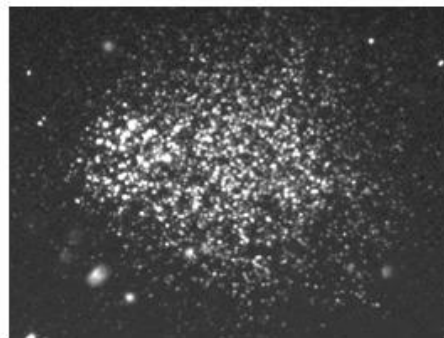
Classe 1 (20%-40%)  
ADN faiblement endommagé



Classe 2 (40%-60%)  
ADN endommagé



Classe 3 (60%-80%)  
ADN fortement endommagé



Classe 4 (> 80%)  
cellules moribondes

**Figure 14:** Les différentes classes de dommages à l'ADN des coelomocytes de vers de terre, en fonction des valeurs de % Tail DNA.

# *Résultats*

# Résultats

## *1ère Partie : Ecotoxicité des sols*

### Article 1

#### **BIOAVAILABILITY OF CHEMICAL POLLUTANTS IN CONTAMINATED SOILS AND PITFALLS OF CHEMICAL ANALYSES IN HAZARD ASSESSMENT**

P. VASSEUR<sup>1</sup>, M. BONNARD<sup>1</sup>, F. PALAIS<sup>1</sup>, I. C. EOM<sup>1</sup> and J. L. MOREL<sup>2</sup>

<sup>1</sup> CNRS UMR 7146, Lab. Interactions, Ecotoxicology, Biodiversity, Ecosystems - University of Metz, rue Delestraint, 57070 Metz, France

<sup>2</sup> UMR 1120 INPL(ENSAIA)/INRA, avenue de la forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre-les-nancy Cedex, France

*Environmental Toxicology, 2008, Volume 23, Issue 5, pages 652-656*

**Le but de cette première étude était de comparer l'écotoxicité vis-à-vis des organismes terrestres des deux sols de cokerie, qui présentent un degré de contamination chimique proche : le sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM, noté dans l'article sol A) et le sol de la cokerie de Neuves-Maisons (sol NM, noté dans l'article sol B).**

Les caractéristiques physico-chimiques des sols contaminés sont présentées dans le tableau I (page 73). Les polluants majoritaires dans les sols sont notés en gras. Le sol HOM est essentiellement contaminé en HAP ( $\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 2634 \pm 241 \text{ mg/kg}$ ). Cette concentration en HAP est environ 50 fois supérieure à la concentration de référence qui est de 50 mg/kg dans les sols naturels. Le sol NM a une concentration en HAP proche ( $\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 1539 \pm 314 \text{ mg/kg}$ ) de celle du sol HOM, et est environ 30 fois supérieure à la valeur de référence. Le sol NM présente une contamination métallique beaucoup plus importante que le sol HOM.

**Tableau I :** Caractéristiques physico-chimiques, concentrations en polluants (mg/kg poids sec) et toxicité vis-à-vis des organismes terrestres des sols contaminés A (sol HOM) et B (sol NM).

	Références régionales	Sol A (HOM)			Sol B (NM)	Données Littérature <sup>b,c</sup>	
		Valeurs <sup>a</sup>	100% (1)	74% (2)	8% (3)	100% (4)	Vers de terre
						CL <sub>50</sub>	CE <sub>50</sub>
<b>Granulométrie sols</b>							
Argile (%)		10,7				12,8 ± 0,2	
Limon (%)		23,9 ± 1,5				23,8 ± 2,4	
Sable (%)		64,8 ± 1,7				63,3 ± 2,2	
pH (H <sub>2</sub> O)		9,5 ± 0,05				7,1 ± 0,3	
Matière Organique (%)		17,3 ± 0,2				12,5 ± 0,4	
Carbone Organique Total (%)		10,0 ± 0,1				7,3 ± 0,3	
<b>Métaux lourds (Moy ± ET)</b>							
Cd	2-5	6,7 ± 0,6	5	0,5	<b>2,2 ± 0,2</b>	> 300 <sup>b</sup>	46 <sup>b</sup>
Cr	80-500	54 ± 0,9	40	4,3	<b>346 ± 24</b>		
Cu	15-50	26 ± 0,6	19	2,1	<b>104,5 ± 8</b>	683 <sup>b</sup>	53 <sup>b</sup>
Hg	0,5-2	12 ± 0,3	9	0,9	<b>4,0 ± 0,7</b>		
Pb	25-100	120 ± 4	89	9,6	<b>669 ± 26</b>	4480 <sup>b</sup>	1940 <sup>b</sup>
Zn	120-500	347 ± 6	257	28	<b>2647 ± 143</b>	1010 <sup>b</sup>	276 <sup>b</sup>
Ni	30-100	23 ± 0,3	17	1,8	<b>155 ± 91</b>		
<b>HAP (Moy ± ET)</b>							
Naphtalene		<b>5,9 ± 0,2</b>	4,4	0,5	<b>31 ± 5</b>		
Acenaphtylene		<b>4,6 ± 0,3</b>	3,4	0,4	<b>1,7 ± 0,2</b>		
Acenaphtene		<b>46 ± 4</b>	34	3,7	<b>84 ± 58</b>		
Fluorene		<b>103 ± 9</b>	76	8,2	<b>59 ± 25</b>	69 <sup>c</sup>	
Phenanthrene		<b>380 ± 46</b>	281	30	<b>173 ± 55</b>	134 <sup>c</sup>	
Anthracene		<b>186 ± 39</b>	138	15	<b>62 ± 10</b>		
Fluoranthene		<b>561 ± 49</b>	415	45	<b>260 ± 55</b>	416 <sup>c</sup>	
Pyrene		<b>379 ± 28</b>	280	30	<b>203 ± 35</b>	155 <sup>c</sup>	
Benzo[a]anthracene		<b>230 ± 19</b>	170	18	<b>125 ± 18</b>		
Chrysene		<b>196 ± 16</b>	145	16	<b>108 ± 13</b>		
Benzo[b]fluoranthene		<b>146 ± 8</b>	108	12	<b>107 ± 15</b>		
Benzo[k]fluoranthene		<b>89 ± 6</b>	66	7	<b>63 ± 8</b>		
Benzo[a]pyrene		<b>145 ± 8</b>	107	12	<b>107 ± 14</b>		
Dibenzo[ah]anthracene		<b>15 ± 0,8</b>	11	1,2	<b>12 ± 2</b>		
Benzo[ghi]perylene		<b>65 ± 3</b>	48	5,2	<b>66 ± 7</b>		
Indeno[1,2,3-cd]pyrene		<b>82 ± 5</b>	61	6,6	<b>77 ± 11</b>		
<b>Σ16 HAP</b>	<b>50</b>	<b>2634 ± 241</b>	1949	211	<b>1539 ± 314</b>		
<i>E. fetida</i>	Survie -14 j	100%	50%		0%		
	Inhibition reproduction -56 j	100%		50%	46%		
<i>F. candida</i>	Inhibition reproduction -28 j	100%			0%		
<i>B. chinensis</i>	Inhibition croissance -17 j	85%			10%		

Concentrations calculées de polluants dans le sol HOM (sol A) correspondent aux valeurs de CE<sub>50</sub> sur la survie (74%)<sup>(2)</sup> et la reproduction (8%)<sup>(3)</sup> des vers de terre. L'écotoxicité a été estimée sur les plantes supérieures (*Brassica chinensis*), les vers de terre (*Eisenia fetida*) et les collemboles (*Folsomia candida*).

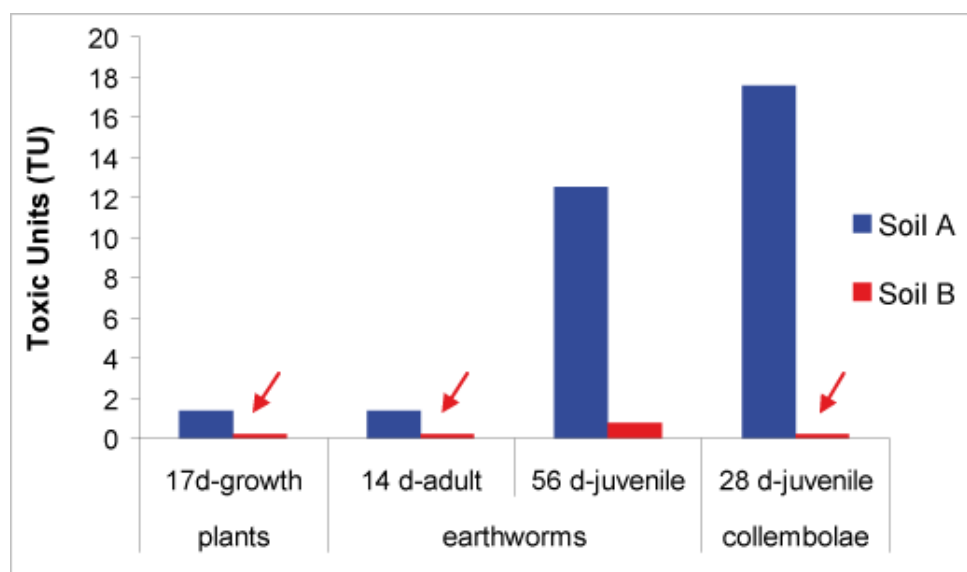
<sup>a</sup> Darmendrail *et al.*, 2000

<sup>b</sup> Spurgeon *et al.*, 1994

<sup>c</sup> Sverdrup *et al.*, 2002a

L'écotoxicité des sols a été étudiée chez deux invertébrés terrestres : le ver de terre *Eisenia fetida*, avec les tests de survie (14 jours) et de reproduction (56 jours), et le collembole *Folsomia candida* avec le test de reproduction (28 jours). L'écotoxicité des sols sur la croissance (17 jours) de végétaux supérieurs – le chou chinois *Brassica chinensis*, la laitue *Lactuca sativa* et l'avoine *Avena sativa* – a également été étudiée. Ces bioessais ont été réalisés en accord avec les protocoles normalisés au niveau international. L'analyse de l'écotoxicité chez des organismes variés, appartenant à différents niveaux trophiques, permet une meilleure évaluation du risque potentiel représenté par les polluants des sols. Dans cette étude, nous avons tenté de relier les réponses biologiques avec les résultats de l'analyse physico-chimique des polluants des sols (HAP et métaux lourds).

**Malgré une contamination chimique relativement similaire, les sols étudiés ont montré des profils d'écotoxicité vis-à-vis des organismes terrestres totalement différents (figure 1 et tableau I).**



**Figure 1:** Toxicité des sols A (sol HOM) et B (sol NM) exprimée en Unités Toxiques (TU = 100/CE<sub>50</sub>) sur la croissance des plantes supérieures (*Brassica chinensis*), sur la mortalité et la reproduction des vers de terre (*Eisenia fetida*) et sur la reproduction des collemboles (*Folsomia candida*). Les échantillons non toxiques sont indiqués par une flèche.

**Seul le sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM ou A), essentiellement contaminé en HAP, s'est avéré toxique pour les organismes terrestres. La contamination chimique du sol**

HOM a inhibé la survie ( $CL_{50} = 74\%$ ) et la reproduction ( $CE_{50} = 8\%$ ) des vers de terre adultes *Eisenia fetida*. La reproduction des collemboles, qui s'est révélée être le paramètre le plus sensible, a également été inhibée après 28 jours d'exposition ( $CE_{50} = 5.7\%$ ), de même que la croissance des plantes supérieures après 17 jours.

**Le sol de la cokerie de Neuves-Maisons (sol NM ou B), malgré une contamination en HAP analogue à celle du sol HOM et une contamination métallique plus importante, n'a montré aucune sinon une très faible écotoxicité** (figure 1). Le sol NM n'a montré aucune toxicité vis-à-vis de la survie des vers de terre *Eisenia fetida*, de la reproduction des collemboles et de la croissance des végétaux supérieurs. Seule la reproduction des vers de terre adultes *Eisenia fetida* a été faiblement inhibée (46% d'inhibition).

L'écotoxicité du sol de la cokerie de Neuves-Maisons traité par thermodésorption (sol NMDT) n'a pas été détaillée dans le présent article. Des résultats similaires à ceux du sol non traité (sol NM) ont été obtenus, en regard de la survie et de la reproduction des vers de terre *Eisenia fetida*.

**Les différences d'écotoxicité observées dans cette étude seraient imputables à la biodisponibilité des polluants, qui est différente entre les deux sols de cokeries.** Les polluants du sol HOM seraient davantage biodisponibles vis-à-vis des organismes terrestres que les polluants du sol NM. Spurgeon *et al.* (1994) et Sverdrup *et al.* (2002a) ont montré une inhibition de la survie et de la reproduction des vers de terre exposés à des sols dopés en HAP (fluorène, phénanthrène, fluoranthène ou pyrène) ou en métaux lourds (Cd, Cu, Pb ou Zn), à des concentrations similaires voire inférieures à celles trouvées dans les sols de cokerie étudiés (tableau I). Du fait de la multi-contamination et des teneurs en polluants dans les sols étudiés, on aurait pu s'attendre à une toxicité beaucoup plus importante, notamment pour le sol NM. La biodisponibilité et la toxicité des polluants dans les sols contaminés ont tendance à diminuer au fur et à mesure que le temps de contact des polluants au sol augmente. Les résultats d'écotoxicité obtenus en condition dopée ne permettent pas de prédire l'écotoxicité des sols contaminés.

Cette étude a montré que l'analyse physico-chimique des polluants, qui ne prend pas en considération leur biodisponibilité, a tendance à surestimer le risque et la toxicité des sols anciennement contaminés. **L'utilisation d'une approche écotoxicologique, qui rend compte de la fraction biodisponible des polluants des sols, s'avère donc essentielle en complément de l'approche physico-chimique.**

## Short Communication

### **Bioavailability of Chemical Pollutants in Contaminated Soils and Pitfalls of Chemical Analyses in Hazard Assessment**

P. Vasseur,<sup>1</sup> M. Bonnard,<sup>1</sup> F. Palais,<sup>1</sup> I. C. Eom,<sup>1</sup> J. L. Morel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>CNRS UMR 7146, Lab. Interactions, Ecotoxicology, Biodiversity, Ecosystems, University of Metz, rue Delestraint, 57070 Metz, France

<sup>2</sup>UMR 1120 INPL(ENSAIA)/INRA, avenue de la forêt de Haye, 54505 Vandoeuvre les Nancy Cédex, France

Received 17 October 2007; revised 23 January 2008; accepted 16 April 2008

**ABSTRACT:** Decision-making for remediation of industrial wastelands are still based on the concentrations of pollutants of concern measured in soils. In this work, two soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and metals were investigated for their toxicity on earthworms (*Eisenia fetida*), collembolae (*Folsomia candida*), and higher plants (*Brassica chinensis*, *Lactuca sativa* and *Avena sativa*) in order to study the relationships between chemical contamination and biological effects. Although the level of contamination by PAHs was elevated and commensurate in the two soils, their toxicity profile was quite different. Soil A affected survival and reproduction of invertebrates and growth of higher plants. Surprisingly, soil B, heavily contaminated by metals in addition to PAHs, was devoid of toxicity. Our results indicate that toxicity cannot simply be extrapolated from pollutant concentrations in a complex matrix in which bioavailability of pollutants may be reduced by ageing. Moreover, the use of toxicity data obtained from spiked soils characterized by readily bioavailable pollutants can also be called into question for such extrapolations. Predicting biological effects therefore requires biological tools to avoid any erroneous conclusions that can be drawn from sole extrapolation of analytical results. © 2008 Wiley Periodicals, Inc. *Environ Toxicol* 23: 652–656, 2008.

**Keywords:** bioassays; ecotoxicity; polycyclic aromatic hydrocarbons; metals; risk assessment

## INTRODUCTION

Management of industrially-contaminated soils is a major concern of most developed countries which are faced with the problem of historical contamination. Large efforts are needed to deal with industrial wastelands generated by past activities such as coal and iron extraction, mining, cokerries and steel industries. An inventory of contaminated sites has

been undertaken in Europe in view of their requalification. Remediation is generally decided on the basis of chemical analytical results that yield information on the presence of pollutants of concern and on their concentrations in soils. Although necessary as a first step in risk assessment, soil pollutant analyses do not take into consideration pollutant bioavailability. Hence, their relevance to predict the toxicity of complex environmental matrices remains a moot point (Hankard et al., 2005).

Bioavailability is a key factor influencing the ecotoxicity of pollutants in the environment and especially in soil compartments. The term “bioavailability” of soil pollutants refers to the fraction of a chemical that can be taken up or

Correspondence to: P. Vasseur; e-mail: vasseur@univ-metz.fr

Contract grant sponsors: Region Lorraine, ADEME, GISFI.

Published online 17 June 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI 10.1002/tox.20401

© 2008 Wiley Periodicals, Inc.



transformed by living organisms (Semple et al., 2003). Bioavailability in soil may be reduced with ageing, such that the readily available fraction of pollutants in a recently contaminated soil decreases with time of contact. The phenomenon of ageing and weathering of polluted soils has been observed by several authors, who demonstrated that contact time reduced bioavailability and degradability of PAHs in spiked soils (Hatzinger and Alexander, 1995; Alexander, 2000), as well as toxicity of PAH-contaminated soils to earthworms and/or plants (Tang et al., 1998; Stroo et al., 2000; Johnson et al., 2002; Joner et al., 2004; Smith et al., 2006) and toxicity of zinc in spiked soils to collembolae (Smit and Van Gestel, 1998).

Ecotoxicity of soils polluted by past activities is a matter of debate. Indeed, chemical analyses often indicate a high level of pollution. Moreover, it can be suspected that bioavailability of pollutants in soils of industrial wastelands has been reduced with ageing and that toxicity is not as high as expected. To address this question, we investigated the ecotoxicity of two soils sampled from an industrial wasteland A and an industrial site B, both polluted by former cokery activities in the North-East of France. These activities were terminated 30 years ago for A and about 15 years ago for B. Pollutants of concern were analyzed in the soil samples. Soil toxicity to terrestrial species was assessed and compared to calculations derived from pollutant concentrations in order to determine how they reflected genuine toxicity.

## METHODS

Ecotoxicity studies and analyses of metals and PAH contaminants were carried out in parallel on the same samples. The soil samples were collected and processed to insure representativity for each site studied. Two tons of soil was collected from each cokery site, following which they were mechanically homogenized and sieved at 4 mm. One hundred kilogram was sampled from each stock of soil. Then, several kilograms of the sieved soil were composited and carefully homogenized again.

The 16 PAH congeners listed as priority pollutants by the US-EPA were analyzed in the soil samples according to the standard methods (AFNOR XP X 33-012, 2000). The PAH extraction and separation by reversed high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with a spectrofluorimeter and a UV diode array detector was described by Eom et al. (2007). Metals in soils were analyzed with AAS (atomic absorption spectroscopy). Total organic carbon, pH, grain size, soil texture, and moisture content were also measured according to ISO standards by INRA, the National Institute of Agronomic Research ([www.inra.fr](http://www.inra.fr), Arras, France).

The soil samples analyzed were tested in parallel for their acute and chronic toxicity on terrestrial invertebrates and plants. Toxicity was assessed according to the ISO standard methods for effects on the earthworm *Eisenia fet-*

*ida*, the springtail *Folsomia candida* and the higher plants, *Lactuca sativa* (lettuce), *Avena sativa* L. (oat) and *Brassica chinensis* J., (Chinese cabbage) as described by Eom et al. (2007).

## RESULTS

The two soil samples analyzed were heavily contaminated by hydrocarbons, especially PAHs at concentrations around 2000 mg/kg dry weight of soil, largely above the reference values of 50 mg/kg for total hydrocarbons established in France (BRGM, 2007). Contamination by the 16 PAH congeners defined by US-EPA and physicochemical characteristics such as organic carbon content and organic matter were of the same level of magnitude in the two soil samples. Metal contamination was much higher in soil B than in soil A (Table I). Contamination by zinc, lead, and copper was quite elevated and by far above the maximum values that can be normally found at a regional level.

Soil A produced marked toxic effects on the invertebrate and plant species. It induced mortality for all earthworms and collembolae tested and totally inhibited their reproduction. In brief, the soil sample concentration in the test medium (expressed as % weight/weight) that decreased survival of *E. fetida* by 50% after 14 days was 74% (EC50-14 days), and that for reproduction after 56 days was 8% (EC50-56 days). EC10 and EC50 values determined following a 28-day collembolae *F. candida* reproduction assay were 3 and 5.7%, respectively. Germination of the two higher plants was not affected, but growth was inhibited as demonstrated by EC50 values of 27% on *L. sativa* L. and 26% on *B. chinensis* after 17 days of exposure. Toxicity expressed in toxic units (100/L(E)C50) is represented in Figure 1, where increasing bar height for each species tested is indicative of more elevated toxicity.

Results for soil B were quite different. Surprisingly, no toxic effects were observed for earthworm survival, collembolae reproduction or growth of the two plant species. Only earthworm reproduction was slightly affected, with a decrease in juvenile production of 46% after 56 days (Table I). Consequently, no EC50 value could be determined for any of the endpoints studied and toxic units were below 1 (Fig. 1).

## DISCUSSION

The toxicity of the two soils were quite different, notwithstanding their similar level of contamination by PAHs and the higher metal concentrations in the less toxic soil B. The physicochemical characteristics of the two soils are unable to explain their differing toxicity responses. Total organic carbon and organic matter, which are known to bind

**TABLE I. Physico-chemical characteristics, pollutant concentrations (in mg/kg dry weight) and toxicity to terrestrial species of the A<sup>(1)</sup> and B<sup>(4)</sup> PAH-contaminated soils studied**

	Regional Reference Value <sup>a</sup>	Soil A			Soil B	Literature Data <sup>b,c</sup> on Earthworms	
		100% (1)	74% (2)	8% (3)	100% (4)	LC <sub>50</sub>	EC <sub>50</sub>
Soil texture							
Clay (%)		10.7			12.8 ± 0.2		
Silt (%)		23.9 ± 1.5			23.8 ± 2.4		
Sand (%)		64.8 ± 1.7			63.3 ± 2.2		
pH (H <sub>2</sub> O)		9.5 ± 0.05			7.1 ± 0.3		
Organic matter (%)		17.3 ± 0.2			12.5 ± 0.4		
Total organic carbon (%)		10.0 ± 0.1			7.3 ± 0.3		
Heavy metals (mean ± sd)							
Cd	2–5	6.7 ± 0.6	5	0.5	2.2 ± 0.2	>300 <sup>b</sup>	46 <sup>b</sup>
Cr	80–500	54 ± 0.9	40	4.3	346 ± 24		
Cu	15–50	26 ± 0.6	19	2.1	104.5 ± 8	683 <sup>b</sup>	53 <sup>b</sup>
Hg	0.5–2	12 ± 0.3	9	0.9	4.0 ± 0.7		
Pb	25–100	120 ± 4	89	9.6	669 ± 26	4480 <sup>b</sup>	1940 <sup>b</sup>
Zn	120–500	347 ± 6	257	28	2647 ± 143	1010 <sup>b</sup>	276 <sup>b</sup>
Ni	30–100	23 ± 0.3	17	1.8	155 ± 91		
PAHs (mean ± sd)							
Naphthalene		5.9 ± 2	4.4	0.5	31 ± 5		
Acenaphthylene		4.6 ± 0.3	3.4	0.4	1.7 ± 0.2		
Acenaphthene		46 ± 4	34	3.7	84 ± 58		
Fluorene		103 ± 9	76	8.2	59 ± 25	69 <sup>c</sup>	
Phenanthrene		380 ± 46	281	30	173 ± 55	134 <sup>c</sup>	
Anthracene		186 ± 39	138	15	62 ± 10		
Fluoranthene		561 ± 49	415	45	260 ± 55	416 <sup>c</sup>	
Pyrene		379 ± 28	280	30	203 ± 35	155 <sup>c</sup>	
Benzo[a]anthracene		230 ± 19	170	18	125 ± 18		
Chrysene		196 ± 16	145	16	108 ± 13		
Benzo[b]fluoranthene		146 ± 8	108	12	107 ± 15		
Benzo[k]fluoranthene		89 ± 6	66	7	63 ± 8		
Benzo[a]pyrene		145 ± 8	107	12	107 ± 14		
Dibenzo[ah]anthracene		15 ± 0.8	11	1.2	12 ± 2		
Benzo[ghi]perylene		65 ± 3	48	5.2	66 ± 7		
Indeno[1,2,3-cd]pyrene		82 ± 5	61	6.6	77 ± 11		
∑16 PAHs	50	2634 ± 241	1949	211	1539 ± 314		
<i>E. fetida</i>	mortality-14 d	100%	50%		0%		
	reproduction inhibition-56 d	100%		50%	46%		
<i>F. candida</i>	reproduction inhibition-28 d	100%			0%		
<i>B. chinensis</i>	growth inhibition-17d	85%			10%		

Pollutant concentrations in soil A test medium corresponding to EC50 values on survival (74%)<sup>(2)</sup> and reproduction (8%)<sup>(3)</sup> of earthworms are calculated. Toxicity was assessed on higher plants (*Brassica chinensis*), earthworms (*Eisenia fetida*) and collembolae (*Folsomia candida*).

<sup>a</sup> Darmendrail et al., 2000.

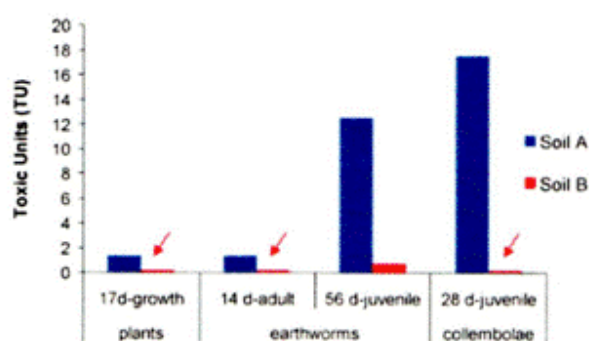
<sup>b</sup> Spurgeon et al., 1994.

<sup>c</sup> Sverdrup et al., 2002a.

organic and inorganic elements and to reduce their bioavailability, were in the same range of concentrations in the two soils and even higher in soil A, the more toxic one (Table I). No parameter among the ones measured could explain the different toxicity profile of the two contaminated soils. These results clearly show that extrapolating toxicity from measurements of chemical pollutants of concern in a complex matrix is not straightforward.

We attempted to relate the toxicity of soil A to pollutant concentrations and to identify which pollutants could have caused effects. For this purpose, we calculated the concentrations of each chemical pollutant in the test medium corresponding to the EC50 for comparison with soil B and with literature data when available.

For earthworms, pollutant concentrations in the test medium reducing survival (EC50-14 days = 74%) by 50%



**Fig. 1.** Toxicity expressed as toxic units ( $TU = 100/EC_{50}$ ) of the A and B contaminated soils measured on growth of higher plants (*Brassica chinensis*), mortality and reproduction of earthworms (*Eisenia fetida*) and reproduction of collembolae (*Folsomia Candida*). Non toxic samples are indicated by arrows. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

and reproduction ( $EC_{50}$ -56 days = 8%) are shown in Table I (columns identified as 2 and 3). At first sight, it appeared that pollutant concentrations responsible for the same level of toxicity linked to earthworm reproduction (i.e., 50% reduction in soil A, column 3, and 46% in soil B, column 4) differed by one or two orders of magnitude for PAHs and metals, respectively. This intimates that pollutants are much less bioavailable in soil B than in soil A. Therefore, the notion that toxicity can be readily extrapolated from pollutant concentrations in a complex matrix is hardly defensible.

In a second step, we analyzed existing literature data regarding toxicity of metals and PAHs to earthworms, collembolae and plants. Spurgeon et al. (1994) studied toxicity to earthworms by cadmium, copper, lead and zinc spiked in an artificial soil. The concentrations found by these authors causing decreased survival of *E. fetida* by 50% were much higher than in soil A, leading us to believe that metals were likely not involved in the toxicity of soil A. Moreover, soil B, devoid of lethal effects on earthworms despite a concentration of zinc > 2500 mg/kg, should indeed have induced their mortality, as the  $LC_{50}$  value found for this metal was 1010 mg/kg. Likewise, earthworm reproduction inhibition should have been greater than 46%, because zinc concentrations in soil B were 10 times higher and copper concentrations twice higher than those found to reduce reproduction by 50% in the spiked test medium by Spurgeon et al., (1994). No adaptation process can be alleged to explain absence of toxicity because the earthworms tested originated from our lab culture. Results can rather be explained by a low bioavailability of pollutants in soil B. Spurgeon et al. (1994) had already concluded, based on their studies of earthworm populations in the vicinity of smelting works contaminated by zinc and comparison with bioassay results, that testing with spiked soil overestimated the potential

effects of metals on populations. They hypothesized that the discrepancy between test and field observations was due to a greater bioavailability in the standard test medium.

As for PAH effects on invertebrates, it appeared that fluorene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene were present at sufficiently high concentrations in the cokery soil A to explain toxicity to earthworms and collembolae. Sverdrup et al. (2002a) studied toxicity on *Eisenia veneta* of a sandy loam soil spiked with one of these four PAHs. The  $EC_{50}$  values they registered are close to the calculated concentrations corresponding to the  $EC_{50}$  value of soil A. Besides the fact that these PAH congeners were probably involved in toxicity recorded with soil A, it is noteworthy that each of these PAHs exerted the same level of toxicity (i.e., 50% effect) at a similar level of concentration when it was tested alone in a spiked soil, or in the cokery soil in which all the PAHs were present in addition to the other organic and inorganic pollutants. The same conclusions could be drawn from comparison of the  $EC_{10}$ -28 days values on reproduction to the collembolae *Folsomia fimetaria* found by Sverdrup et al. (2002b) and of those found with soil A (Eom et al., 2007). Overall, results indicate once again that the toxicity of each pollutant in the cokery soil is much lower than when each is spiked into a test soil.

The present investigation demonstrates that pollutant bioavailability was dramatically reduced in the A and B soils. The process of sequestration of small organic and inorganic molecules within a soil matrix, which reduces pollutant bioavailability in aged soils, has been described by several authors. Indeed the pollutant fraction readily available initially becomes a recalcitrant fraction due to diffusion into organic matter and sorption-retarded pore diffusion (Semple et al., 2003). The bioavailable fraction cannot be measured by traditional chemical analyses which use conventional extraction to remove as much contaminants as possible. Therefore, traditional chemical analyses cannot, alone, reflect the actual available toxic fraction.

Additionally, the use of literature data to extrapolate toxicity from measured concentrations is another pitfall. Indeed, most toxicity data published are derived from bioassays carried out with pollutant-spiked test medium. The concentration-effect relationships are not the same in a spiked soil and in an aged natural soil. Deriving effects from concentrations can therefore produce erroneous conclusions if effects of ageing are not taken into consideration. Up to now, very few studies have dealt with specific effects of ageing using artificial or natural spiked soils. As a result, we have no scale to predict effects of aged soils. In addition, information is often lacking on the history of a formerly contaminated site and dating chemical contamination which extended over decades of activities is a very difficult operation.

Consequently, it is not relevant for soil risk assessment to define a strategy of remediation of industrial wastelands

on the results of chemical analyses alone. Our study on soils A and B clearly demonstrated the pitfalls which could have resulted from extrapolating toxicity based on soil concentrations of pollutants of concern. Hazard may be overestimated, if bioavailability is not taken into account.

Furthermore, chemical analysis, even when impressive numbers of pollutants are analyzed, can never pretend to be exhaustive and will only reflect a part of the chemical pollution present. It cannot be excluded that pollutants of concern other than those searched for and degradation by-products responsible for toxicity might be present. In such a case, toxicity will be underestimated if extrapolated from chemical analyses. In all situations, bioassays are indispensable to measure toxicity of the soil matrix, to complete the first diagnostic of contamination given by chemical analyses and to highlight the actual toxicity of a formerly contaminated soil.

To conclude, hazard and risk assessment of chemically-contaminated soils may lead to erroneous conclusions if biological investigations seeking information on actual toxicity are left out of the decision-making process. Predicting biological effects requires biological tools and approaches. Otherwise, erroneous conclusions can be expected to occur from sole extrapolation of analytical results. This holds true for any environmental compartment, but especially for soil risk assessment.

---

Authors warmly acknowledge Pr Dr Christian Blaise for correcting the English form of the paper.

## REFERENCES

- Alexander M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Technol* 34: 4259–4265.
- BRGM, 2007. [www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/Documents/Appui/BD\\_Sol\\_existantes\\_et\\_gestion\\_SSP\\_V0-022007.pdf](http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/Documents/Appui/BD_Sol_existantes_et_gestion_SSP_V0-022007.pdf).
- Darmendrail D, Baize D, Barbier J, Freyssinet P, Mouvet C, Salpêtre I, Wavrer P. 2000. Fond géochimique naturel: Etat des connaissances à l'échelle nationale. BRGM/RP-50158-FR. 93 p.
- Eom IC, Rast C, Veber AM, Vasseur P. 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotox Environ Saf* 67:190–205.
- Hankard PK, Bundy JG, Spurgeon DJ, Weeks JM, Wright J, Weinberg C, Svendsen C. 2005. Establishing principal soil quality parameters influencing earthworms in urban soils using bioassays. *Environ Pollut* 133:199–211.
- Hatzinger PB, Alexander M. 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ Sci Technol* 29:537–545.
- Johnson DL, Jones KC, Langdon CJ, Pearce TG, Semple KT. 2002. Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Biol Biochem* 34:1363–1370.
- Joner EJ, Hirmann D, Szolar OHJ, Todorovic D, Leyval C, Loibner AP. 2004. Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment. *Environ Pollut* 128:429–435.
- Semple KT, Morris WJ, Paton GI. 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: Fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur J Soil Sci* 54:809–818.
- Smit CE, Van Gestel CAM. 1998. Effects of soil type, prepercolation, and ageing on bioaccumulation and toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida*. *Environ Toxicol Chem* 17:1132–1141.
- Smith MJ, Flowers TH, Duncan HJ, Alder J. 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and consequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environ Pollut* 141:519–525.
- Spurgeon DJ, Hopkins SP, Jones DT. 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ Pollut* 84:123–130.
- Stroo HF, Jensen R, Loehr RC, Nakles DV, Fairbrother A, Liban CB. 2000. Environmentally acceptable endpoints for PAHs at a manufactured gas plant site. *Environ Sci Technol* 34:3831–3836.
- Sverdrup LE, Nielsen T, Krogh PH. 2002a. Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environ Sci Technol* 36: 2429–2435.
- Sverdrup LE, Krogh PH, Nielsen T, Stenensen J. 2002b. Relative sensitivity of three terrestrial invertebrate tests to polycyclic aromatic compounds. *Environ Toxicol Chem* 21:1927–1933.
- Tang J, Carroquino MJ, Robertson BK, Alexander M. 1998. Combined effect of sequestration and bioremediation in reducing the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ Sci Technol* 32:3586–3590.

## *2<sup>ème</sup> Partie : Génotoxicité des sols*

### **Article 2**

#### **GENOTOXIC AND REPRODUCTIVE EFFECTS OF AN INDUSTRIALLY CONTAMINATED SOIL ON THE EARTHWORM *EISENIA FETIDA***

Marc BONNARD <sup>1</sup>, Ig-Chun EOM <sup>1</sup>, Jean-Louis MOREL <sup>2</sup> and Paule VASSEUR <sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS UMR 7146, Laboratory I.E.B.E. (Interactions, Ecotoxicology, Biodiversity, Ecosystems), University Paul Verlaine - Metz, France

<sup>2</sup> GIS.F.I. (Scientific Interest Group for Industrial Wastelands), ENSAIA, INPL, France

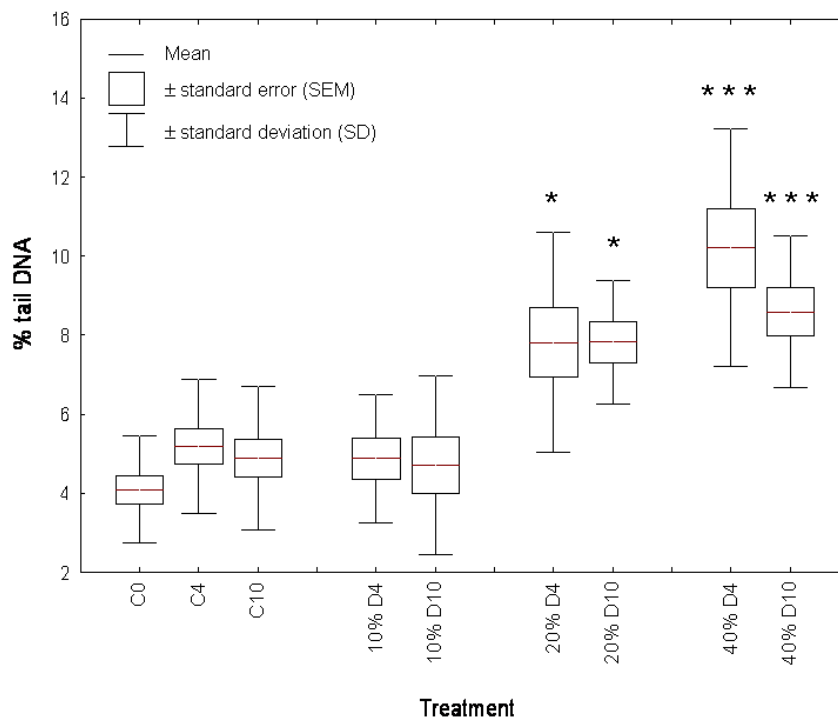
*Environmental Molecular and Mutagenesis, 2009, Volume 50, Issue 1, pages 60-67*

**Cette deuxième étude avait pour but de 1) évaluer le potentiel génotoxique des polluants du sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM) vis-à-vis du ver de terre *Eisenia fetida* et de 2) comparer la réponse des essais de génotoxicité à celle des essais de survie et reproduction présentés dans le précédent article.** Le sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM) est principalement contaminé en HAP ( $\Sigma_{16 \text{ HAP}} = 2634 \pm 241 \text{ mg/kg}$ ) et a montré une inhibition de la survie ( $CL_{50} = 74\%$ ) et de la reproduction ( $CE_{50} = 8\%$ ) des vers de terre adultes *Eisenia fetida* (Article 1).

Nous avons étudié si les polluants, présents dans le sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM), étaient génotoxiques vis-à-vis des vers de terre adultes et si la génotoxicité des polluants mesurée à court-terme était associée à des effets à plus long terme sur la survie et la reproduction des vers de terre. Nous avons mesuré par l'essai comet les dommages à l'ADN des coelomocytes de vers de terre adultes, après une exposition *in vivo* de 4 et 10 jours à différentes concentrations de sol contaminé dans le milieu d'essai (10%, 20% et 40%). Ces concentrations sont les mêmes que celles qui ont été testées pour les essais de reproduction. Ces faibles concentrations testées s'expliquent du fait de la mortalité totale des vers de terre

exposés au sol contaminé (sol HOM). Pour une plus grande pertinence, la génotoxicité des polluants vis-à-vis des vers de terre a été étudiée à des concentrations sub-létales.

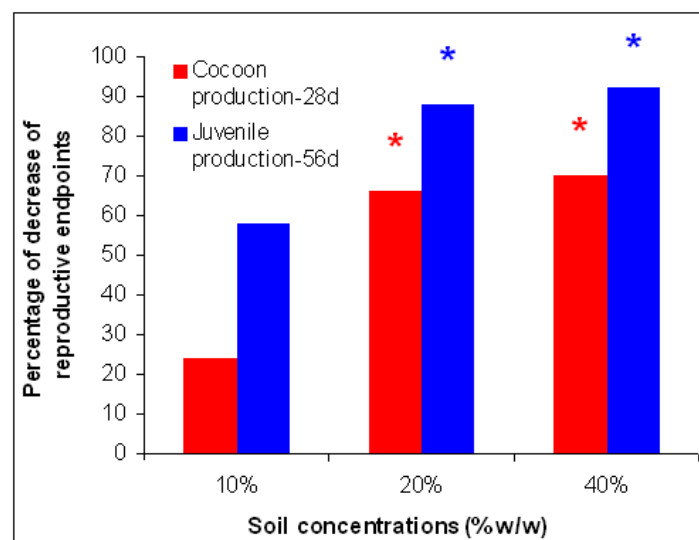
**Cette étude a montré que les polluants du sol de la cokerie d'Homécourt étaient génotoxiques à court-terme vis-à-vis des vers de terre adultes.** Les HAP, majoritaires dans le sol HOM, seraient responsables de la génotoxicité, bien que l'implication de métaux lourds tels que le cadmium, le nickel ou le chrome ne puisse être exclue. La figure 1 représente le pourcentage moyen d'ADN endommagé (dans la queue de la comète) ( $\pm$  écart-type et écart-type à la moyenne) chez les vers de terre exposés pendant 4 et 10 jours aux concentrations de 10%, 20% et 40% de sol contaminé (sol HOM) dans le milieu d'essai. Les dommages à l'ADN sont également représentés chez les vers témoins (C4 et C10) et chez les vers directement issus du milieu d'élevage (C0).



**Figure 1:** Dommages à l'ADN (exprimés par le pourcentage moyen d'ADN dans la queue de la comète) des coelomocytes des vers témoins (provenant du milieu ISO: C<sub>4</sub> et C<sub>10</sub> ou du substrat d'élevage: C<sub>0</sub>) et des vers exposés pendant 4 et 10 jours à des concentrations de 10%, 20% et 40% de sol contaminé (sol HOM) dans le milieu d'essai. L'astérisque indique une augmentation significative des dommages à l'ADN en comparaison aux témoins correspondants avec une valeur de  $p < 0.05$  (\*) ou  $p < 0.001$  (\*\*\*) (ANOVA).

Une augmentation significative des dommages à l'ADN des coelomocytes a été observée chez les vers de terre exposés aux concentrations de 20% et de 40% de sol HOM, par rapport aux témoins correspondants. A la concentration de 10%, les polluants du sol HOM ne se sont pas révélés génotoxiques vis-à-vis des vers de terre adultes. Une diminution des dommages à l'ADN a été observée après 10 jours d'exposition des vers à la concentration de 40% de sol contaminé. Les vers de terre seraient capables de lutter contre la génotoxicité des polluants du sol, en mettant en place des systèmes de réparation des dommages à l'ADN. La représentation par classes des dommages à l'ADN a montré que les systèmes de réparation seraient plus efficaces pour les cellules dont l'ADN est faiblement endommagé (cellules dans la classe 1 avec un % Tail DNA compris entre 20% et 40%).

Cet essai de génotoxicité chez les vers de terre a montré une plus grande sensibilité que l'essai de survie et une sensibilité au moins identique à celle de l'essai de reproduction. Les dommages à l'ADN ont été observés après l'exposition des vers à des concentrations sublétales de sol contaminé (20% et 40%) qui avaient fortement inhibé la production de cocons ( $\approx 70\%$ ) et de juvéniles ( $\approx 90\%$ ) (figure 2).



**Figure 2:** Pourcentage d'inhibition de la production de cocons (en rouge) et de juvéniles (en bleu) après 28 et 56 jours d'exposition respectivement des vers aux différentes concentrations de sol contaminé (10, 20, 40% poids sec) dans le milieu d'essai. Les pourcentages d'inhibition sont exprimés par rapport à la réponse des vers témoins (ISO). L'astérisque indique une différence significative par rapport aux témoins, avec une valeur de  $p < 0.05$  (données provenant de Eom *et al.*, 2007).

Même s'il n'est pas possible d'établir de relation de cause à effet entre les dommages à l'ADN des coelomocytes de vers de terre et l'inhibition de la reproduction, ces résultats permettent de poser **l'hypothèse d'un lien indirect entre l'inhibition de la reproduction et la génotoxicité des polluants**. Outre leurs caractéristiques immuno-compétentes, les coelomocytes jouent un rôle important dans la physiologie des vers de terre, intervenant notamment dans le transport et le stockage de substances nutritives, endogènes (lipides, glycogène), le maintien de la balance ionique et du pH du fluide coelomique et de l'hémolymphe... . Les dommages à l'ADN pourraient perturber le fonctionnement métabolique des coelomocytes, induisant des perturbations physiologiques à un niveau plus élevé d'organisation biologique. La mesure des dommages à l'ADN des coelomocytes de vers de terre s'avèrerait être **un biomarqueur sensible et précoce d'altération moléculaire**, susceptible de se traduire par des perturbations physiologiques touchant la reproduction et la survie des organismes. Ce biomarqueur de génotoxicité pourrait être alors utilisé en tant qu'**indicateur précoce de toxicité à long terme**. L'étude de ce biomarqueur de génotoxicité est d'autant plus intéressante qu'à l'heure actuelle aucun essai de génotoxicité/mutagenicité de la matrice sol n'est normalisé au niveau international.



## Research Article

Genotoxic and Reproductive Effects of an Industrially Contaminated Soil on the Earthworm *Eisenia Fetida*Marc Bonnard,<sup>1\*</sup> Ig-Chun Eom,<sup>1</sup> Jean-Louis Morel,<sup>2</sup> and Paule Vasseur<sup>1</sup><sup>1</sup>CNRS UMR 7146, Laboratory I.E.B.E. (Interactions Ecotoxicology, Biodiversity and Ecosystems), University Paul Verlaine, France<sup>2</sup>GIS.F.I. (Scientific Interest Group for Industrial Wastelands), ENSAIA, INPL, France

Polluted soil sampled from a former coking plant in Lorraine (France) was studied for its genotoxicity and reproductive effects on the *Eisenia fetida* earthworm. Genotoxicity was investigated by means of the single-cell gel electrophoresis (comet) assay on the coelomocytes of earthworms after 4 and 10 days of exposure to the soil. DNA damage and a decline in the number of coelomocytes extruded from earthworms were observed at coking plant soil concentrations of 20 and 40% (w/w) in ISO soil. These soil concentrations had previously been shown to significantly reduce cocoon and juvenile productions after 28 and 56 days of earthworm exposure, respectively. The results showed that genotoxic pollutants in the tested soil were still bioavailable despite the age of the con-

taminated soil. Similar values of the no-observed-effect concentration (NOEC) corresponding to 10% of the contaminated soil and of the lowest soil concentration tested inducing effects (LOEC) corresponding to 20% of the contaminated soil were obtained from reproductive and genotoxicity endpoints. Among the soil pollutants measured, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) appeared to be the most likely source of the genotoxicity recorded, although effects of metals could not be excluded. Measurement of genotoxicity in earthworms could complement the existing standardized tests used in the ecotoxicological assessment of the risk associated with contaminated soils. Environ. Mol. Mutagen. 50:60–67, 2009. © 2008 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** polycyclic aromatic hydrocarbons; comet assay; industrial wastelands; *Eisenia fetida*

## INTRODUCTION

In many countries, management of industrial wastelands is becoming a priority for industrialists and scientists. Lorraine, a French region characterized by intensive mining and coking plant activities in the past, is especially concerned with the problem of soil pollution. In addition to chemical analyzes, toxicological investigations are needed to evaluate the effects on biota of polluted soils and the potential hazards of bioavailable pollutants to human and environmental health. The bioavailability of soil pollutants can be reduced by different phenomena such as ageing and weathering, and is a key component of the toxicity of formerly contaminated soils which cannot be predicted by chemical analyzes [Alexander, 2000]. In this study, we were interested in the toxicity of a formerly contaminated soil originating from an old coking plant, whose activities stopped 30 years ago. The coking plant soil was mainly polluted by nonvolatile organic compounds including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and to a lesser extent by heavy metals such as cadmium, lead, and zinc.

PAH organic pollutants are residues from combustion, coke production, petroleum refining, and other high-temperature industrial processes [Bispo et al., 1999]. PAH congeners of high molecular weight are known to be genotoxic and carcinogenic in vertebrates and humans [IARC, 1987]. Genotoxicity is due to their biotransformation into active electrophilic metabolites that can bind to nucleic acids and induce DNA damage through covalent adducts or strand breaks [IARC, 1987]. Although more than 90% of the total contamination by PAHs are present in surface soils [Zhu

Grant sponsors: French Environment and Energy Management Agency (ADEME), the Region Lorraine.

\*Correspondence to: Marc Bonnard, CNRS UMR 7146, Laboratory IEBE, University Paul Verlaine, rue du Général Delestraint, 57070 Metz, France. E-mail: bonnard@univ-metz.fr

Received 16 May 2008; provisionally accepted 1 September 2008; and in final form 3 September 2008

DOI 10.1002/em.20436

Published online 20 November 2008 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

et al., 2006], little is known about their genotoxicity in terrestrial invertebrates like earthworms.

Among the metal pollutants found in the coking plant soil, cadmium has been shown to be genotoxic to vertebrates [Hartwig, 1995] and is classified as carcinogenic to humans and mammals by the International Agency for Research on Cancer [IARC, 1993]. Although nickel and chromium were found at concentrations not exceeding regional values, their possible effects are discussed because nickel and hexavalent chromium are also known to be carcinogenic [IARC, 1990].

Few studies have dealt with genotoxicity in earthworms. Walsh et al. [1995, 1997] and Van Schooten et al. [1995] first demonstrated the formation of aromatic DNA adducts in earthworms after exposure to naturally PAH-contaminated soils using the  $^{32}\text{P}$ -postlabelling method. The single-cell gel electrophoresis assay (SCGE), more often referred to as the comet assay, has been revealed to be a sensitive tool for the identification and quantification of genotoxicity [Faust et al., 2004; Qiao et al., 2007], detecting low levels of DNA damage in single cells [Tice et al., 2000]. The study of coelomocytes in earthworms is relevant because these leukocytes, located around the intestinal tract, are particularly exposed to soil pollutants and are involved in the process of cell immunity [Dhainaut and Scaps, 2001; Manerikar et al., 2008]. The comet assay applied to earthworms has been used in previous studies to investigate the genotoxicity of artificial or natural soils spiked with dioxins [Verschaeve et al., 1993], heavy metals [Bierkens et al., 1998; Reinecke and Reinecke, 2004; Zhu et al., 2006; Manerikar et al., 2008], pesticides [Zang et al., 2000; Bustos-Obregón and Goicochea, 2003; Xiao et al., 2006a; Casabé et al., 2007], or PAHs [Martin et al., 2005; Zhu et al., 2006]. Yet, studies dealing with the genotoxicity of field-contaminated soils to earthworms are rare [White and Claxton, 2004]. Few authors have studied the genotoxicity to earthworms of PAH-contaminated soils [Šalagovič et al., 1996; Di Marzio et al., 2005] or multicontaminated field soils [Verschaeve and Gilles, 1995; Xiao et al., 2006b; Qiao et al., 2007].

The aim of this study was two-fold and consisted of: (1) investigating the genotoxic impact of a formerly contaminated soil on earthworms using the comet assay; and (2) comparing the results of genotoxicity to reproduction endpoints that had been measured in the same soil samples. The soil sample tested was toxic to earthworm reproduction, which was more severely affected than survival [Eom et al., 2007]. Although no effect on survival was recorded in earthworms exposed to concentrations of 20 and 40% of the contaminated soil in the test medium, a significant decrease of cocoon production after 28 days and of juvenile production after 56 days had previously been registered [Eom et al., 2007]. In this study, genotoxicity was investigated within the same concentration range, as that which impaired reproduction.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemicals and Test Organisms

All reagents were of analytical or molecular biology grade. *N*-lauryl-sarcosinate, Triton  $\times 100$  dimethylsulfoxide (DMSO), and Tris(hydroxymethyl)-aminoethane (Tris) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). ethidium bromide, normal melting point (NMP) agarose, and low melting point (LMP) agarose were provided by Eurobio (Les Ullis, Courtabouef, France). Slides, coverslips, and all other reagents were purchased from VWR International (Merck, Eurolab, Fontenay-sous-Bois, France).

The *Eisenia fetida* earthworm species (Savigny, 1826) was selected as a test organism. Individuals chosen in this assay came from our lab culture, as detailed in Annex A from the ISO protocol 11268-1 (1993). Earthworms were reared at room temperature in plastic containers of 20 L containing 3–4 kg of a wet mix of horse manure and peat (50/50), with pH adjusted to  $6.0 \pm 0.5$  with calcium carbonate. Earthworms chosen in this study weighed  $360 \pm 70$  mg (mean  $\pm$  standard deviation) and were sexually mature, as indicated by a fully developed clitellum.

### Sampling

A stock of the contaminated soil (2 tons) was collected on site from an old coking plant in the Lorraine Region (France), then homogenized and sieved at 4 mm. From this stock, 100 kg were sampled, analyzed for chemical pollution, and stored at 13°C. Several kilograms were subsampled for ecotoxicological and physicochemical analyzes. The 16 PAH congeners (US-EPA) were analyzed in soil samples according to the AFNOR XP X33-012 French standard method (2000). Concentrations were expressed using mean values and standard deviations on various samples of the contaminated or control soils. Total PAH concentration corresponded to the sum of the concentrations of the 16 PAHs analyzed. Heavy metals in soils were analyzed with inductively coupled plasma emission atomic spectrometry (ICP-SAE) (for Co, Cr, Cu, Ni, Zn) and with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (for Pb, Cd, Ti, Mo). Chromium speciation was studied and hexavalent chromium (CrVI) in soil was analyzed with molecular absorption spectrometry according to the French standard method NF T 90043 (1988). Physicochemical properties of soil, such as total organic carbon, pH, grain size, texture and moisture content, were measured according to ISO standards by INRA, the National Institute of Agronomic Research (Arras, France; www.inra.fr).

### Exposure

Prior to exposure, earthworms were rinsed in deionized water. They were randomly distributed in 1 L glass vessels containing 500 g (dry weight) of test medium. Three concentrations (40, 20, 10% w/w) of the coking plant soil mixed with the ISO artificial soil (70% sand, 20% kaolinite clay, 10% 1-mm sieved finely ground sphagnum peat, pH  $6.5 \pm 0.5$  with  $\text{CaCO}_3$ ) were tested, as described in ISO protocols (ISO 11268-1, 1993; ISO 11268-2, 1998). The soil moisture content was 40–60% of the water-holding capacity and all test vessels were kept at  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  in a light of 400–500 lux with a dark cycle of 16 hr/8 hr during earthworm exposure. Genotoxicity assays were carried out on at least 10 earthworms per experimental condition tested: exposure time was 4 or 10 days, and concentrations of the polluted soil in the test medium were 0, 10, 20, or 40%. Three groups of controls were constituted: controls exposed for 4 or 10 days to the artificial ISO soil ( $C_4$ ,  $C_{10}$ ) and controls sampled from the culture substrate and tested immediately for genotoxicity at time 0 ( $C_0$ ). Genotoxicity was measured separately in each earthworm, in all control and exposed groups.

### Alkaline Single-Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay

At the end of the exposure time to the soil dilutions, earthworms were sampled and rinsed in ice-cold PBS (0.01 M, pH 7.4)  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  free. Fecal matter was expelled by gentle massage. Each earthworm was placed in an individual 50 mL-polypropylene tube filled with 3 mL of ice-cold PBS for the electrical extrusion of coelomocytes. A slightly modified electrical technique from the one described by Roch [1979] was used. Each earthworm was excited with three electrical stimulations of 9V for 5 sec causing the spontaneous release of coelomocytes through the pores of the tegument. The number of coelomocytes extruded by the earthworm and the percentage of viability were microscopically checked using the trypan blue (0.5%) test before undertaking the comet assay. Cell viability was expressed as the proportion of living cells in the cellular population examined.

DNA damage was quantified by means of the comet assay as described by Singh et al. [1988] with minor modifications. The following protocol proved to be appropriate for analyzing DNA damage in coelomocytes of earthworms with the use of a positive control. Coelomocytes were exposed *in vitro* for 1 hr with hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) concentrations ranging from 5 to 100  $\mu\text{M}$  and showed a dose-dependent relationship in their DNA damage (data not shown). All steps described above were conducted under dim red light and performed at 4°C to prevent any damage. Cell suspension (100  $\mu\text{L}$ ) was carefully mixed with 1% (weight/volume w/v in 0.01 M PBS) LMP agarose (100  $\mu\text{L}$ ) and then 90  $\mu\text{L}$  containing around 300,000 cells/mL were transferred onto a conventional microscope slide precoated with 0.8% (w/v in PBS) NMP agarose (90  $\mu\text{L}$ ). The gel was solidified on ice for 10 min and the cover slip was removed. A third layer of 0.5% (w/v in PBS) LMP agarose (90  $\mu\text{L}$ ) was added. Slides were left on ice again for 10 min to solidify and the cover slip was removed. Then they were immersed in a cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 10 mM Tris—pH 10—1% *N*-laurylsarcosinate, with 1% Triton  $\times 100$  and 10% DMSO added immediately before use) for 2 hr. After lysis, slides were washed with electrophoresis buffer and placed in a horizontal electrophoresis tank filled with a fresh alkaline buffer (1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  and 300 mM NaOH, pH > 13) for 30 min to unwind DNA. Electrophoresis was performed in the same buffer for 15 min at 20V, 300 mA. Slides were washed twice (10 min) in neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5), dehydrated in absolute ethanol (5 min) and taken out to dry. Prior to comet analysis, nuclear DNA was stained with 30  $\mu\text{L}$  of ethidium bromide (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and observed under UV light using an epifluorescence microscope (BX 60 Olympus) equipped with a dichroic filter and connected to an image analysis system (Komet 3:1 Kinetic Imaging Ltd).

For each earthworm, two slides were prepared. On each slide, 50 non-overlapping comets were scored randomly on the central part of the gel and a total of 100 cells were examined per earthworm. In the control ( $C_0$ ,  $C_4$ ,  $C_{10}$ ) and exposed groups, at least 1,000 cells were analyzed per experimental condition tested. However, in the groups of earthworms exposed to 20% of contaminated soil for 10 days (20%  $D_{10}$ ) and to 40% of contaminated soil for 4 days (40%  $D_4$ ), one of the 10 earthworms tested did not release enough coelomocytes for the comet assay and 900 cells instead of 1,000 were analyzed.

The percentage of DNA in the tail was used to express DNA damage. This parameter was chosen because of the small interexperimental and interelectrophoresis variation registered using this parameter [De Boeck et al., 2000].

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with Statistica 6.0 software. The numbers of coelomocytes extruded and the average percentage of tail DNA were compared between treatments by using the one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the post-hoc HSD Tukey test when significant. Differences between treatments were considered to be signifi-

cant when  $P < 0.05$ . The homogeneity of variances and the normality of data were evaluated by means of the Bartlett and the Shapiro-Wilk tests, respectively. The numbers of coelomocytes extruded did not follow a normal distribution and were transformed with a square root function. Cellular distributions based on the degree of DNA damage (% tail DNA) were also analyzed by means of the Chi-square test: intact cells (0–20%, Class 0) versus damaged cells within Class 1 (20–40%: slightly damaged cells), Class 2 (40–60%: damaged cells) and Class 3 (60–80%: highly damaged cells) as defined by Lemière et al. [2005]. No dead or dying cell (>80%) was found in this study. Differences between treatments were considered to be significant when  $P < 0.05$ . The no-observed-effect soil concentration (NOEC), defined as the highest concentration of the contaminated soil tested producing no significant effect compared to controls, was expressed for each endpoint studied. This was also the case for the lowest-observed-effect concentration (LOEC), defined as the lowest concentration of the contaminated soil tested producing effects significantly different from the controls.

## RESULTS

### Pollutants in Soils

The physicochemical characteristics of the coking plant and ISO artificial soils are given in Table I. The sum of the concentrations of the 16 PAHs measured in the soil sample tested was  $2634 \pm 241$  mg/kg of dry soil weight (d.w.). This level was around 50 times higher than the reference value of 50 mg/kg of soil (d.w.) in our country [BRGM, 2007]. Twenty-eight percent of the PAHs had two or three rings, 52% had four rings and the remaining 20% had five or six rings. Three heavy metals—cadmium, lead and zinc—were found in the coking plant soil at concentrations higher than the reference values in natural soils defined by BRGM [2007]. Cadmium concentration in the coking plant soil reached  $6.7 \pm 0.6$  mg/kg (d.w.), which was around 15 times higher than reference values (0.2–0.7 mg/kg d.w.). Lead ( $120 \pm 4$  mg/kg d.w.) and zinc ( $347 \pm 6$  mg/kg d.w.) concentrations in the coking plant soil were about 1.5 and two times higher than the upper limit of reference values (15–80 mg Pb/kg d.w. and 40–180 mg Zn/kg d.w.) respectively [BRGM, 2007]. Concentrations of other metals (Cr, Cu, Hg, Ni) fell within the range of reference values. All chromium was in the trivalent form, with hexavalent chromium below detection limits (0.1 mg/kg d.w.).

### Genotoxicity Effects

The characteristics of the coelomocytes analyzed in control and exposed earthworms are given in Table II. In each treatment, the average percentage of cell viability exceeded 95%. No significant difference in the average number of coelomocytes extruded was observed between controls and earthworms exposed to 10 and 20% of the contaminated soil. On the other hand, the average number of coelomocytes extruded decreased significantly in earthworms exposed to 40% of the contaminated soil compared to the corresponding control after 10 days ( $P < 0.001$ ),

TABLE I. The Main Physicochemical Characteristics of Both Coking Plant and Artificial ISO Soils

Physicochemical characteristics	Cokery soil	40%	20%	Reference values <sup>a</sup>	Artificial ISO soil
Soil texture					
Soil type	Sandy loam				Sandy loam
Clay (%)	10.7				10.7
Silt (%)	22.1				8.2
Sand (%)	67.2				81.1
pH (H <sub>2</sub> O)	9.6				6.0 ± 0.5
Water-holding capacity (%)	53				59
C/N	46.1				39.9
Organic carbon (%)	10.0				3.4
Organic matter (%)	17.3				5.9
Heavy metals (mean ± sd)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
Cd	6.7 ± 0.6	2.68	1.34	0.2–0.7	0.1
Total Cr as Cr III <sup>b</sup>	54 ± 0.9	21.6	10.8	35–80	1.0
Cu	26 ± 0.6	10.4	5.2	10–70	1.2
Hg	12 ± 0.3	4.8	2.4		< 0.05
Pb	120 ± 4	48	24	15–80	46
Zn	347 ± 6	138.8	69.4	40–180	5.3
Ni	23 ± 0.3	9.2	4.6	15–40	0.3
PAHs (mean ± sd)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)	(mg/kg)
Naphthalene	5.9 ± 0.2	2.36	1.18		< 0.01
Acenaphthylene	4.6 ± 0.3	1.84	0.92		< 0.01
Acenaphthene	46 ± 4	18.4	9.2		< 0.01
Fluorene	103 ± 9	41.2	20.6		< 0.01
Phenanthrene	380 ± 46	152	76		< 0.01
Anthracene	186 ± 39	74.4	37.2		< 0.01
Fluoranthene	561 ± 49	224.4	112.2		< 0.01
Pyrene	379 ± 28	151.6	75.8		< 0.01
Benzo[a]anthracene	230 ± 19	92	46		< 0.01
Chrysene	196 ± 16	78.4	39.2		< 0.01
Benzo[b]fluoranthene	146 ± 8	58.4	29.2		< 0.01
Benzo[k]fluoranthene	89 ± 6	35.6	17.8		< 0.01
Benzo[a]pyrene	145 ± 8	58	29		< 0.01
Dibenzo[ah]anthracene	15 ± 0.8	6	3		< 0.01
Benzo[ghi]perylene	65 ± 3	26	13		< 0.01
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	82 ± 5	32.8	16.4		< 0.01
Σ16 PAHs	2634 ± 241	1 053	527	50	ND

<sup>a</sup>in natural soils [BRGM, 2007].

<sup>b</sup>Cr VI below detection limits (0.1 mg/kg soil d.w.).

ND < Quantification limits.

whereas the decrease was less significant after 4 days of exposure ( $P = 0.051$ ).

The average percentage of tail DNA in control and exposed earthworms is shown in Figure 1. No difference was observed in the average percentage of tail DNA between controls ( $C_0$ ,  $C_4$ , and  $C_{10}$ ) and earthworms exposed for 4 and 10 days to 10% of the contaminated soil, with average values ranging between 4 and 5%.

DNA damage in earthworms exposed to the two highest soil concentrations (20 and 40%) increased significantly in comparison with the ones of the corresponding controls ( $C_4$  and  $C_{10}$ ). The average percentage of tail DNA in earthworms exposed to 20% of the contaminated soil for 4 and 10 days was 7.8%, which was about 1.5-fold higher than the ones of the corresponding controls ( $C_4$  and  $C_{10}$ ). In earthworms exposed to 40% of the contaminated soil, the average percentage reached 10.2% after 4 days and 8.6% after 10 days, which represents a 2-

and 1.75-fold increase compared to the corresponding controls, respectively. The higher value of the average percentage of tail DNA in earthworms exposed to the concentration of 40% of the contaminated soil compared to the concentration of 20% was not significant.

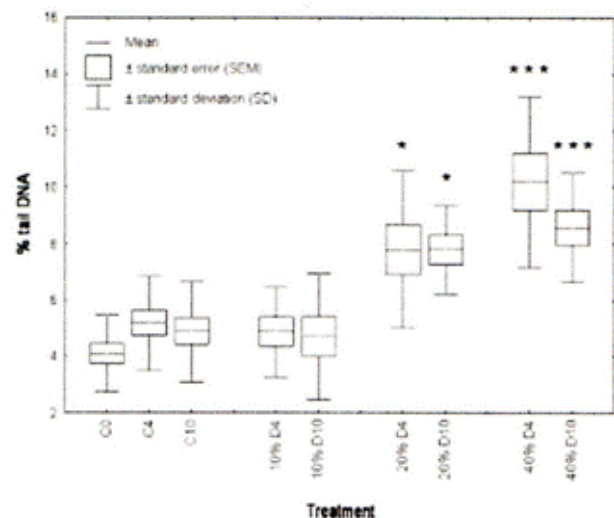
The distribution of the coelomocyte populations based on the degree of DNA damage (tail DNA) is presented in Table II. The percentage of intact cells (Class 0) was over 96% and the percentage of cells with little damage (Class 1) lower than 3.5% in all controls and in earthworms exposed to 10% of the tested soil.

After 4 days, the percentage of DNA-damaged cells in Class 1 increased to 6 and 12% in earthworms exposed to the soil concentrations of 20 and 40%, respectively ( $P < 0.001$ ). As for coelomocytes in Class 2, the percentage increased from 0.3% in controls to 0.8% at the soil concentration of 20% and significantly to 1.25% at the concentration of 40% ( $P < 0.01$ ).

**TABLE II. The Number, Viability, and Genotoxicity of Coelomocytes Extruded by Earthworms Exposed to 10, 20, and 40% of the Contaminated Soil During 4- and 10-Day Periods**

Treatment	Control earthworms						Exposed earthworms					
	0%			10%			20%			40%		
	Day(s) of exposure	4	10	4	10	4	10	4	10	4	10	
Number of coelomocytes ( $\times 10^6$ ) extruded per earthworm	2.2 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 1.1	2.7 $\pm$ 1.3	2.3 $\pm$ 1.3	2.6 $\pm$ 1.5	1.9 $\pm$ 1.6	1.8 $\pm$ 1.1	1.5 $\pm$ 0.8*	1.1 $\pm$ 0.6***			
Cell viability (%)	97.2 $\pm$ 3.8	96.5 $\pm$ 2.7	96.1 $\pm$ 2.5	98.1 $\pm$ 1.9	98.1 $\pm$ 1.6	97.2 $\pm$ 3.4	97.6 $\pm$ 2.6	98.6 $\pm$ 2.1	99.4 $\pm$ 1.3			
Genotoxicity Class 0 (0–20%)	96.8	96.3	96.5	97.5	96	92.3	93	86.5	92.6			
Class 1 (20–40%)	2.6	3.4	3.3	2.4	3.5	6.7***	6.3**	12***	5.7**			
Class 2 (40–60%)	0.4	0.3	0.2	0.1	0.5	0.8	0.7	1.25**	1.6***			
Class 3 (60–80%)	0.2					0.1	0.1	0.25	0.1			

Studies were performed on 15 individuals for controls, on 10 individuals for exposed earthworms (NB: nine individuals only for earthworms exposed for 10 days to 20% and for 4 days to 40% of contaminated soil). The number of coelomocytes extruded by earthworm and the percentage of cell viability are given as mean  $\pm$  standard deviation. Genotoxicity values are given as the percentage of cells in different classes of DNA damage according to the percentage of tail DNA. The numbers of coelomocytes extruded per earthworm and cellular distributions based on the degree of DNA damage were compared by means of the HSD Tukey (following the one-way analysis of variance) and the Chi-square tests, respectively. Values with an asterisk are significantly different from the corresponding control with \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , or \*\*\* $P < 0.001$ .



**Fig. 1.** DNA damage (expressed as the average percentage of tail DNA) of coelomocytes of control earthworms (in ISO soil: C<sub>4</sub> and C<sub>10</sub> or culture substrate: C<sub>0</sub>) and earthworms exposed for 4 or 10 days to 10, 20, and 40% of the coking plant soil. In the box plots, the means are represented by bars, the edges of the boxes are standard errors and the non-outlier ranges are standard deviations. An asterisk denotes a significant increase in comparison with the corresponding control, with \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , or \*\*\* $P < 0.001$  (ANOVA).

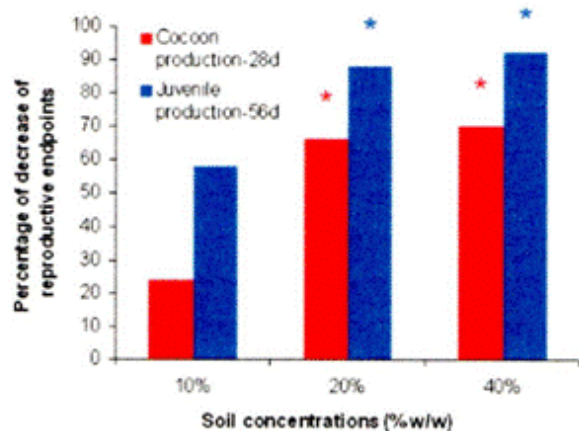
After 10 days, the main change registered compared to the 4-day exposure was a significant decrease in the percentage of DNA-damaged coelomocytes of Class 1 in earthworms exposed to 40% of the contaminated soil.

In all cases, the percentage of coelomocytes with highly damaged DNA (Class 3) was low (<0.25%).

**DISCUSSION**

This study revealed that genotoxic pollutants in the soil tested were still bioavailable to earthworms, even through coking plant activities stopped 30 years ago. Genotoxic effects were observed in the coelomocytes of earthworms after 4 and 10 days of exposure to the two highest soil concentrations (20 and 40% d.w.). The toxicity of the polluted soil in coelomocytes was recorded at the concentration of 40% and was expressed by a lower number of coelomocytes extruded after 4 and 10 days. At 20% of the contaminated soil, a trend in the decrease of the number of cells extruded was also observed, but it was not significant.

The coking plant soil had been shown not to affect the survival of adult earthworms at concentrations below 60%, although reproduction was affected [Eom et al., 2007]. Figure 2 established from the results of the former study represents the percentage of decrease in cocoon and juvenile production after 28 and 56 days of exposure of earthworms. After 28 days of exposure, cocoon production significantly decreased by 66 and 70% in earthworms



**Fig. 2.** Percentage of decrease of reproduction endpoints expressed by cocoon production after 28 days, and juvenile production after 56 days in earthworms exposed to different concentrations (10, 20, 40% d.w.) of the coking plant soil in the test medium. Results are expressed as the percentage of response in comparison to ISO controls (percentages are established from data of Eom et al. [2007]). An asterisk denotes a significant difference compared with controls with  $P < 0.05$  (data from the study of Eom et al., 2007). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

exposed to 20 and 40% of the contaminated soil respectively, compared to controls. After 56 days, juvenile production in earthworms exposed to 20 and 40% of the contaminated soil decreased by 90% compared to controls. At 10% of the contaminated soil, reproduction was already affected but not significantly. No genotoxic effect was observed at this concentration. At the concentration of 20% of the contaminated soil, a significant decrease in cocoon and juvenile production after 28 and 56 days respectively was registered. Genotoxic effects were also significant at this concentration, after 4 and 10 days of earthworm exposure. Therefore, the same NOEC (10%) and LOEC (20%) values were obtained with the reproduction and genotoxicity endpoints. This study revealed that genotoxicity in coelomocytes of earthworms after short-term exposure to the contaminated soil was more sensitive than survival and about as sensitive as reproduction endpoints measured after long-term exposure. The parallel noted between genotoxicity and reproduction in the range of effective concentrations supports the fact that an altered metabolism may be a consequence of damage to genetic material, as already expressed by Depledge [1994].

A comparison of the cellular distribution based on the degree of DNA damage revealed a significant and time-dependent decrease in DNA-damaged coelomocytes of Class 1 between 4 and 10 days of exposure to 40% of the contaminated soil, which was not shown when analyzing the average percentage of tail DNA. Our results would indicate repair in earthworms exposed for 10 days to 40%

of the contaminated soil. Yet the repair appeared to be more efficient for damaged coelomocytes of Class 1 than of Class 2, suggesting repair systems are more efficient in cells with a low level of damage than with a higher one. Repair was also observed by Qiao et al. [2007] who found DNA damage in the coelomocytes of *E. fetida* to be at a higher level after 3 and 7 days than after 14 days of exposure to soils irrigated by contaminated wastewaters. The authors interpreted the time-dependent decrease of genotoxicity as a result of a dynamic imbalance between DNA damage and repair activities in favor of repair. The fact that the time-dependent decrease in cells in Class 1 was not observed in earthworms exposed to 20% of the soil was surprising. One explanation could be that DNA repair systems might be activated above a threshold level of lesions in invertebrate tissues as suggested by Ching et al. [2001].

We attempted to identify the category of soil pollutants responsible for genotoxicity in earthworms, and compared our results to literature data dealing with *in vivo* genotoxicity in earthworms using the comet assay. We especially took into consideration the concentrations of pollutants measured or tested.

In our study, calculated concentrations of the 16 PAHs in soil samples showing genotoxic effects were around 500 and 1,000 mg/kg (d.w.) (Table I). Di Marzio et al. [2005] observed no genotoxic effect on earthworms after 2 and 7 days of exposure but after 15 and 21 days of exposure to a PAH-contaminated soil with concentrations 5 or 10 times below ours ( $\Sigma_{16} \text{PAHs} = 96 \text{ mg/kg d.w.}$ ). Qiao et al. [2007] demonstrated genotoxicity in earthworms after 1, 3, 7, and 14 days of exposure to soils irrigated by wastewaters contaminated with PAHs and other persistent organic compounds. In their study, the PAHs were present in the soil at concentrations far below ours ( $\Sigma_{16} \text{PAHs} = 100\text{--}200 \mu\text{g/kg d.w.}$ ). Thus, it is reasonable to think that the PAHs in the coking plant soil we studied could be responsible for the genotoxicity in the soil exposed earthworms.

Van Schooten et al. [1995] demonstrated that earthworms accumulated PAHs, especially the three-, four-, and five-ring compounds, and that these nonpolar molecules needed to be metabolized to become genotoxic. Saint-Denis et al. [1999] demonstrated that *E. andrei* metabolized benzo[a]pyrene (B[a]P) via enzymatic and nonenzymatic prooxidant mechanisms. B[a]P was found to be primarily metabolized via the cytochrome P450 pathways to diol-epoxide reactive electrophiles. Martin et al. [2005] observed dose-related increases in DNA strand breaks with the comet assay and in DNA adducts by  $^{32}\text{P}$ -postlabelling in intestine cells from earthworms (*Aporrectodea longa*) exposed for 24 hr to a brown earth soil spiked with 0.1, 1, or 10 mg/kg d.w. of B[a]P. Zhu et al. [2006] showed genotoxic effects in *E. andrei* after a 14-day-exposure to an artificial soil spiked with phenan-

threne concentrations ranging from 0.5 to 12.5 mg/kg d.w. The concentrations of benzo[a]pyrene and phenanthrene in our soil media at 20 and 40% (w/w) were much higher than the concentrations tested by these authors, i.e., 29 and 58 mg/kg d.w. for B[a]P and 76 and 152 mg/kg d.w. for phenanthrene, respectively (Table I). These two PAHs or their metabolites could be partly responsible for the genotoxicity observed in our study.

Among the metals known to be genotoxic to vertebrates and invertebrates, cadmium is an element that could be involved in the genotoxicity measured in earthworms due to its high concentration in the coking plant soil studied. As noted in Table I, cadmium concentrations calculated in test media showing genotoxicity (20 and 40% of contaminated soil) were 1.34 and 2.68 mg/kg (d.w.). Zhu et al. [2006] observed DNA damage in coelomocytes of *E. andrei* after 14 days of exposure to soils spiked with 10 and 50 mg/kg (d.w.) of cadmium. Although these concentrations were much higher than the ones measured in our test media, cadmium pollution of the coking plant soil may be partially responsible for genotoxicity recorded in earthworms.

As for nickel, its concentrations in test media showing genotoxicity (20 and 40% of the contaminated soil) were 4.6 and 9.2 mg Ni/kg (d.w.), respectively (Table I). In their study, Reinecke and Reinecke [2004] found genotoxic effects in *E. fetida* after a 4-week-exposure to manure substrate spiked with a range of nickel concentrations from 60 to 480 mg/kg (d.w.). In our study, nickel concentrations in the coking plant soil tested were eight-fold lower than the lowest concentration tested by these authors and they were also much less bioavailable than in the spiked manure substrate. Despite these facts, an implication of nickel in the genotoxic effects recorded cannot be excluded, although it would be limited.

As for chromium, Cr III concentrations in the tested soil were 10.8 and 21.6 mg/kg (d.w.) i.e., within the range of normal regional values. Genotoxicity of hexavalent chromium only was recorded in an indigenous species of earthworm, *Dichogaster curgensis*, exposed for 1, 7, or 14 days to soils spiked with potassium dichromate ( $K_2Cr_2O_7$ ) at concentrations ranging between 1 and 100 mg Cr(VI)/kg d.w. [Manerikar et al., 2008]. In our study, chromium was in a trivalent form, which had not been shown to be genotoxic and concentrations were within the range of normal values. Yet, the responsibility of chromium in genotoxicity recorded in exposed earthworms can be excluded.

It is worth noting that the authors cited above studied metal-spiked soils in which metal bioavailability and genotoxicity were higher than those of our experimental conditions using a formerly polluted soil. Certainly, an implication of the heavy metals—cadmium and nickel—in the genotoxicity that we observed in exposed earthworms cannot be excluded. However the probability that

PAH compounds are responsible for the effects seems preponderant.

## CONCLUSION

This study demonstrated that (1) genotoxic pollutants, associated with soil particles from the old coking plant, are still bioavailable to earthworms and may represent a hazard, (2) the short-term genotoxicity assay on coelomocytes of earthworms is an early indicator of long-term toxicity, which may result in reproduction impairment, (3) soil contamination by PAHs may be responsible for genotoxicity in earthworms, even if an implication of heavy metals cannot be excluded. As mentioned earlier, coelomocytes are components of earthworm innate immunity. DNA-alteration and a decreased number of these cells may affect their immune function and consequently earthworm sensitivity to pathogenic effects. The effects on individual organisms are likely to result in changes in fitness, such as altered growth rates, reproductive output, and the viability of offspring. Further studies would be useful to better understand relationships between genotoxicity and reproduction and how PAHs could disturb reproduction in earthworms.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was carried out within the Scientific Interest Group for Industrial Wastelands (GIS.F.I.). The authors thank Tracy Carmona for correcting the English form of this paper and Dr. Simon Devin for his help in statistical analysis.

## REFERENCES

- AFNOR (Association Française de Normalisation). 2000. Characterisation of sludges-determination of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB). Norme XP X33-012.
- Alexander M. 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ Sci Technol* 34:4259–4265.
- Bierkens J, Klein G, Corbisier P, Van Den Heuvel R, Verschaeve L, Weltens R, Schoeters G. 1998. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere* 37:2935–2947.
- Bispo A, Jourdain MJ, Jauzein M. 1999. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Org Geochem* 30:947–952.
- BRGM. 2007. Bases de données relatives à la qualité des sols: Contenu et utilisation dans le cadre de la gestion des sols pollués. 27 p. [http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/Documents/Appui/BD\\_Sol\\_existantes\\_et\\_gestion\\_SSP\\_V0-022007.pdf](http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/Documents/Appui/BD_Sol_existantes_et_gestion_SSP_V0-022007.pdf).
- Bustos-Obregón E, Goicochea RI. 2003. Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. *Asian J Androl* 4:195–199.
- Casabé N, Piola L, Fuchs J, Oneto ML, Pamparato L, Basack S, Giménez R, Massaro R, Papa JC, Kesten E. 2007. Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *J Soils Sediments* 7:232–239.

- Ching EWK, Siu WHL, Lam PKS, Xu L, Zhang Y, Richardson BJ, Wu RSS. 2001. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: Dose- and time-dependent relationships. *Mar Pollut Bull* 42:603–610.
- De Boeck M, Touil N, De Visscher G, Aka Vande P, Kirsch-Volders M. 2000. Validation and implementation of an internal standard in Comet assay analysis. *Mutat Res* 469:181–197.
- Depledge MH. 1994. Genotypic toxicity: Implications for individuals and populations. *Environ Health Perspect* 102(Suppl 12):101–104.
- Dhainaut A, Scaps P. 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Can J Zool* 79:233–253.
- Di Marzio WD, Saenz ME, Lemièrè S, Vasseur P. 2005. Improved single-cell gel electrophoresis assay for detecting DNA damage in *Eisenia fetida*. *Environ Mol Mutagen* 46:246–252.
- Eom IC, Rast C, Veber AM, Vasseur P. 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicol Environ Saf* 67:190–205.
- Faust F, Kassie F, Knasmüller S, Boedecker RH, Mann M, Mersch-Sundermann V. 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 566:209–229.
- Hartwig A. 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* 8:3–11.
- International Agency for Research on Cancer. 1987. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs, Vol. 1–42. Lyon, France: IARC. p 142.
- International Agency for Research on Cancer. 1990. Chromium, nickel and welding. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to humans, Vol. 49. Lyon, France: IARC. p 677.
- International Agency for Research on Cancer. 1993. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to humans, Vol. 58. Lyon, France: IARC. p 444.
- International Standard Organization (ISO 11268-1). 1993. Soil quality, effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*), Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrates. Switzerland: ISO.
- International Standard Organization (ISO 11268-2). 1998. Soil quality—effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)—Part 2: Determination of effects on reproduction. Switzerland: ISO.
- Lemièrè S, Cossu-Leguille C, Bispo A, Jourdain M-J, Lanhers M-C, Burnel D, Vasseur P. 2005. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the “Erika” oil-spill. *Mutat Res* 581(1/2):11–21.
- Manerikar RS, Apte AA, Ghole VS. 2008. In vitro and in vivo genotoxicity assessment of Cr(VI) using comet assay in earthworm coelomocytes. *Environ Toxicol Pharmacol* 25:63–68.
- Martin FL, Pearce TG, Hewer A, Phillips DH, Semple KT. 2005. A biomarker model of sublethal genotoxicity (DNA single-strand breaks and adducts) using the sentinel organism *Apporectodea longa* in spiked soil. *Environ Pollut* 138:307–315.
- NF T 90043. 1988. Essais des eaux. Dosage du chrome (VI)—Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire.
- Qiao M, Chen Y, Wang C-X, Wang Z, Zhu Y-G. 2007. DNA damage and repair process in earthworm after in-vivo and in-vitro exposure to soils irrigated by wastewaters. *Environ Pollut* 148:141–147.
- Reinecke SA, Reinecke AJ. 2004. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Arch Environ Contam Toxicol* 46:208–215.
- Roch Ph. 1979. Protein analysis of earthworm coelomic fluid. 1-polymorphic system of the natural hemolysin of *Eisenia fetida andrei*. *Dev Comp Immunol* 3:599–608.
- Saint-Denis M, Narbonne JF, Arnaud C, Thybaud E, Ribera D. 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: Effects of benzo[a]pyrene. *Soil Biol Biochem* 31:1837–1846.
- Šalagovič J, Gilles J, Verschave L, Kalina I. 1996. The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: A promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biologica (Praha)* 42:17–21.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184–191.
- 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 Mutagen* 35:206–221.
- Van Schooten FJ, Maas LM, Moonen EJC, Kleinjans JCS, Van der Oost R. 1995. DNA dosimetry in biological indicator species living on PAH-contaminated soils and sediments. *Ecotoxicol Environ Saf* 30:171–179.
- Verschaeve L, Gilles J. 1995. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bull Environ Contam Toxicol* 54:112–119.
- Verschaeve L, Gilles J, Schoeters J, Van Cleuvenbergen R, De Fré R. 1993. The single cell gel electrophoresis technique or comet test for monitoring dioxin pollution and effects. In: Fiedler H, Frank H, Hutzinger O, Parzefall W, Riss A, Safe S, editors. *Organohalogen Compounds 11*. Federal Environment Agency, Austria. pp 213–216.
- Walsh P, El Adlouni C, Mukhopadhyay MJ, Viel G, Nadeau D, Poirier GG. 1995. <sup>32</sup>P-postlabelling determination of DNA adducts in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to PAH-contaminated soils. *Bull Environ Contam Toxicol* 54:654–661.
- Walsh P, El Adlouni C, Nadeau D, Fournier M, Coderre D, Poirier GG. 1997. DNA adducts in earthworms exposed to a contaminated soil. *Soil Biol Biochem* 29:721–724.
- White PA, Claxton LD. 2004. Mutagens in contaminated soil: A review. *Mutat Res* 567:227–345.
- Xiao N-W, Song Y, Ge F, Liu X-H, Ou-Yang Z-Y. 2006a. Biomarkers responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere* 65:907–912.
- Xiao R-Y, Wang Z, Wang C-X, Yu G, Zhu Y-G. 2006b. Genotoxic risk identification of soil contamination at a major industrialized city in northeast China by a combination of in vitro and in vivo bioassays. *Environ Sci Technol* 40:6170–6175.
- Zang Y, Zhong Y, Luo Y, Kong ZM. 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ Pollut* 108:271–278.
- Zhu J, Zhao ZY, Lu YT. 2006. Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and phenanthrene on earthworm. *J Environ Sci* 18:1210–1215.

Accepted by—  
R. Tice



## 2<sup>ème</sup> Partie : Génotoxicité des sols

### Article 3

#### THE INFLUENCE OF THERMAL DESORPTION ON GENOTOXICITY OF MULTI-POLLUTED SOIL

BONNARD Marc <sup>1</sup>, DEVIN Simon <sup>1</sup>, LEYVAL Corinne <sup>2</sup>, MOREL Jean-Louis <sup>3</sup> and VASSEUR Paule <sup>1</sup>.

<sup>a</sup> LIEBE, University Paul Verlaine – Metz, CNRS UMR 7146, France

<sup>b</sup> LIMOS, University Henri Poincaré – Vandœuvre-lès-Nancy, CNRS UMR 7137, France

<sup>c</sup> LSE UMR INPL/INRA 1120, Scientific Interest Group for Industrial Wastelands (GISFI) - Vandœuvre-lès-Nancy, France

*Ecotoxicology and Environmental Safety* (en ligne <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.02.023>)

**Le but de cette étude était de 1) comparer la génotoxicité des polluants des sols de la cokerie de Neuves-Maisons, avant (sol NM) et après (sol NMDT) un traitement de thermodésorption, et de 2) identifier les polluants susceptibles d'être responsables des effets génotoxiques.**

Le sol de la cokerie de Neuves-Maisons présente des teneurs élevées en HAP et en métaux lourds, dont certains congénères (HAP à 5 et 6 noyaux aromatiques ; métaux lourds : Cd, Cr VI, Ni) sont connus pour être cancérigènes chez l'Homme et les mammifères. Il était donc intéressant d'étudier la génotoxicité de ce sol de cokerie multi-contaminé (sol NM) bien qu'il n'ait montré aucune toxicité sur la survie des vers de terre adultes *Eisenia fetida*, sinon une faible inhibition de la reproduction (Article 1). La génotoxicité des polluants du sol de la cokerie de Neuves-Maisons traité par thermodésorption (sol NMDT) a également été étudiée chez les vers de terre et comparée à celle du sol brut (sol NM). Le traitement de thermodésorption a éliminé (> 90%) les contaminants organiques volatils du sol ( $\Sigma_{16\text{HAP}} = 1846$  et 101 mg/kg de sol, avant et après thermodésorption respectivement) mais n'a eu

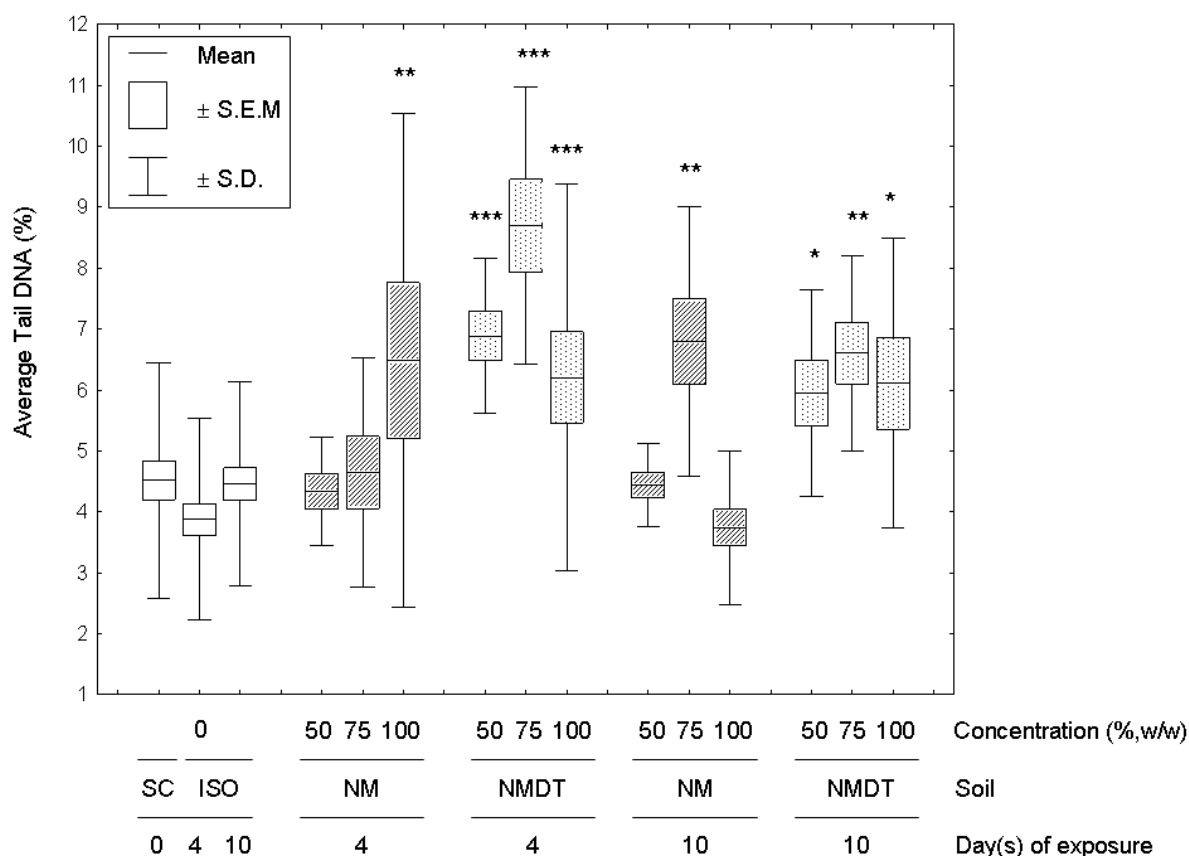
aucune incidence sur les teneurs en métaux lourds. Le tableau I présente les caractéristiques physico-chimiques des sols NM et NMDT. Les polluants majoritaires sont notés gras.

**Table I:** Caractéristiques physico-chimiques des sols contaminés (NM : avant et NMDT : après thermodésorption) et du sol artificiel témoin (ISO).

	Nb. de noyaux	Sol NM (3 échantillons)	Sols de cokerie		Sol artificiel ISO	Valeurs de référence *
			avant (NM) thermodésorption	après (NMDT)		
<b>Granulométrie sol</b>						
Soil type		Marne sableuse	Marne sableuse	Marne sableuse	Marne sableuse	
Argile (%)		12,8 ± 0,2	12,9	12,1	10,7	
Limon (%)		23,9 ± 1,5	21,3	20	8,2	
Sable (%)		64,8 ± 1,7	65,8	67,9	81,1	
pH (H2O)		7,07	6,69	8,03	6,5 ± 0,5	
Ratio C/N		26	25,5	67,5	39,9	
Carbone Organique (%)		7,25 ± 0,25	7,5	6,17	3,4	
Matière Organique (%)		12,5 ± 0,4	13	10,7	5,9	
<b>Métaux lourds (mg/kg soil p.s.)</b>						
Co		<b>27,3 ± 0,7</b>	<b>26,9</b>	<b>24,1</b>	nd	nd
Pb		<b>669 ± 26</b>	<b>639</b>	<b>725</b>	46	15-80
Cd		<b>2,2 ± 0,2</b>	<b>2,05</b>	<b>2,1</b>	0,1	0,2-0,7
Mo		<b>11,7 ± 0,6</b>	<b>11,1</b>	<b>12,4</b>	nd	nd
Cr total en tant que CrIII		<b>346 ± 24</b>	<b>340</b>	<b>491</b>	1,0	35-80
Cu		<b>104,5 ± 8</b>	<b>108</b>	<b>105</b>	1,2	10-70
Ni		<b>155 ± 91</b>	<b>104</b>	<b>105</b>	0,3	15-40
Zn		<b>2647 ± 143</b>	<b>2490</b>	<b>2690</b>	5,3	40-180
Hg		<b>4,0 ± 0,7</b>	<b>4,74</b>	<b>2,2</b>	< 0,05	nd
<b>HAP (mg/kg soil p.s.)</b>						
Naphtalene	2	<b>31 ± 5</b>	<b>36</b>	2,5	< 0,01	
Acenaphthlene	3	<b>1,7 ± 0,2</b>	<b>1,9</b>	< 1,5	< 0,01	
Acenaphtene	3	<b>84 ± 58</b>	<b>150</b>	1,2	< 0,01	
Fluorene	3	<b>59 ± 25</b>	<b>85</b>	1,6	< 0,01	
Phenanthrene	3	<b>173 ± 55</b>	<b>230</b>	16	< 0,01	
Anthracene	4	<b>62 ± 10</b>	<b>72</b>	4,6	< 0,01	
Fluoranthene	4	<b>260 ± 55</b>	<b>320</b>	23	< 0,01	
Pyrene	4	<b>203 ± 35</b>	<b>240</b>	15	< 0,01	
Benzo[a]anthracene	4	<b>125 ± 18</b>	<b>140</b>	6,7	< 0,01	
Chrysene	4	<b>108 ± 13</b>	<b>120</b>	6,8	< 0,01	
Benzo[b]fluoranthene	5	<b>107 ± 15</b>	<b>110</b>	6,9	< 0,01	
Benzo[k]fluoranthene	5	<b>63 ± 8</b>	<b>67</b>	3	< 0,01	
Benzo[a]pyrene	5	<b>107 ± 14</b>	<b>110</b>	4,5	< 0,01	
Dibenzo[ah]anthracene	5	<b>12 ± 2</b>	<b>13</b>	0,63	< 0,01	
Benzo[ghi]perylene	6	<b>66 ± 7</b>	<b>70</b>	3,9	< 0,01	
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	6	<b>77 ± 11</b>	<b>81</b>	4,4	< 0,01	
<b>∑16 PAHs</b>		<b>1539 ± 314</b>	<b>1 846</b>	<b>101</b>	< 0,01	<b>50</b>

Les dommages à l'ADN ont de la même façon été mesurés par l'essai comet au niveau des coelomocytes de vers de terre adultes, après une exposition *in vivo* de 4 et 10 jours à trois concentrations de sol contaminé (50%, 75% et 100%) dans le milieu d'essai. Ces concentrations de sol contaminé avaient inhibé de façon significative la reproduction des vers de terre exposés en comparaison de celle des vers témoins, même si l'inhibition n'a pas été supérieure à 50%.

**Cette étude a montré que les polluants des deux sols étudiés (sols NM et NMDT) étaient génotoxiques à court-terme vis-à-vis des vers de terre adultes (figure1).**



**Figure 1:** Pourcentage moyen d'ADN endommagé (dans la queue de la comète) chez les vers de terre exposés durant 0, 4 et 10 jours aux sols témoins (SC: Substrat de Culture, ISO : sol artificiel – *boxplots vides*) et aux différentes concentrations (50%, 75% et 100%) des deux sols contaminés (NM : sol brut – *boxplots hachurés*, NMTD : sol traité – *boxplots avec pointillés*). Les moyennes, écarts-types et écarts-types à la moyenne sont représentés. Les astérisques indiquent une augmentation significative des dommages à l'AND par rapport aux témoins correspondants (ISO 4, ISO 10) avec une valeur de \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  et \*\*\*  $p < 0.001$  (ANOVA).

Les polluants du sol brut NM (en hachuré) à la concentration de 100% se sont révélés génotoxiques après 4 jours d'exposition des vers de terre adultes. Après 10 jours, les dommages à l'ADN sont revenus à un niveau de base, suggérant comme pour le sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM, Article 2) la mise en place de systèmes de réparation des dommages à l'ADN. A la concentration de 75% de sol NM, un décalage dans l'apparition des dommages à l'ADN a été constaté. La plus faible concentration testée (50%) de sol NM n'a montré aucune génotoxicité vis-à-vis des coelomocytes de vers de terre.

De façon surprenante, **le sol NMDT traité par thermodésorption (en pointillé) s'est révélé être plus génotoxique vis-à-vis des vers de terre adultes que le sol non traité (sol NM), malgré l'abaissement de la contamination organique.** Une augmentation des dommages à l'ADN des coelomocytes de vers de terre a été observée après 4 jours d'exposition aux trois concentrations testées de sol NMDT (50%, 75% et 100%). Les effets génotoxiques ont persisté après 10 jours d'exposition des vers de terre. D'une manière générale, à temps et concentration d'exposition similaires, les polluants du sol traité par thermodésorption (sol NMDT) se sont révélés être plus génotoxiques vis-à-vis des vers de terre que les polluants du sol brut (sol NM). **Il est difficile de déterminer la responsabilité des polluants dans la génotoxicité du sol brut. Pour le sol traité par thermodésorption, les métaux lourds sembleraient majoritairement responsables des effets.** Le traitement de thermodésorption modifierait la nature, la composition de la matière organique du sol, et probablement la spéciation des métaux lourds et leurs liaisons avec les particules du sol, les rendant plus biodisponibles et génotoxiques vis-à-vis des vers de terre adultes.

La remédiation des sols contaminés ne devrait donc pas être uniquement basée sur les résultats des analyses physico-chimiques de la pollution mais devrait également intégrer les effets biologiques-écotoxicologiques.



Contents lists available at ScienceDirect

## Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ecoenv](http://www.elsevier.com/locate/ecoenv)

## The influence of thermal desorption on genotoxicity of multipolluted soil

M. Bonnard<sup>a,\*</sup>, S. Devin<sup>a</sup>, C. Leyval<sup>b</sup>, J.-L. Morel<sup>c</sup>, P. Vasseur<sup>a</sup><sup>a</sup> Laboratory Interactions Ecotoxicology, Biodiversity, Ecosystems (LIEBE), University Paul Verlaine-Metz, CNRS UMR 7146, Campus Bridoux, Rue du Général Délestraint, 57070 Metz, France<sup>b</sup> LIMOS, University Henri Poincaré, Vandœuvre-lès-Nancy, CNRS UMR 7137, France<sup>c</sup> LSE UMR INPL/INRA 1120, Scientific Interest Group for Industrial Wastelands (GISFI), Vandœuvre-lès-Nancy, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 December 2009

Received in revised form

22 February 2010

Accepted 28 February 2010

## Keywords:

Comet assay

*Eisenia fetida*

Genotoxicity

Heavy metals

Industrial wastelands

Polycyclic aromatic hydrocarbons

Remediation

Thermal desorption

Toxicity

## ABSTRACT

A multipolluted soil sampled from a former coking plant in Lorraine (France) was evaluated for its genotoxic effects on coelomocytes of the *Eisenia fetida* earthworm using the comet assay. The biological efficiency of thermal desorption of the contaminated soil was also investigated. The untreated polluted soil was shown to be genotoxic to earthworms. Although thermal desorption reduced the concentration of PAHs by 94% ( $\sum_{16} \text{PAHs} = 1846$  and  $101$  mg/kg before and after thermal desorption, respectively), the treatment did not eliminate the genotoxicity of soil pollutants to earthworms but increased it. The concentration of non-volatile metals did not change after thermal desorption. Among metals found in the treated soil, cadmium, chromium and nickel could explain the genotoxicity of the contaminated soil after thermal desorption. The treatment could increase the bioavailability and genotoxicity of heavy metals, through a modification of the soil's organic matter, the speciation of heavy metals and their binding to organic matter. This study underlines the importance of measuring biological effects, in order to evaluate the risk associated with formerly contaminated soils and the efficiency of remediation.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

In the late 20th century, the end of coal mining in the Lorraine region (France) left many industrial wastelands contaminated by a number of organic and metallic compounds. As a result, the management and rehabilitation of industrial wastelands are of growing concern due to the possible risk to human and environmental health of historical soil contaminants.

The regulation of contaminated soils and their remediation are based mainly on results of priority pollutant analyses. These analyses do not take into consideration the mobility, bioavailability and interaction (synergism, antagonism) of pollutants, which are determining factors in their toxicity to soil organisms. The bioavailability of soil pollutants may be influenced by intrinsic parameters of soil or external parameters such as ageing, weathering especially in formerly contaminated soils (Hatzinger and Alexander, 1995; Alexander, 2000). Hazard and risk assessment of chemically contaminated soils may lead to erroneous conclusions if biological investigations are not performed to obtain information on the true toxicity of formerly contaminated soils (Vasseur et al., 2008).

The aim of the present study is to investigate the genotoxicity of a contaminated soil before and after thermal desorption.

The soil of a former coking plant, whose activities stopped 15 years ago, was selected. Thermal desorption, which consisted in heating the contaminated soil to a temperature of 500 °C in a coke oven, eliminated most of volatile and semi-volatile compounds. Genotoxicity of the contaminated soil was investigated because it was polluted by PAH congeners of high molecular weight and by heavy metals like cadmium, chromium and nickel, which are known to be carcinogenic to humans and vertebrates (IARC, 1987, 1990, 1993). Genotoxicity was assessed up to 10 days of exposure to the soil samples in earthworms, which are bioindicators of soil quality due to their ecological function in the soil matrix. The integrity of DNA was measured using the comet assay on coelomocytes of the *Eisenia fetida* earthworm. These cells, located around the digestive tract, are exposed to soil pollutants ingested by the earthworm and are target cells, appropriate for studying genotoxicity of bioavailable soil pollutants (Bonnard et al., 2009). The biological efficiency of the soil remediation is also discussed.

## 2. Material and methods

## 2.1. Chemicals and test organisms

All reagents used in genotoxicity assays were of analytical or molecular biology grade. N-laurylsarcosinate, Triton X-100, dimethylsulfoxide (DMSO), and tris(hydroxymethyl)-aminoethane (Trizma Base®) were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Ethidium bromide, low and normal

\* Corresponding author. Fax: +33 3 87 37 85 12.

E-mail addresses: [marcbonnard@yahoo.fr](mailto:marcbonnard@yahoo.fr), [bonnard@univ-metz.fr](mailto:bonnard@univ-metz.fr) (M. Bonnard).

melting point agarose was provided by Eurobio (Les Ulis, Courtaboeuf, France). Slides, coverslips and all other reagents were purchased from VWR International (Merck, Eurolab, Fontenay-sous-Bois, France).

The *E. feida* earthworm species (Savigny, 1826) was selected as a test organism. Individuals chosen for this assay originated from our lab culture as detailed in the ISO 11268-1 standard method (1993). Earthworms were reared at room temperature in 20 L plastic containers containing 3–4 kg of a wet mix of horse manure and peat (50/50), with pH adjusted to  $6.0 \pm 0.5$  with calcium carbonate. The sensitivity of the earthworm to toxic pollutants was checked using the reference toxicant, chloroacetamide, whose  $LC_{50}$  value fell in the range of 20–80 mg/kg of soil (d.w.) as recommended in the international guideline ISO 11268-1 (1993). The study was conducted in accordance to national and international guidelines (directive 2007/526/EC of the European Commission) for the protection of animal welfare.

## 2.2. Sampling

A stock of the contaminated soil was dug up, sieved at 80 mm mesh size and stored for 4 years (2000–2004) on the site of the former coking plant in the Lorraine Region (France). In 2004, 30 tons from the stock of contaminated soil were treated with thermal desorption at a temperature of 500 °C in a mobile unit. Samples of the contaminated soil before or after the thermal treatment were then homogenized and sieved at 4 mm mesh size. From these stocks, 100 kg was sampled, analyzed for chemical pollution and stored at 13 °C. Dozens of kilograms were subsampled for ecotoxicological and physico-chemical analyses. The 16 PAH congeners (US-EPA) were analyzed in soil samples according to the AFNOR XP X33-012 standard method (2000). Total PAH concentrations reported in the present study corresponded to the sum of the concentrations of the 16 PAHs analyzed. Heavy metals in soils were analyzed with inductively coupled plasma-emission atomic spectrometry (ICP-SAE) (for Co, Cr, Cu, Ni and Zn) and with inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) (for Pb, Cd and Mo). Chromium speciation was studied and hexavalent chromium (CrVI) in soil was analyzed using molecular absorption spectrometry according to the NF T 90043 Standard Method (1988). Physico-chemical properties of soil such as total organic carbon, pH, grain size, texture and moisture content were measured according to ISO standards by INRA, the National Institute of Agronomic Research ([www.inra.fr](http://www.inra.fr), Arras, France).

## 2.3. Earthworm exposure

Earthworms were exposed for either 4 or 10 days to one of three concentrations (50%, 75% and 100% d.w.) of the contaminated soils tested (NM: soil before thermal desorption; NMDT: soil after thermal desorption). For testing concentrations of 50% and 75% of the contaminated soils, the soil samples were mixed with the ISO artificial soil medium (70% sand, 20% kaolinite clay, 10% 1-mm sieved finely ground sphagnum peat, pH adjusted with 0.37% of  $CaCO_3$ ) (Table 1). The soil moisture content was 50% of the water-holding capacity and all test vessels were kept at  $20 \pm 2$  °C in a light (400–500 lux)/dark cycle of 16 h/8 h. At least 10 earthworms were analyzed for each condition. Appropriate controls were analyzed in parallel. A second independent series of experiments was carried out on 8 additional earthworms to confirm genotoxicity results obtained with earthworms exposed for 4 days to the NMDT soil (100%) and with earthworms exposed for 10 days to the NM soil (100%). A total number of 18 individuals was investigated in these series. There were three groups of controls: controls sampled from the culture substrate and tested immediately for genotoxicity at time 0 ( $C_0$ ,  $n=37$ ) and controls exposed for either 4 or 10 days to the artificial ISO soil ( $C_4$  and  $C_{10}$ ,  $n=40$  and 39, respectively). Genotoxicity was measured separately in each earthworm of all control and exposed groups. Adult earthworms were 1-year old and sexually mature, as indicated by a fully developed clitellum. Their weight ranged between 300 and 600 mg.

## 2.4. Genotoxicity assay

At the end of the exposure time to the different soil concentrations, earthworms were sampled and rinsed in ice-cold PBS. Fecal matter was expelled by gentle massage and each earthworm was placed in an individual 50 mL-polypropylene tube filled with 3 mL of ice-cold PBS so as to electrically extrude coelomocytes. Each earthworm was excited with three mild electrical stimulations of 9 V for 5 s which caused the spontaneous release of coelomocytes. The number of extruded cells and the viability of the cellular population was checked microscopically using the trypan blue (0.5%) test before the comet assay was undertaken. The average percentage of cell viability was higher than 90% for all treatments (data not shown).

DNA damage was quantified by means of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay (SCGE) or the comet assay as described by Singh et al. (1988) with minor modifications. Positive controls consisting of coelomocytes exposed *in vitro* for 1 h to 25  $\mu$ M hydrogen peroxide were carried out in parallel to negative controls to ensure the validity of measurements (data not shown).

All steps described above were conducted under dim red light and performed at 4 °C to prevent any DNA damage. The cell suspension was carefully mixed with 1% low melting point agarose and was transferred onto a conventional microscope slide precoated with 0.8% normal melting point agarose. The gel was solidified on ice for 10 min and the cover slip was removed. A third layer of 0.5% low melting point agarose was added. Slides were left on ice again for 10 min to solidify before the cover slip was removed. Then slides were immersed in a cold lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM  $Na_2EDTA$ , 10 mM Tris – pH 10 – 1% N-laurylsarcosinate, with 1% Triton X-100 and 10% DMSO added immediately before use) for 2 h. After lysis, slides were washed with an electrophoresis buffer and placed in a horizontal electrophoresis tank filled with fresh alkaline buffer (1 mM  $Na_2EDTA$  and 300 mM NaOH, pH > 13) for 30 min to unwind DNA. Electrophoresis was performed in the same buffer for 15 min at 20 V, 300 mA. Slides were washed twice (10 min) in a neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5), dehydrated in absolute ethanol (5 min) and taken out to dry. Nuclear DNA was stained with 30  $\mu$ L of ethidium bromide (20  $\mu$ g/mL) and observed under UV light using an epifluorescence microscope (BX 60 Olympus) equipped with a dichroic filter and connected to an image analysis system (Comet Assay IV, Perceptive Instruments).

For each earthworm, two slides were prepared. On each slide, 50 non-overlapping comets were scored randomly on the central part of the gel and a total of 100 cells were examined per earthworm. At least 1000 cells were examined per modality tested. The percentage of DNA in the tail was used to express DNA damage. This parameter was chosen because of the small interexperimental and interelectrophoresis variation registered using this parameter (De Boeck et al., 2000).

## 2.5. Statistical analysis

Statistical analysis was conducted using Statistica 6.0 software. The average percentage of tail DNA of individuals was normalized with a log transformation and the treatments were compared by using 3-way analysis of variance (1st factor: soil; 2nd: concentration; 3rd: length of exposure). When significant, this was followed by a post-hoc least significant difference (LSD) Fisher test. The homogeneity of variance and the normality of data had previously been checked by means of the Bartlett and the Shapiro–Wilk tests, respectively. A Chi-square test was also used to compare the distribution of DNA-damaged cells between treatments. Four different classes were used: class 0 (0–20%, no DNA damage), class 1 (20–40%, little DNA damage), class 2 (40–60%, DNA damage) and class 3 (60–80%, high DNA damage). Dead or dying cells (>80%) were not taken into account for the analysis of results.

## 3. Results

### 3.1. Pollutants in soils

The physico-chemical characteristics of the two contaminated soils (NM and NMDT) are given in Table 1. Thermal desorption increased the pH and C/N ratio, while decreasing the organic carbon content.

The two contaminated soils differed also in their concentrations of PAHs. The sum of the concentrations of the 16 PAHs measured in the NM soil was  $1539 \pm 314$  mg/kg of soil (d.w.) from three independent soil samplings and 1846 mg/kg (d.w.) in the soil sample tested for genotoxicity. The thermal desorption treatment reduced the sum of the concentrations of the 16 PAHs in the soil sample to a level of 101 mg/kg (d.w.). Concentrations of metals in the soil were equivalent before and after thermal desorption.

### 3.2. Genotoxic effect

DNA damage in coelomocytes of earthworms exposed for 0, 4 or 10 days to the tested media is represented by the average percentage of tail DNA (Fig. 1) and by the cellular distribution of DNA damaged cells based on the degree of damage (Fig. 2 and Table 2). No dead or dying cells were recorded in these experiments.

In controls, coelomocytes had little damage. The DNA-damaged coelomocytes corresponded mostly to class 1 damage and were less than 4%. There was no significant difference in the average percentage of tail DNA between 0, 4 and 10 days of exposure.

**Table 1**  
The main physico-chemical characteristics of both contaminated soils (NM: before and NMDT: after thermal desorption) and the artificial ISO control soil.

	No. of rings	NM soil (3 samplings)	Coking plant soil		Artificial ISO soil	Reference values <sup>a</sup>
			Before (NM)	After (NMDT) thermal desorption		
<b>Soil texture</b>						
Soil type		Sandy loam	Sandy loam	Sandy loam	Sandy loam	
Clay (%)		12.8 ± 0.2	12.9	12.1	10.7	
Silt (%)		23.9 ± 1.5	21.3	20	8.2	
Sand (%)		64.8 ± 1.7	65.8	67.9	81.1	
pH (H <sub>2</sub> O)		7.07	6.69	8.03	6.5 ± 0.5	
C/N		26	25.5	67.5	39.9	
Organic carbon (%)		7.25 ± 0.25	7.5	6.17	3.4	
Organic matter (%)		12.5 ± 0.4	13	10.7	5.9	
<b>Heavy metals (mg/kg soil d.w.)</b>						
Co		27.3 ± 0.7	26.9	24.1	nd	nd
Pb		669 ± 26	639	725	46	15–80
Cd		2.2 ± 0.2	2.05	2.1	0.1	0.2–0.7
Mo		11.7 ± 0.6	11.1	12.4	nd	nd
Total Cr as Cr <sup>III</sup> <sup>b</sup>		346 ± 24	340	491	1.0	35–80
Cu		104.5 ± 8	108	105	1.2	10–70
Ni		155 ± 91	104	105	0.3	15–40
Zn		2647 ± 143	2490	2690	5.3	40–180
Hg		4.0 ± 0.7	4.74	2.2	<0.05	nd
<b>PAHs (mg/kg soil d.w.)</b>						
Naphthalene	2	31 ± 5	36	2.5	<0.01	
Acenaphthylene	3	1.7 ± 0.2	1.9	< 1.5	<0.01	
Acenaphthene	3	84 ± 58	150	1.2	<0.01	
Fluorene	3	59 ± 25	85	1.6	<0.01	
Phenanthrene	3	173 ± 55	230	16	<0.01	
Anthracene	4	62 ± 10	72	4.6	<0.01	
Fluoranthene	4	260 ± 55	320	23	<0.01	
Pyrene	4	203 ± 35	240	15	<0.01	
Benzo[a]anthracene	4	125 ± 18	140	6.7	<0.01	
Chrysene	4	108 ± 13	120	6.8	<0.01	
Benzo[b]fluoranthene	5	107 ± 15	110	6.9	<0.01	
Benzo[k]fluoranthene	5	63 ± 8	67	3	<0.01	
Benzo[a]pyrene	5	107 ± 14	110	4.5	<0.01	
Dibenzo[ah]anthracene	5	12 ± 2	13	0.63	<0.01	
Benzo[ghi]perylene	6	66 ± 7	70	3.9	<0.01	
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	6	77 ± 11	81	4.4	<0.01	
<b>Σ16 PAHs</b>		<b>1539 ± 314</b>	<b>1846</b>	<b>101</b>	<b>&lt;0.01</b>	<b>50</b>

<0.01: < quantification limits.

nd: Not determined.

<sup>a</sup> In natural soils (BRGM, 2007).

<sup>b</sup> Cr VI below detection limits (0.1 mg/kg soil d.w.).

On the other hand, the 4 or 10 day exposure of earthworms to contaminated soils (NM or NMDT) increased the DNA breakage.

After 4 days of exposure to the NM soil (100%), earthworms exhibited an average percentage of tail DNA significantly higher than the one in the corresponding controls (C<sub>4</sub>) (Fig. 1). The increase in DNA damage was significant and concerned cells in class 1 (6.7%), class 2 (1.8%) and class 3 (0.5%) (Table 2). A significantly higher percentage of class 1 (3.5%) and class 3 (0.3%) cells was observed in earthworms exposed to 75% of the NM soil, but the difference was not statistically significant if the average percentage of tail DNA was considered.

A 4-day exposure to the NMDT soil concentrations tested (50%, 75% and 100%) significantly increased the average percentage of tail DNA in the exposed earthworms (Fig. 1) and the percentage of DNA-damaged cells in the three classes 1, 2 and 3 (Fig. 2 and Table 2). DNA damaged coelomocytes were significantly higher in the thermodesorbed soil (NMDT) than in the soil before treatment (NM), as attested by the average percentage of tail DNA or by cellular distribution.

When the exposure time was extended to 10 days, the average percentage of tail DNA in the earthworms exposed to the NM soil

(100%) returned to a level similar to the controls. There was no significant increase in DNA-damage at the concentration of 50%. On the other hand, the increase of DNA-damaged coelomocytes became significant at 75% of the NM soil.

In earthworms exposed for 10 days to the treated soil NMDT, the average percentage of tail DNA remained significantly higher than controls at all concentrations tested (50%, 75% and 100%) (Fig. 1). The average percentage of tail DNA and the distribution of DNA-damaged cells were similar to the results after 4 days at the concentrations of 50% and 100%. At the concentration of 75%, DNA alteration was more pronounced after 10 days. DNA damage was significantly higher in the thermodesorbed soil than before treatment after 10 days of exposure, as already observed after 4 days.

#### 4. Discussion

The studied soil originating from a former coking plant was characterized by high concentrations of PAH pollutants. The total concentration of the 16 PAHs in the contaminated NM soil was around 30 times higher than the French reference value of

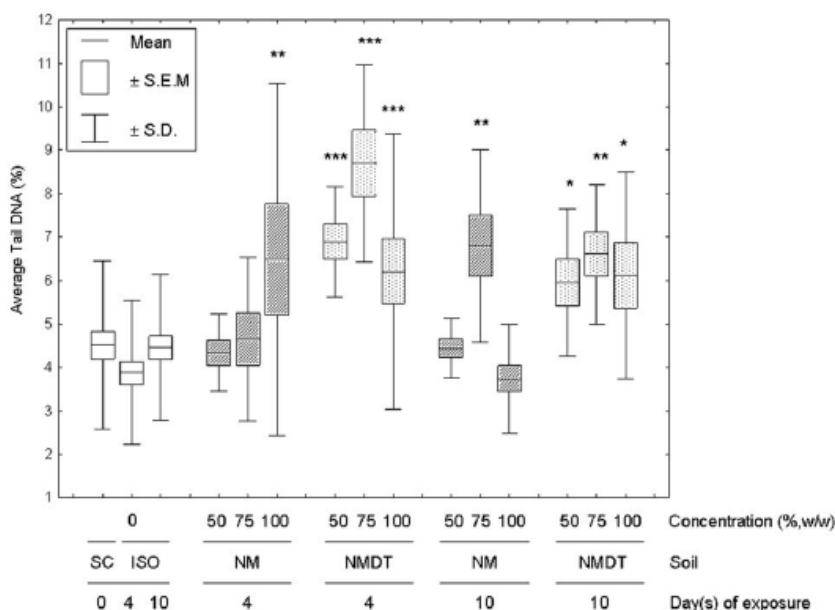


Fig. 1. Box-plot representation of the average percentage of tail DNA in coelomocytes of earthworms exposed for 0, 4 or 10 days to the control soils (SC: substrate of culture, ISO: artificial soil—*blank boxplots*) and to the different concentrations (50%, 75% and 100%) of the two contaminated soils (NM: before treatment—*hatched boxplots*, NMDT: after thermal desorption—*dotted boxplots*). The mean, standard error (SEM) and standard deviation (SD) are represented by bars, the edges of boxes and the non-outlier ranges, respectively. Asterisks denote a significant increase in comparison with the corresponding controls (controls exposed for 4 or 10 days) with \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  (post-hoc LSD Fisher test).

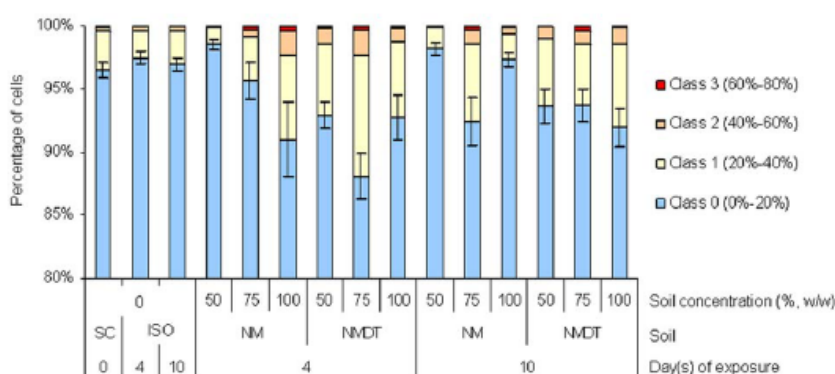


Fig. 2. DNA damage in coelomocytes of earthworms exposed for 0, 4 or 10 days to control soils (SC: substrate of culture, ISO: artificial soil) or contaminated soils (NM: without treatment, NMDT: after thermal desorption). The standard error of the mean (SEM) was given only for class 0 cells.

50 mg/kg (d.w.) in natural soils (BRGM, 2007). PAHs were composed of 2% of 2 ring-PAHs, 25% of 3 rings, 48% of 4 rings and 25% of 5 or 6 rings. Thermal desorption eliminated PAHs, whose total concentration decreased by 94% (from 1846 to 101 mg PAHs/kg d.w.). The proportion of PAHs according to their number of rings was similar before and after the treatment. On the other hand, thermal desorption did not change concentrations of metallic compounds, which were found at a high level in the both contaminated soils. Zinc concentration was about 15 times the upper limit of reference values in natural soils, lead 9 times, chromium 6 times, cadmium 3 times, nickel 2.6 times and copper 1.5 times (BRGM, 2007).

The decrease of the PAHs concentration was not accompanied by a decrease of soil genotoxicity, as shown in earthworms after a 4-day exposure. Although PAH concentrations were drastically reduced, the soil treated by thermal desorption (NMDT) was

shown to be more genotoxic to earthworms than the untreated soil (NM). In addition, genotoxicity was seen at the lowest concentration tested (50%) of the treated soil whereas this concentration was not genotoxic before treatment. DNA damage persisted also with the exposure time contrary to the NM soil.

In the untreated NM soil (100%), DNA damage did not persist with the length of exposure. It can be supposed that DNA repair occurred in earthworm coelomocytes between day 10 and day 4. Qiao et al. (2007) also observed a repair of DNA damage with the duration of exposure in coelomocytes of earthworms exposed in soils irrigated by contaminated wastewaters, DNA damage being lower after 14 days than after 3 and 7 days of exposure.

In the present study, the analysis of cellular distribution revealed that repair was effective for DNA-damaged cells in class 1 and class 2 but not for cells with greater DNA damage (class 3 cells). In a previous study dealing with genotoxicity in



Table 2

DNA damage in coelomocytes of earthworms exposed for 0, 4 or 10 days to control soils (SC: substrate of culture, ISO: artificial soil) or contaminated soils (NM: without treatment, NMDT: after thermal desorption).

Treatment	Controls		Exposed earthworms				
	SC or ISO	NM				NMDT	
Soil	0%	50%	75%	100%	50%	75%	100%
<b>0 day</b>							
Class 0 (0–20%)	96.5 ± 0.6						
Class 1 (20–40%)	3.1 ± 0.6						
Class 2 (40–60%)	0.3 ± 0.1						
Class 3 (60–80%)	0.1 ± 0.05						
<b>4 days</b>							
Class 0 (0–20%)	97.4 ± 0.5	98.5 ± 0.4	95.6 ± 1.5	91 ± 2.9	92.9 ± 1.1	88 ± 1.8	92.7 ± 1.8
Class 1 (20–40%)	2.15 ± 0.45	1.4 ± 0.4	3.5 ± 1.2*	6.7 ± 1.9***	5.6 ± 0.8***	9.7 ± 1.5***	6 ± 1.5***
Class 2 (40–60%)	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.6 ± 0.3	1.8 ± 0.9***	1.3 ± 0.5***	2 ± 0.6***	1 ± 0.35**
Class 3 (60–80%)		0.01 ± 0.03	0.3 ± 0.15**	0.5 ± 0.35***	0.2 ± 0.2*	0.3 ± 0.2**	0.3 ± 0.1**
<b>10 days</b>							
Class 0 (0–20%)	97 ± 0.5	98.2 ± 0.5	92.4 ± 1.85	97.3 ± 0.5	93.6 ± 1.4	93.7 ± 1.25	91.9 ± 1.5
Class 1 (20–40%)	2.6 ± 0.45	1.7 ± 0.5	6.1 ± 1.25***	2 ± 0.5	5.4 ± 1.2***	4.8 ± 1.2***	6.6 ± 1.2***
Class 2 (40–60%)	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1	1.2 ± 0.8**	0.5 ± 0.1	1 ± 0.3*	1.1 ± 0.25*	1.4 ± 0.45***
Class 3 (60–80%)			0.3 ± 0.2	0.2 ± 0.1		0.4 ± 0.2	0.1 ± 0.1

Results are expressed as the average percentage of cells in each class of DNA damage ( $\pm$  SEM) [class 0 (0–20%): no DNA damage; class 1 (20–40%): little DNA damage; class 2 (40–60%): DNA damage, class 3 (60–80%): high DNA damage]. Asterisks denote a significant difference in cellular distribution in exposed earthworms in comparison with the ones from the corresponding controls (controls exposed for 4 or 10 days to ISO soil) with \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\* $p < 0.001$  ( $\chi^2$  test).

earthworms of the soil heavily contaminated with PAHs, a repair of DNA damage of class 1 cells was also observed in earthworm coelomocytes (Bonnard et al., 2009). This study and the present one suggest that repair systems are more efficient in cells with a low level of DNA damage.

According to Ching et al. (2001) DNA repair systems might be activated after the invertebrate tissue has accumulated sufficient lesions above a threshold level. In other terms, kinetic of activation of DNA repair systems may depend on the degree of lesions. This may explain that DNA damage appeared higher after 10 days of exposure at 75% than at 100% of the NM soil. The kinetic of occurrence of DNA damage was slower in earthworms exposed to 75% than at 100% where repair occurred faster and within the 10-day exposure.

In the NM soil, both PAHs and heavy metals may be involved in genotoxicity. DNA damage was observed in earthworms exposed to soil concentrations of 75% and 100%, corresponding to a total PAH concentration of 1385 and 1846 mg/kg soil (d.w.), respectively. These concentrations were in the same range as PAH concentrations (520 and 1050 mg/kg soil) responsible for genotoxic effects in earthworms exposed to a coking plant soil previously studied (Bonnard et al., 2009). Other authors revealed genotoxicity of PAH-contaminated soils on coelomocytes of earthworms. A significant increase of DNA damage was observed in coelomocytes of earthworms exposed for 15 or 21 days to a PAH-contaminated soil, at a concentration lower than the ones in our study ( $\sum_{16} \text{PAHs} = 96 \text{ mg/kg soil d.w.}$ ) (Di Marzio et al., 2005). Qiao et al. (2007) demonstrated that PAHs were responsible for the DNA damage observed in coelomocytes of earthworms exposed to field soils irrigated by wastewaters contaminated with PAHs and other persistent organic compounds.

Responsibility of heavy metals in genotoxicity of the treated NMDT soil is preponderant, the major fraction of PAHs being eliminated by the treatment. The fact that genotoxicity is higher after thermodesorption than before treatment allowed us to minimize the influence of PAHs in genotoxicity of the soil, and to put forward the hypothesis that bioavailability and speciation of metals was modified by the treatment. Biache et al. (2008), in a study on the same coking plant soils as tested here, revealed that

thermal desorption modified the organic composition and the soil structure. Thermal desorption was shown to eliminate the most thermolabile organic fraction and to condense the refractory organic matter, as attested by the increase in the C/N ratio in the present study (Table 1). The soil organic matter is known to act as a trap for metals, whose bioavailability is reduced by binding. Changes in the nature and the composition of the soil organic matter by thermal desorption will modify links of metals to organic components and metal speciation, rendering metals more bioavailable and genotoxic to earthworms than before treatment.

The International Agency of Research on Cancer (IARC) reported that cadmium, hexavalent chromium and nickel are carcinogenic compounds (Group 1) to humans and vertebrates (IARC, 1990, 1993). Genotoxicity of these heavy metals to earthworms was already investigated for cadmium (Zhu et al., 2006; Li et al., 2009), hexavalent chromium (Manerikar et al., 2008) and nickel (Reinecke and Reinecke, 2004). Heavy metals can cause DNA damage either through the induction of reactive oxygen species (ROS) which interact with DNA bases and cause DNA strand breaks, either through the inhibition of DNA repair processes.

In the present study, cadmium concentrations showing genotoxic effects (50%, 75% and 100% of the NMDT soil) ranged from 1 to 2 mg/kg of soil (d.w.). Recently Li et al. (2009) observed a significant increase of DNA damage in coelomocytes of *E. fetida* exposed for 7 days to an artificial ISO soil spiked with cadmium concentrations of 0.1, 1 and 10 mg/kg of soil (d.w.). Therefore responsibility of cadmium in the genotoxicity of the NMDT soil is possible.

Manure substrate spiked with nickel chloride concentrations of 60, 240 and 480 mg/kg of soil (d.w.) revealed to be genotoxic to the same species of earthworm after a 4-week exposure (Reinecke and Reinecke, 2004). In the present study, nickel concentrations in the soil samples showing genotoxic effects to earthworm's coelomocytes were in the same range of concentrations as the ones tested by these authors (52–105 mg Ni/kg of soil d.w.). Responsibility of nickel in the genotoxicity of the soil to earthworms is plausible.

In their study, Manerikar et al. (2008) observed that hexavalent chromium, at concentrations from 1 to 100 mg/kg of soil

(d.w.), induced DNA damage in coelomocytes of another earthworm species *Dichogaster curgensis*. Only the trivalent form of chromium was found in our soil samples. While hexavalent chromium is classified as carcinogenic by IARC (group 1), trivalent chromium is reported in group 3 of “unclassified substances as carcinogenic to humans” due to the lack in databases. The extensive literature on genotoxic effects of Cr(III) compounds includes conflicting information, with both negative and positive findings. Trivalent chromium, despite its lower ability to pass cell membranes compared to hexavalent chromium, would have the potential to react with macromolecules such as DNA and cause DNA damages (Eastmond et al., 2008). A study in our laboratory revealed genotoxicity of the artificial ISO soil spiked with trivalent chromium (as chromium nitrate) at a concentration similar to the one in the present study to coelomocytes of *E. fetida* mature earthworms after a short-term exposure (pers. comm.). The implication of chromium in genotoxicity of NMDT soil samples cannot be excluded.

## 5. Conclusion

In the present study investigating genotoxicity of a coking plant soil formerly contaminated by PAHs and metals, thermal desorption was shown to be efficient in the elimination of PAHs (by > 90%) and volatile compounds, but not in the elimination of metals and in the reduction of genotoxicity to earthworms. Thermal desorption would increase bioavailability of metal pollutants and thereby their genotoxicity to earthworms. Among heavy metals found in the soil samples, cadmium, nickel and chromium would be responsible for their genotoxicity. The present study shows that efficient remediation of contaminated soils should not only be based on the reduction or the disappearance of priority pollutants shown by traditional chemical analyses. The use of bioassays is necessary to define acceptable clean-up standards (Loehr and Webster, 1996) and to evaluate the true efficiency of remediation treatments. Accordingly, biological responses should be taken into consideration in decision-making regarding remediation and strategies for remediation of contaminated soils. Biological approaches are necessary to confirm reduction of toxicity.

## Acknowledgments

The authors are grateful to Tracy Carmona for the English form of this paper. This study was carried out within the Scientific Interest Group for Industrial Wastelands (GIS.F.I.). The authors also acknowledge the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and the Region Lorraine for the grant attributed to this study, the research network CNRS-ERICHE and the French National Research Agency (ANR-2008-CESA-010 Multipolsite) for their financial support.

## References

- AFNOR (Association Française de Normalisation), 2000. Characterisation of sludges-determination of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB), norme XP, X33–012.
- Alexander, M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4259–4265.
- Biache, C., Mansuy-Huault, L., Faure, P., Munier-Lamy, C., Leyval, C., 2008. Effects of thermal desorption on the composition of two coking plant soils: impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environ. Pollut.* 156 (3), 671–677.
- Bonnard, M., Eom, I.-C., Morel, J.-L., Vasseur, P., 2009. Genotoxic and reproductive effects in the *Eisenia fetida* earthworm exposed to an industrially polluted soil. *Environ. Mol. Mutagen.* 50, 60–69.
- BRGM, 2007. Bases de données relatives à la qualité des sols: Contenu et utilisation dans le cadre de la gestion des sols pollués. 27 p. <[http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/Documents/Appui/BD\\_Sol\\_existantes\\_et\\_gestion\\_SSP\\_V0-022007.pdf](http://www.sites-pollues.ecologie.gouv.fr/Documents/Appui/BD_Sol_existantes_et_gestion_SSP_V0-022007.pdf)>.
- Ching, E.W.K., Siu, W.H.L., Lam, P.K.S., Xu, L., Zhang, Y., Richardson, B.J., Wu, R.S.S., 2001. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: dose- and time-dependent relationships. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 603–610.
- De Boeck, M., Touil, N., De Visscher, G., Aka Vande, P., Kirsch-Volders, M., 2000. Validation and implementation of an internal standard in Comet assay analysis. *Mutat. Res.* 469 (2), 181–197.
- Di Marzio, W.D., Saenz, M.E., Lemièrre, S., Vasseur, P., 2005. Improved single-cell gel electrophoresis assay for detecting DNA damage in *Eisenia foetida*. *Environ. Mol. Mutagen.* 46, 246–252.
- Eastmond, D.A., MacGregor, J.T., Sleninski, R.S., 2008. Trivalent chromium: assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Crit. Rev. Toxicol.* 38, 173–190.
- Hatzinger, P.B., Alexander, M., 1995. Effect of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* 29, 537–545.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. *Overall Evaluations of Carcinogenicity: An updating of IARC Monographs*, vols. 1–42, Lyon, France.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1990. Chromium, nickel and welding. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemical to Humans*, vol. 49, Lyon, France.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemical to Humans*, vol. 58, Lyon, France.
- International Standard Organization (ISO 11268-1), 1993. Soil quality – effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*) – Part 1: determination of acute toxicity using artificial soil substrates.
- Li, M., Liu, Z., Xu, Y., Cui, Y., Li, D., Kong, Z., 2009. Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Chemosphere* 74 (5), 621–625.
- Loehr, R.C., Webster, M.T., 1996. Performance of long-term field-scale bioremediation processes. *J. Hazard Mater.* 50, 105–128.
- Manerikar, R.S., Apte, A.A., Ghole, V.S., 2008. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity assessment of Cr(VI) using comet assay in earthworm coelomocytes. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 25, 63–68.
- NF T 90043, 1988. Essais des eaux. Dosage du chrome (VI) – Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire.
- Qiao, M., Chen, Y., Wang, C.-X., Wang, Z., Zhu, Y.-G., 2007. DNA damage and repair process in earthworm after *in-vivo* and *in-vitro* exposure to soils irrigated by wastewaters. *Environ. Pollut.* 148 (1), 141–147.
- Reinecke, S.A., Reinecke, A.J., 2004. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 46, 208–215.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for the quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- 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.
- Zhu, J., Zhao, Z.Y., Lu, Y.T., 2006. Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and phenanthrene on earthworm. *J. Environ. Sci.* 18 (6), 1210–1215.

# *Discussion*

## Discussion

Cette recherche concerne l'impact de sols de friches industrielles anciennement contaminés par des substances génotoxiques telles que les congénères des HAP de haut poids moléculaire (5-6 noyaux aromatiques) et les métaux lourds (Cd, Cr, Ni), et l'établissement d'une relation **entre la biodisponibilité des polluants, leur génotoxicité et leurs effets populationnels** chez les vers de terre.

Les biomarqueurs moléculaires, cellulaires, physiologiques... sont de plus en plus étudiés chez les organismes du sol, les vers de terre en particulier du fait de leur sensibilité, leur spécificité vis-à-vis de certaines catégories de xénobiotiques, et de leur réponse précoce. Une des recommandations de l'*International Workshops on Earthworm Ecotoxicology (IWEE)* est d'établir la signification écologique de changements biochimiques, en reliant la réponse des biomarqueurs étudiés à celle des paramètres du cycle de vie ou populationnels (Spurgeon *et al.*, 2003).

Compte tenu de l'implication du génome dans l'ensemble du métabolisme cellulaire, l'exposition à des substances génotoxiques peut affecter le développement, la reproduction voire la survie des individus et compromettre la dynamique de croissance des populations exposées (Vasseur *et al.*, 2008b). L'essai comet est aujourd'hui une technique privilégiée pour mesurer les dommages à l'ADN du fait de ses nombreux avantages tels que sa sensibilité, son application théorique à tout type de cellule eucaryote, son approche cellule par cellule, son coût modéré et sa rapidité d'application... (Rojas *et al.*, 1999, Tice *et al.*, 2000). Cet essai a révolutionné le domaine de la génotoxicité environnementale (ou écogénotoxicologie). Il a été appliqué avec succès à différents groupes d'organismes phylogénétiquement différents, tels que les plantes inférieures/supérieures, les oligochètes, les polychètes, les planaires, les crustacés, les insectes, les bivalves, les gastéropodes, les astérides et échinides, les poissons, les amphibiens et les mammifères (Jha, 2008). Plusieurs études, portant essentiellement sur des organismes aquatiques, ont montré que la mesure des dommages à l'ADN par l'essai comet est un biomarqueur de génotoxicité pertinent car prédictif d'effets physiologiques à plus long terme.

Une corrélation positive a été observée entre les dommages à l'ADN et **1)** l'inhibition de la croissance de moules bleues *Mytilus edulis* provenant de sites pollués de la baie de San Diego (CA) (Steinert *et al.*, 1998a, 1998b) et du succès de fertilisation chez une autre espèce de moule (Lee & Steinert, 2003) ; **2)** l'inhibition du développement embryonnaire chez l'huitre creuse *Crassostrea gigas* exposée à un HAP (B[a]P) (Wessel *et al.*, 2007), chez la crevette *Palaemonetes pugio* exposée à un composé génotoxique de référence (4 nitroquinoline-N-oxide) et provenant de sites contaminés en chrome (Lee & Steinert, 2003) ; **3)** des perturbations comportementales (retournement des individus) et physiologiques (taux d'élimination) respectivement chez l'étoile de mer *A. rubens* et la moule bleue *M. edulis*, exposées à des composés génotoxiques de référence – le méthylméthanesulfonate (MMS) et le cyclophosphamide (CP) (Canty *et al.*, 2009).

Ce biomarqueur de génotoxicité a été très peu étudié chez les invertébrés terrestres, en comparaison des invertébrés aquatiques. L'intérêt de ce sujet de recherche tenait également dans la mise en place et la validation de ce biomarqueur de génotoxicité chez les vers de terre.

La présente étude a montré que la mesure des dommages à l'ADN au niveau des coelomocytes du ver de terre *E. fetida* était tout à fait appropriée pour déterminer la génotoxicité des polluants des sols contaminés. Un faible degré de dommages à l'ADN a été observé au niveau des coelomocytes des vers témoins. Le pourcentage moyen d'ADN endommagé (dans la queue de la comète) variait entre 4% et 5% (écart-type  $\pm 2\%$ ) et les cellules présentant un ADN endommagé se trouvaient essentiellement dans la classe 1 (% Tail DNA compris entre 20% et 40%). Ce faible degré de dommages à l'ADN est lié au métabolisme et donc inévitable (Lutz, 1998). D'autres auteurs ont montré un degré identique de dommages à l'ADN au niveau des coelomocytes de vers témoins *E. fetida* (Li *et al.*, 2009 ; Voua Otomo & Reinecke, 2009). Aucune variation significative des dommages à l'ADN n'a été observée avec l'exposition au substrat artificiel ISO, démontrant ainsi sa pertinence en tant que milieu d'essai dans la présente étude. Pour une meilleure interprétation des résultats de génotoxicité et du fait de la variabilité plus prononcée de la réponse des vers exposés, il nous semblait indispensable de mesurer les effets génotoxiques sur au moins dix individus. Le nombre d'individus par condition testée est supérieur à celui de la majorité des essais comet menés *in vivo* chez les vers de terre.

Notre étude a montré **qu'une fraction de la pollution des sols de cokeries étudiés était toujours biodisponible et génotoxique vis-à-vis des vers de terre.** Les dommages à l'ADN

ont été du même ordre de grandeur chez les vers de terre exposés aux concentrations génotoxiques des sols HOM, NM et NMDT. Le pourcentage moyen d'ADN dans la queue de la comète était compris entre 6,5% et 10%. Li *et al.* (2009) ont observé un degré de dommages à l'ADN similaire à celui de la présente étude chez des vers de terre *E. fetida* exposés pendant 7 jours à un sol dopé en cadmium à des concentrations de 0.1, 1 et 10 mg/kg (entre 6.5% et 12%). Le test comet donne une image instantanée de la génotoxicité des polluants pour les populations cellulaires. Les variations des dommages à l'ADN que l'on a pu observer chez les vers de terre exposés résultent de l'équilibre entre la génération des dommages à l'ADN et la réparation qui peut elle-même générer des cassures par excision-resynthèse (Speit & Hartmann, 1995).

L'étude à 10 jours a montré que **les vers de terre avaient la capacité de lutter contre la génotoxicité des polluants des sols, en mettant en place des systèmes de réparation des dommages à l'ADN**. Les systèmes de réparation se sont avérés efficaces pour les coelomocytes dont l'ADN était faiblement endommagé (classes 1 et 2), mais insuffisants pour les cellules avec un degré d'endommagement de l'ADN plus élevé (classe 3). L'analyse statistique de la distribution des cellules par classe de dommages (en fonction du % Tail DNA) a notre préférence car elle est plus discriminante que l'analyse globale du pourcentage moyen d'ADN endommagé, notamment pour la réversibilité des dommages à l'ADN. Tice *et al.* (2000) considèrent d'ailleurs cette approche plus informative. La réparation complète ou incomplète des dommages à l'ADN est intervenue chez les vers de terre exposés aux plus fortes concentrations testées des sols de cokeries, suggérant que les systèmes de réparation des dommages à l'ADN seraient activés à partir d'un niveau « seuil » de lésions au niveau des tissus (Ching *et al.*, 2001).

**Les polluants majoritaires dans les sols étudiés seraient principalement responsables des effets génotoxiques observés chez les vers de terre.** Les HAP dans le sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM) seraient majoritairement responsables des effets observés, bien que l'implication des métaux lourds comme le cadmium, le nickel ou le chrome trivalent ne puisse être exclue. La responsabilité du chrome hexavalent, qui est connu pour être génotoxique vis-à-vis des vers de terre (Manerikar *et al.*, 2008a), peut être exclue en raison de son absence dans les sols étudiés. Pour le sol non traité de la cokerie de Neuves-Maisons (sol NM), il est difficile de faire la part entre les HAP et les métaux lourds pour expliquer les effets génotoxiques vis-à-vis des vers de terre.

**De façon surprenante, les polluants du sol de la cokerie de Neuves-Maisons thermodésorbé (sol NMDT) se sont révélés plus génotoxiques que les polluants du sol non traité (sol NM), malgré l'abaissement de la contamination organique par le traitement.** La responsabilité des HAP dans la génotoxicité du sol thermodésorbé (sol NMDT) peut être écartée, la majeure partie étant éliminée par le traitement. Les métaux lourds seraient donc principalement responsables des effets génotoxiques. Biache *et al.* (2008) ont montré que le traitement de thermodésorption modifiait la structure et la composition de la matière organique du sol. La désorption thermique élimine la fraction organique thermolabile et condense la matière organique réfractaire du sol. Une réduction de la quantité de la matière organique du sol, du nombre de sites de fixation des métaux lourds pourrait avoir un rôle sur leur biodisponibilité et leur génotoxicité. **Le traitement de thermodésorption modifierait à la fois 1) la nature et la composition de la matière organique du sol, 2) la spéciation des métaux lourds, 3) les liaisons entre la matière organique et les métaux, les rendant ainsi plus biodisponibles et génotoxiques vis-à-vis des vers de terre.** Des transformations chimiques sont connues pour avoir lieu lors des traitements de thermodésorption, telles que la formation de dioxines, de furanes ainsi que la dégradation et l'isomérisation des HAP. Ces produits de dégradation et de transformation sont rarement mesurés dans les sols. Biache *et al.* (2008) ont mesuré les teneurs en HAP alkylés ( $\Sigma_{\text{alk-HAP}} = 5.29 \text{ mg/kg}$ ), HAP oxygénés ( $\Sigma_{\text{o-HAP}} = 17.12 \text{ mg/kg}$ ) et HAP sulfurés ( $\Sigma_{\text{s-HAP}} = 4.17 \text{ mg/kg}$ ) dans des échantillons de sol thermodésorbé (sol NMDT). Ces teneurs sont faibles en regard de celles en métaux lourds et nous conduisent à considérer leur implication dans les effets biologiques comme minime.

Pour comprendre les conséquences des dommages à l'ADN, la réponse des vers de terre à l'exposition aux sols contaminés a été étudiée à différents niveaux d'organisation biologique, au niveau moléculaire et au niveau physiologique. La sensibilité du biomarqueur de génotoxicité a été comparée à celle des paramètres biologiques classiquement étudiés chez les vers de terre : la survie et la reproduction.

**Une plus grande sensibilité du biomarqueur de génotoxicité a été observée en comparaison de la survie des vers de terre.** En effet, des dommages à l'ADN ont été mesurés à court-terme à des concentrations sublétales de sols contaminés.

Dans le cas du sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM), **les dommages à l'ADN ont été suivis à plus long-terme d'une inhibition importante de la production de cocons et de juvéniles. Les deux essais ont montré une sensibilité équivalente,** avec une valeur de

LOEC (*Low Observed Effect Concentration*) égale à 20% de sol contaminé (sol HOM) dans le milieu d'essai. Les effets génotoxiques mesurés à court-terme chez les vers de terre exposés aux sols de la cokerie de Neuves-Maisons non traité (sol NM) et thermodésorbé (sol NMDT) n'ont pas été suivis d'effets sur la reproduction (inhibition inférieure à 50%). Néanmoins, les concentrations de sol NM et NMDT qui se sont révélées génotoxiques à court-terme pour les vers de terre exposés ont induit une inhibition significative de la production de cocons (de 25% à 35%) et de juvéniles (de 30% à 45%) par rapport à celle des vers témoins (résultats non montrés).

Même si une relation de cause à effet peut être difficilement établie entre les dommages à l'ADN des coelomocytes et l'inhibition de la reproduction, les résultats de la présente étude suggèrent que **la génotoxicité des polluants pourrait être à l'origine de l'inhibition de la reproduction des vers de terre. Ce biomarqueur de génotoxicité pourrait être alors utilisé comme un indicateur précoce de perturbations physiologiques.**

Les dommages à l'ADN influenceraient le métabolisme énergétique, la croissance et le succès reproducteur des individus exposés (Atienzar *et al.*, 2001 ; Atienzar & Jha, 2004).

Les coelomocytes interviennent principalement dans les processus immunitaires, dans le maintien de la balance ionique et du pH, dans le transport et le stockage de constituants énergétiques (lipides, glycogène)... . De par leurs multiples fonctions, les coelomocytes renseignent sur « l'état de santé » (condition) des vers de terre. Dans la présente étude, les altérations à l'ADN mesurées à court-terme pourraient perturber le fonctionnement cellulaire, à plus long terme et indirectement la reproduction des individus.

L'apparition à court-terme des dommages à l'ADN indique que les systèmes de défense mis en place par les vers de terre pour lutter contre le stress chimique ont été saturés. Les vers de terre sont capables de stocker les métaux lourds bioaccumulés tels que le cadmium, le cuivre, le zinc au niveau des granules (ou chloragosomes) des chloragocytes (catégorie de coelomocytes). Plusieurs auteurs ont isolé et caractérisé les métallothionéines, protéines de faible poids moléculaire montrant une forte affinité de liaison des ions métalliques, au niveau de coelomocytes des vers de terre *L. rubellus* (Stürzenbaum *et al.*, 1998) et *E. fetida* (Grüber *et al.*, 2000 ; Brulle *et al.*, 2006 ; Demuynck *et al.*, 2006, 2007 ; Brulle *et al.*, 2009). Lemière *et al.* (2009) ont montré une induction du gène codant pour la Cd-Métallothionéine (Cd-MT) chez les vers de terre *E. fetida* exposés pendant 56 jours à deux sols urbains contaminés en métaux lourds (Cd = 16 et 20 mg/kg ; Pb = 371 et 1362 mg/kg ; Zn = 1813 et 2013 mg/kg), à



des teneurs similaires à celles des sols de cokerie de la présente étude. Ces auteurs ont également montré l'induction d'enzymes antioxydantes telles que les superoxydes dismutases (SOD) et les catalases (CAT), qui sont généralement impliquées pour faire face aux espèces réactives de l'oxygène (ROS) générés par de nombreux xénobiotiques, tels que les HAP, les PCBs, les métaux lourds... . Plusieurs auteurs ont montré que la métabolisation des HAP chez les vers de terre, du B[a]P en particulier, se faisait via des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques pro-oxydants (Stenersen *et al.*, 1979 ; Saint-Denis *et al.*, 1998, 1999, 2000). La mise en place des systèmes de défense et de réparation des dommages à l'ADN, comme il a été observé dans la présente étude, représente un coût énergétique pour les vers de terre. Ce coût énergétique de la pollution est désigné sous le terme de *coût de la tolérance*. Le succès de reproduction est étroitement lié à l'allocation de l'énergie entre les fonctions de défense de l'organisme, en particulier les processus de détoxification, la maintenance du métabolisme de base, la croissance et la reproduction (Amiard & Amiard-Triquet, 2008). L'énergie allouée aux processus de détoxification, de réparation des dommages à l'ADN permettant la survie des organismes dans ces environnements contaminés, se ferait au détriment de processus physiologiques comme la reproduction.

Des études ont montré chez un annélide polychète caractéristique des milieux estuariens, *Nereis diversicolor*, une diminution des réserves énergétiques, déterminées par les teneurs en lipides, glycogène et protéines, chez des individus issus d'un site contaminé en HAP, PCBs, métaux lourds (estuaire de la Seine) en comparaison d'individus témoins (Authie). Les réserves énergétiques plus élevées chez les individus témoins sont associées à une taille et une masse supérieure. Les individus exposés (estuaire de la Seine) ont une fécondité limitée en accord avec leur taille réduite (Durou *et al.*, 2005, 2006). Dans la présente étude, l'apparition et la réparation des dommages à l'ADN ont pu mobiliser les lipides et le glycogène des coelomocytes qui sont les premières réserves énergétiques utilisées. Il est intéressant de noter la perte significative de la biomasse des vers, observée lors de l'essai de survie (14 jours), avec l'exposition aux concentrations génotoxiques des sols contaminés NM et NMDT (résultats non montrés).

Au vu des résultats de la présente étude, il nous semblait intéressant d'étudier la génotoxicité au niveau des cellules germinales de vers de terre, pour mettre en évidence le lien mécanistique entre les dommages à l'ADN et l'inhibition de la reproduction. A l'heure actuelle, l'étude de la génotoxicité sur les cellules germinales est très peu développée chez les invertébrés, les annélides en particulier.

Lewis & Galloway (2008, 2009) ont montré par l'essai comet une augmentation des dommages à l'ADN des spermatozoïdes chez le polychète *Arenicola marina*, après une exposition *in vitro* à un composé génotoxique de référence – le méthylméthanesulfonate (MMS) et à un HAP - le B[a]P. Les dommages génotoxiques ont été associés avec des anomalies du développement embryonnaire. Au niveau des invertébrés terrestres, Bustos-Obregón & Goicochea (2002) ont montré une augmentation des dommages à l'ADN au niveau des cellules germinales males de ver de terre *E. fetida* après une exposition de 5 à 15 jours à un sol dopé en parathion à des concentrations comprises entre 444 et 1478 mg/kg de sol. Ces auteurs ont également montré une inhibition de la production de cocons et de juvéniles après 5 semaines d'exposition à ces concentrations d'exposition. Malheureusement ces auteurs ne précisent pas le degré de maturation des cellules germinales étudiées. D'après notre expérience, il est impossible de mesurer par l'essai comet les dommages à l'ADN des spermatozoïdes du ver de terre *E. fetida*, du fait de l'allongement nucléaire au cours de la spermiogénèse. L'étude sur les cellules germinales mâles à un stade immature (spermatogonies ou spermatocytes) est également difficile. Ces cellules ne sont pas différenciées. En effet, lors des divisions cellulaires de la spermatogénèse, la cytokinèse (séparation des membranes) est incomplète conduisant à la formation de morula (cellules non dissociées). De plus, ces cellules en phase de division présentent un fort degré apoptotique qui est préjudiciable pour l'essai comet (Emmanuel Lapied, comm. pers.). Les vers de terre étant des organismes hermaphrodites (présence des caractéristiques sexuelles males et femelles), nous avons tenté d'étudier les dommages à l'ADN au niveau des cellules germinales femelles (ovocytes). En raison de la difficulté pour localiser les tissus ovariens et du nombre restreint d'ovocytes, l'essai comet sur ce type cellulaire semble compliqué. D'autres techniques sont actuellement testées en laboratoire pour mettre en évidence les dommages à l'ADN des cellules germinales des vers de terre.

Outre l'étude de la génotoxicité des polluants vis-à-vis des vers de terre qui représentait le caractère innovant de ce sujet de recherche, cette étude a apporté des enseignements importants concernant le risque biologique, l'écotoxicité des sols de friches industrielles vis-à-vis des organismes terrestres.

Les sols de cokerie étudiés (sol HOM et sol NM) présentaient une forte contamination organique, avec des teneurs totales en HAP de 30 à 50 fois supérieures à la valeur de référence de 50 mg HAP/kg de sol donnée pour un sol naturel (BRGM, 2007). Un des sols étudiés présentait en plus une forte contamination métallique. La présente étude a montré que:

- 1) **La toxicité des polluants des sols vis-à-vis des organismes terrestres (plantes, vers de terre et collemboles) a été inférieure à ce que pouvaient laisser suggérer les concentrations en polluants mesurées par les analyses physico-chimiques.**
- 2) **De façon surprenante, les deux sols de cokerie ont montré des profils de toxicité vis-à-vis des organismes terrestres totalement différents, malgré un degré de contamination relativement proche.**

Le devenir et le comportement d'un polluant, organique ou inorganique, dans un sol est contrôlé à la fois par les caractéristiques physico-chimiques du sol (teneurs en matières minérales, en matières organiques) et du polluant (structure moléculaire, hydro(lipo)solubilité...) (Reid *et al.*, 2000). De manière générale, plus le temps de contact entre le polluant et le sol augmente, moins le polluant est extractible et biodisponible. Hatzinger & Alexander (1995) ont désigné ce phénomène de vieillissement « *ageing* » de la contamination. L'ancienneté de la contamination des sols de cokeries étudiés réduit la fraction de la pollution réellement biodisponible et toxique vis-à-vis des organismes terrestres.

**La différence de la biodisponibilité des polluants serait à l'origine des différences d'écotoxicité observées entre les deux sols étudiés (sols HOM et NM).** La fraction biodisponible des polluants du sol de la cokerie d'Homécourt (sol HOM) serait supérieure à celle des polluants du sol de la cokerie de Neuves-Maisons (sol NM), ce qui expliquerait sa plus grande toxicité vis-à-vis des organismes terrestres. Il était assez surprenant de constater que le sol NM, malgré une contamination en HAP similaire à celle du sol HOM et une contamination métallique plus importante, n'a montré aucune, sinon une assez faible toxicité.

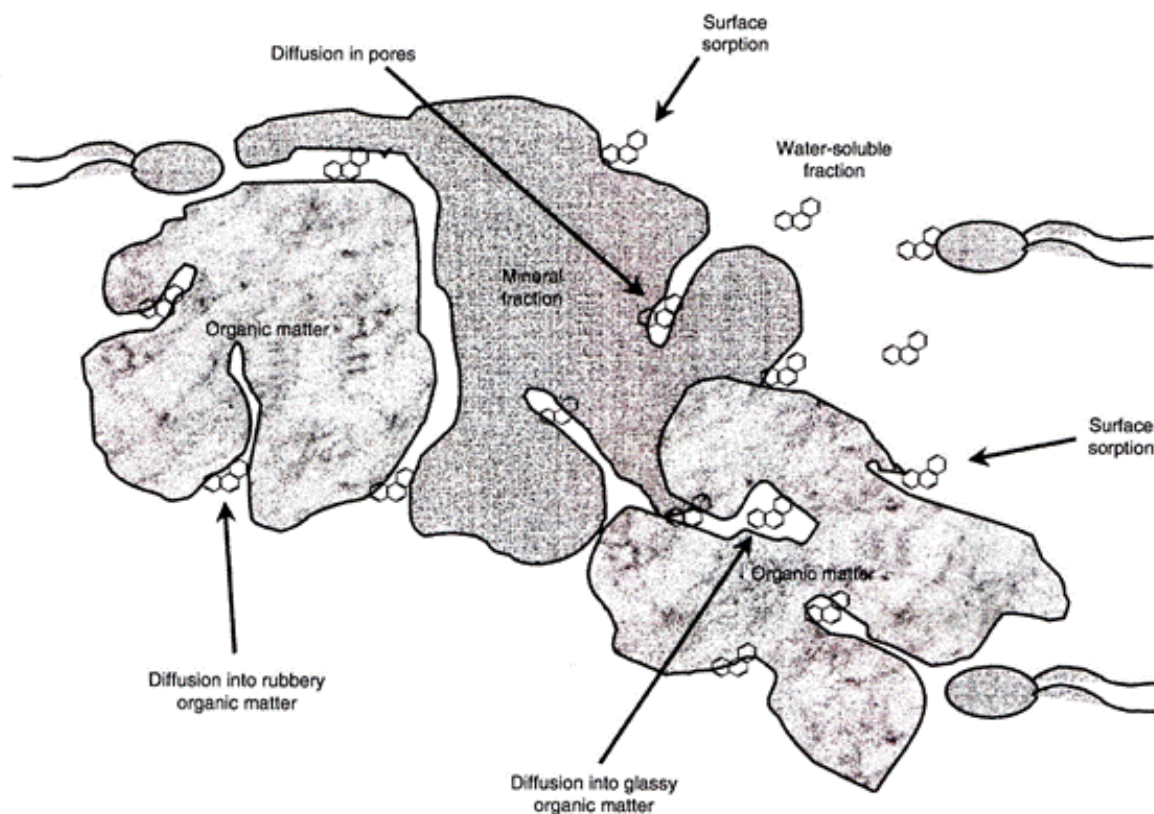
Les contaminants métalliques et organiques du sol sont connus pour leur forte affinité à la matière organique du sol et au carbone organique total, réduisant de ce fait leur biodisponibilité. Les mesures de ces paramètres selon les méthodes standards sont similaires entre les deux sols étudiés et ne permettent pas d'expliquer les différences de biodisponibilité et de toxicité des polluants. Ces paramètres sont même légèrement supérieurs dans le sol de la cokerie d'Homécourt, qui s'est révélé être le plus toxique vis-à-vis des organismes terrestres.

La question qui se pose alors est de savoir *pourquoi une telle différence de toxicité entre les sols étudiés existe malgré des caractéristiques physico-chimiques similaires ?*

Il est difficile de connaître avec exactitude l'historique des activités industrielles entreprises, des quantités de polluants déversés au niveau des sols, qui pourraient être un élément de réponse à la question posée. Le nombre d'années ne permet pas non plus d'expliquer les différences de toxicité, étant donné une ancienneté équivalente entre les deux sols de cokeries étudiés.

Lors *et al.* (2005, 2009a) ont étudié l'écotoxicité de deux sols industriels contaminés par des HAP et/ou des métaux lourds. Le 1<sup>er</sup> sol industriel était essentiellement contaminé en HAP ( $\sum_{16 \text{ HAP}} = 2894 \text{ mg/kg}$ ) à une teneur similaire à celle du sol HOM de la présente étude. Le second sol industriel, qui a été soumis à un traitement biologique durant 18 mois, était contaminé à la fois en HAP ( $\sum_{16 \text{ HAP}} = 3687 \text{ mg/kg}$ ) et en métaux lourds (Cd = 5.2 mg/kg, CN = 67 mg/kg, Cu = 126 mg/kg, Pb = 345 mg/kg, Zn = 514 mg/kg). Les résultats obtenus par ces auteurs ont été similaires aux nôtres. Le premier sol, contaminé essentiellement en HAP, s'est révélé beaucoup plus toxique vis-à-vis des organismes aquatiques et terrestres (inhibition de la croissance, de la germination de la laitue *L. sativa* et de la survie des vers de terre *E. fetida*) que le second sol, contaminé à la fois en HAP et en métaux lourds. L'intérêt de leur étude tient également au fait qu'ils ont observé par microscopie des sections polies de particules de sol. Ils ont montré que les HAP n'étaient pas équitablement distribués dans les sols. Certains HAP étaient incrustés dans les particules minérales du sol.

L'étendue et le taux de la séquestration des polluants dans les sols dépendent à la fois des caractéristiques physico-chimiques et de la structure des sols et des contaminants (Alexander, 2000). La séquestration des polluants se traduit à la fois par des phénomènes de sorption et de diffusion au niveau des fractions solides, minérales ou organiques, du sol. Les polluants organiques ou inorganiques peuvent diffuser au sein des micropores de la matière organique du sol et interagir avec les structures complexes. Les polluants peuvent également être adsorbés à la surface ou bien diffuser au niveau des nano- micropores présents des particules minérales du sol (figure 15, page 112). La séquestration des polluants, différente entre les sols de cokerie étudiés, pourrait être à l'origine des différences de biodisponibilité et de toxicité observées.



**Figure 15** : Comportement physique des contaminants dans les sols  
(d'après Semple *et al.*, 2003).

Cette étude a montré que **la biodisponibilité des polluants est un critère essentiel à prendre en compte dans l'évaluation des risques des sols contaminés**, particulièrement dans le cas de sols de friches industrielles anciennement contaminés. **La biodisponibilité des polluants conditionne leur toxicité vis-à-vis des organismes**. La mesure des teneurs totales en polluants des sols par l'analyse physico-chimique n'est pas suffisante et a tendance à surestimer le risque représenté par ces matrices anciennement contaminées. **La mesure des effets biologiques, qui prend en compte la biodisponibilité de l'ensemble des polluants des sols et leurs interactions possibles (synergie, antagonisme) est indispensable, en complément de l'approche physico-chimique.**

**Malgré l'abaissement de la contamination organique du sol NM (plus de 90% d'inhibition), l'intérêt de la thermodésorption dans la présente étude peut être discuté si l'on considère les organismes terrestres.** Le sol brut de la cokerie de Neuves-Maisons ne montrait aucune sinon une faible toxicité vis-à-vis des organismes terrestres. Le traitement de

thermodésorption n'a apporté aucune amélioration concernant la reproduction des vers adultes et a même augmenté la biodisponibilité et la génotoxicité des polluants métalliques du sol. Par contre, une forte toxicité des percolats a été enregistrée. La fraction aqueuse de la pollution du sol NM s'est révélée plus toxique que celle du sol NMDT. Les percolats du sol contaminé NM ont provoqué une inhibition de la croissance des microalgues *P. subcapitata* (CE<sub>50</sub> entre 0.2% et 1.7% de percolat contaminé) et de la reproduction de la cériodaphnie *C. dubia* (CE<sub>50</sub> entre 0.1% et 1%). La mutagénicité des percolats a également été observée avec le test d'Ames sur la souche *S. typhimurium* his – en milieu liquide (TA 98). La fraction aqueuse de la pollution du sol thermodésorbé (sol NMDT) s'est avérée moins toxique pour les microalgues que celle du sol NM (CE<sub>50</sub> = 50% de percolat contaminé) et d'une toxicité assez proche à celle du sol NM pour la cériodaphnie (CE<sub>50</sub> = 0.6% à 3%).

**La présente étude montre l'importance de considérer les effets biologiques, en plus de l'approche physico-chimique, de la pollution des sols. L'écotoxicité des sols contaminés doit être évaluée à la fois sur les organismes aquatiques et terrestres. L'application d'un seul bioessai n'apporte qu'un résultat partiel, insuffisant pour un diagnostic global de l'écotoxicité des sols contaminés.**

*Conclusion*

## Conclusion

L'objectif de ce travail de recherche était de mettre en relation dans des sols de cokeries anciennement contaminés la biodisponibilité des polluants (HAP et/ou métaux lourds), leur génotoxicité et leurs effets populationnels chez le ver de terre *E. fetida*.

Cette étude a montré que les sols étudiés, malgré une contamination similaire, présentaient une toxicité vis-à-vis des vers de terre et d'autres organismes terrestres (plantes, collemboles) totalement différente. Ces différences de toxicité seraient imputables à la biodisponibilité des polluants, différente entre les sols. Le traitement de thermodésorption, appliqué à l'un des sols pollués, a augmenté la biodisponibilité des polluants du sol, des métaux lourds en particulier, les rendant plus génotoxiques vis-à-vis des vers de terre.

L'approche biologique-écotoxicologique qui prend en compte la biodisponibilité et la toxicité des polluants du sol se révèle donc essentielle, en complément de l'approche physico-chimique, dans l'évaluation des risques des sols contaminés et de l'efficacité des traitements de remédiation.

Cette étude a également montré que la mesure des dommages à l'ADN des coelomocytes de vers de terre était un outil pertinent dans l'évaluation de la génotoxicité des polluants des sols. La génotoxicité est un indicateur précoce de toxicité qui s'est montré plus sensible que la survie et au moins aussi sensible que la reproduction. Le parallélisme entre les dommages à l'ADN des coelomocytes de vers de terre et les effets sur la reproduction montre l'intérêt du marqueur de génotoxicité.

Plusieurs perspectives de recherche s'ouvrent à la suite de ce travail :

1) Au vu des résultats de la présente étude, la génotoxicité des polluants des sols contaminés pourrait être à l'origine de l'inhibition de la reproduction des vers de terre. Il nous semble particulièrement intéressant d'étudier la génotoxicité des polluants au niveau des cellules germinales de vers de terre, afin de faire le lien mécanistique entre les dommages à l'ADN et l'inhibition de la reproduction. L'étude de ce lien permettrait de confirmer l'intérêt des biomarqueurs de génotoxicité en tant qu'indicateur précoce de toxicité à long terme.



2) Il serait également intéressant d'étudier le lien entre les dommages à l'ADN des coelomocytes de vers de terre et l'inhibition de la phagocytose, qui est utilisé comme biomarqueur d'immunotoxicité. A notre connaissance, ce lien génotoxicité-immunotoxicité n'a pas été étudié chez les vers de terre. Des organismes immuno-déficients seraient plus sensibles aux infections et aux maladies et de ce fait moins résistants à un stress environnemental additionnel (Fournier *et al.*, 2000). Plusieurs auteurs ont montré chez les vers de terre l'immunotoxicité de composés génotoxiques tels que le cadmium, le nickel ou le 7,12-diméthylbenzanthracène (HAP) (Fugère *et al.*, 1996 ; Sauvé *et al.*, 2002, Komiyama *et al.*, 2003 ; Massicotte *et al.*, 2004).

3) A l'heure actuelle, les essais de génotoxicité qui sont normalisés au niveau national et international ne portent que sur la fraction aqueuse de la pollution des sols. La génotoxicité/mutagenicité des lixiviats/percolats contaminés est déterminée à l'aide de tests bactériens (test d'Ames, umu...) ou du test des micronoyaux sur érythrocytes de larves d'amphibiens ou sur cellules racinaires de fève. Il serait intéressant de comparer la réponse des vers de terre (test comet) à celles d'autres organismes terrestres, les plantes en particulier (test comet ou test des micronoyaux), en vue de proposer un outil pertinent d'évaluation de la génotoxicité des matrices solides contaminées, qui ne fait pas l'objet à l'heure actuelle d'une normalisation.

# *Références*

## Références

### -A-

Achazi R.K., Flenner C., Livingstone D.R., Peters L.D., Schaub K. & Scheiwe E., 1998. Cytochrome P450 and dependent activities in unexposed and PAH-exposed terrestrial annelids. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C : Toxicology and Pharmacology*, 121, 339–350.

Adamowicz A. & Wojtaszek J., 2001. Morphology and phagocytic activity of coelomocytes in *Dendrobaena veneta* (Lumbricidae). *Zoologica Poloniae*, 461(1-4), 91-104.

Agence De l'Environnement et de Maitrise de l'Energie (ADEME), 1998. La faune, indicateur de la qualité des sols. Collection Données et Références, ADEME Editions, Angers, France, 62 pp.

Agence De l'Environnement et de Maitrise de l'Energie (ADEME), 2002. Ecotoxicité des sols et des déchets: Résultats des tests biologiques. ADEME Editions, Angers, France, 96 pp.

Affar E.B., Dufour M., Poirier G.G. & Nadeau D., 1998. Isolation, purification and partial characterization of chloragocytes from the earthworm species *Lumbricus terrestris*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 185, 123-133.

Agence Française de Normalisation (AFNOR NF EN ISO 6341), 1996. Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna Straus* (Cladocera, Crustacea) - Essai de toxicité aiguë.

Agence Française de Normalisation (AFNOR NF T 90-375), 1998. Qualité de l'eau – Détermination de l'inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*).

Agence Française de Normalisation (AFNOR NF EN ISO 11348-3), 1999. Détermination de l'inhibition de la luminescence de la bactérie marine *Vibrio fischeri*.

Agence Française de Normalisation (AFNOR NF T 90-376), 2000. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis de *Ceriodaphnia dubia*. Test d'inhibition de la croissance des populations.

Association Française de Normalisation (AFNOR XP X33-012), 2000. Characterisation of sludges-determination of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB).

Agence Française de Normalisation (AFNOR NF T90-327), 2004. Evaluation des effets génotoxiques sur végétaux supérieurs: évaluation de la fréquence d'apparition de micronoyaux dans les racines secondaires de *Vicia faba*.

Aina R., Palin L. & Citterio S., 2006. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. *Chemosphere*, 65, 666-673.

Ait Ali N., Ater M., Sunahara G.I. & Robidoux P.Y., 2004. Phytotoxicity and bioaccumulation of copper and chromium using barley (*Hordeum vulgare* L.) in spiked artificial and natural forest soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 363-374.

Alexander M., 2000. Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, 34, 4259-4265.

Amiard J-C. & Amiard-Triquet C., 2008. Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France, 375 pp.

Amiard-Triquet C., Cossu-Leguille C. & Mouneyrac C., 2008. Les biomarqueurs de défense, la tolérance et ses conséquences écologiques. Dans : Amiard J-C. & Amiard-Triquet C. (Eds), Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France, pp 55-94.

An Y-J., 2004. Soil ecotoxicity assessment using cadmium sensitive plants. *Environmental Pollution*, 127, 21-26.

Arnold R.E., Hodson M.E., Black S. & Davies N.A., 2003. The influence of mineral solubility and soil solution concentration on the toxicity of copper to *Eisenia fetida* Savigny. *Pedobiologia*, 47(5-6), 622-632.

Atienzar F.A., Cheung V.V., Jha A.N. & Depledge M.H., 2001. Fitness parameters and DNA effects are sensitive indicators of copper-induced toxicity in *Daphnia magna*. *Toxicological Sciences*, 59, 241-250.

Atienzar F.A. & Jha A.N., 2004. The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay to determine DNA alterations, repair and transgenerational effects in B[a]P exposed *Daphnia magna*. *Mutation Research*, 552, 125-140.

## -B-

Baek K-H., Kim H-S., Oh H-M., Yoon B-D., Kim J. & Lee I-S., 2004. Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *Journal of Environmental Science and Health*, 39(9), 2465-2472.

Banks M.K. & Schultz K.E., 2005. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 167, 211-219.

Békaert C., Rast C., Ferrier V., Bispo A., Jourdain M.J. & Vasseur P., 1999. Use of *in vitro* (Ames and Mutatox tests) and *in vivo* (Amphibian Micronucleus test) assays to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil. *Organic Geochemistry*, 30, 953-962.

Belkessam L. & Guérin V., 2005. Sites et sols pollués par les HAP : état des connaissances et besoins de recherches. Centre National de Recherche sur les Sites et Sols Pollués, 46 pp.

Belkessam L., 2005. Journées d'échange "Sites et sols pollués par les HAP-Etat des connaissances et besoins de recherches. Compte Rendu CNRSSP, Centre National de Recherches sur les Sites et Sols Pollués, 1-9.

Bergknut M., 2006. Characterization of PAH-contaminated soils focusing on availability, chemical composition and biological effects. Thèse de doctorat, Umeå University (Suède), 68 pp.

Bergknut M., Sehlin E., Lundstedt S., Andersson P.A., Haglund P. & Tysklind M., 2007. Comparison of techniques for estimating PAH bioavailability: uptake in *Eisenia fetida*, passive samplers and leaching using various solvents and additives. *Environmental Pollution*, 145, 154-160.

- Biache C., Mansuy-Huault L., Faure P., Munier-Lamy C. & Leyval C., 2008. Effects of thermal desorption on the composition of two coking plant soils: impact on solvent extractable organic compounds and metal bioavailability. *Environmental Pollution*, 156(3), 671-677.
- Bierkens J., Klein G., Corbisier P., Van den Heuvel R., Verschaeve L., Weltens R. & Schoeters G., 1998. Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, 37, 2935-2947.
- Bigorgne E., Cossu-Leguille C., Bonnard M. & Nahmani J. *In vivo* genotoxic effect of nickel, trivalent chromium and hexavalent chromium on *Eisenia fetida* earthworm using the comet assay (soumis).
- Bispo A., Jourdain M.J. & Jauzein M., 1999. Toxicity and genotoxicity of industrial soils polluted by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Organic Geochemistry*, 30, 947-952.
- Bonnard M., Eom I-C., Morel J-L. & Vasseur P., 2009. Genotoxic and reproductive effects in the *Eisenia fetida* earthworm exposed to an industrially polluted soil. *Environmental Molecular and Mutagenesis*, 50, 60-69.
- Booth L.H., Heppelthwaite V.J. & O'Halloran K., 2005. Effects-based assays in the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. Their utilisation for evaluation of contaminated sites before and after remediation. *Journal of Soils and Sediments*, 5(2), 87-94.
- Bureau de Recherches Géologiques et Minières (BRGM), 2007. Bases de données relatives à la qualité des sols : Contenu et utilisation dans le cadre de la gestion des sols pollués, 27 p.  
([http://www.sites-pollues.developpement-durable.gouv.fr/Documents/Appui/BD\\_Sol\\_existantes\\_et\\_gestion\\_SSP\\_V0-1-042008.pdf](http://www.sites-pollues.developpement-durable.gouv.fr/Documents/Appui/BD_Sol_existantes_et_gestion_SSP_V0-1-042008.pdf), version 2008)
- Brown P.J., Long S.M., Spurgeon D.J., Svendsen C. & Hankard P.K., 2004. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a non-carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 57, 1675-1681.
- Brulle F., Mitta G., Cocquerelle G., Vieau D., Lemièrre S., Leprêtre A. & Vandebulcke F., 2006. Cloning and real-time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. *Environmental Science and Technology*, 40, 2844-2850.
- Brulle F., Cocquerelle G., Douay F., Lemièrre S., Leprêtre A. & Vandebulcke F., 2009. Développement de biomarqueurs d'exposition aux métaux chez un organisme test : l'annélide oligochète *Eisenia fetida* (<http://cnriut09.univ-lille1.fr/articles/Articles/Fulltext/156a.pdf>).
- Bruus Pedersen M. & Van Gestel C.A.M., 2001. Toxicity of copper to the collembolan *Folsomia fimetaria* in relation to the age of soil contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 49, 54-59.
- Burlinson B., Tice R.R., Speit G., Agurell E., Brendler-Schwaab S.Y., Collins A.R., Escobar P., Honma M., Kumaravel T.S., Nakajima M. Sasaki Y.F., Thybaud V., Uno Y., Vasquez M. & Hartmann A., 2007. *In vivo* Comet Assay workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing: results of the *in vivo* Comet Assay workgroup. *Mutation Research*, 627, 31-35.
- Bustos-Obregon E. & Goicochea R.I., 2002. Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. *Asian Journal of Andrology*, 4, 195-199.
- Button M., Jenkin G.R.T., Bowman K.J., Harrington C.F., Brewer T.S., Jones G.D.D. & Watts M.J., 2009. DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: Assessing resistance to arsenic toxicity by use of the comet assay. *Mutation Research* (on line [doi:10.1016/j.mrgentox.2009.12.009](https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.12.009)).

## -C-

- Canty M.N., Hutchinson T.H., Brown R.J., Jones M.B. & Jha A.N., 2009. Linking genotoxic responses with cytotoxic and behavioural or physiological consequences: Differential sensitivity of echinoderms (*Asterias rubens*) and marine molluscs (*Mytilus edulis*). *Aquatic Toxicology*, 94, 68-76.
- Casabé N., Piola L., Fuchs J., Oneto M.L., Pamparato L., Basack S., Giménez R., Massaro R., Papa J.C. & Kesten E., 2007. Ecotoxicological assessment of the effects of glyphosate and chlorpyrifos in an Argentine soya field. *Journal of Soils and Sediments*, 7, 232-239.
- Chandra S., Chauhan L.K., Pande P.N. & Gupta S.K., 2004. Cytogenic effects of leachates from tannery solid waste on the somatic cells of *Vicia faba*. *Environmental Toxicology*, 19, 129-133.
- Charrois J.W., McGill W.B. & Froese K.L., 2001. Acute ecotoxicity of creosote-contaminated soils to *Eisenia fetida*: a survival-based approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(11), 2594-2603.
- Chaty S., Rodius F. & Vasseur P., 2004. A comparative study of the expression of *CYP1A* and *CYP4* genes in aquatic invertebrate (freshwater mussel, *Unio tumidus*) and vertebrate (rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 69(1), 81-94.
- Ching E.W.K., Siu W.H.L., Lam P.K.S., Xu L., Zhang Y., Richardson B.J. & Wu R.S.S., 2001. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: dose- and time- dependent relationships. *Marine Pollution Bulletin*, 42, 603-610.
- Conder J.M. & Lanno R.P., 2003. Lethal critical body residues as measures of Cd, Pb, and Zn bioavailability and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida*. *Journal of Soils and Sediments*, 3, 13-20.
- Cook S.V., Chu A. & Goodman R.H., 2002. Leachability and toxicity of hydrocarbons, metals and salt contamination from flare pit soil. *Water, Air and Soil Pollution*, 133, 297-314.
- Costes J-M. & Druelle V., 1997. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques dans l'environnement: la réhabilitation des anciens sites industriels. *Revue de l'institut français du pétrole*, 52(4), 15 pp.
- Cossarizza A., Cooper E.L., Suzuki M.M., Salvioli S., Capri M., Quaglini D. & Franceschi C., 1996. Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react with several human epitopes can kill human tumor cell lines. *Experimental Cell Research*, 224, 174-182
- 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. *Mutation Research*, 426, 161-171.
- Crepineau C., Rychen G., Feidt C., Le Roux Y., Lichtfouse E. & Laurent F., 2003. Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4841-4845.
- Crouau Y., Chenon P. & Gisclard C., 1999. The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) for the bioassay of xenobiotic substances and soil pollutants. *Applied Soil Ecology*, 12, 103-111.
- Crouau Y. & Cazes L., 2003. What causes variability in the *Folsomia candida* reproduction test? *Applied Soil Ecology*, 22, 175-180.

Crouau Y. & Moïa C., 2006. The relative sensitivity of growth and reproduction in the springtail *Folsomia candida* exposed to xenobiotics in the laboratory: an indicator of soil toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 64, 115-121.

## -D-

Davies N.A., Hodson M.E. & Black S., 2003. The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test. *Environmental Pollution*, 121(1), 49-54.

Darmendrail D., Baize D., Barbier J., Freyssinet P., Mouvet C., Salpéteur I. & Wavrer P., 2000. Fond géochimique naturel : Etat des connaissances à l'échelle nationale, BRGM/RP-50158-FR, 93 pp.

De Boeck M., Touil N., De Visscher G., Aka Vande P. & Kirsch-Volders M., 2000. Validation and implementation of an internal standard in Comet assay analysis. *Mutation Research*, 469(2), 181-197.

Demuyneck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemièrre S. & Leprêtre A., 2006. Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete *Eisenia fetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 144, 34-46.

Demuyneck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemièrre S. & Leprêtre A., 2007. Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 145, 658-668.

Depledge M.H., 1994. Genotypic toxicity: implications for individuals and populations. *Environmental Health Perspectives*, 102, 101-104, Suppl 12.

Deschamps T., Benzaazoua M., Bussière B., Belem T. & Mbonimpa M., 2006. Mécanismes de rétention des métaux lourds en phase solide : cas de la stabilisation des sols contaminés et des déchets industriels. *VertigO, la revue en sciences de l'environnement*, 7(2), 1-11.

Dhainaut A. & Scaps P., 2001. Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida. *Canadian Journal of Zoology*, 79, 233-253.

Di Marzio W.D., Saenz M.E., Lemièrre S. & Vasseur P., 2005. Improved single-cell gel electrophoresis assay for detecting DNA damage in *Eisenia fetida*. *Environmental Molecular and Mutagenesis*, 46, 246-252.

Di Marzio W.D., Saenz M.E., Montivero C., Alberdi J.L., Tortorelli M.C. & Ambrini G., 2007. Genotoxicity of aqueous elutions of industrial soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 79, 483-487.

Dorn P.B., Vipond T.E., Salanitro J.P. & Wisniewski H.L., 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, Microtox ® and plants. *Chemosphere*, 37(5), 845-860.

Dorn P.B. & Salanitro J.P., 2000. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. *Chemosphere*, 40, 419-426.

DRIRE, 2008, 2009. Les sites et sols pollués. ([http://www.lorraine.drire.gouv.fr/webdrire/files/DEI/BIL09\\_SSP.pdf](http://www.lorraine.drire.gouv.fr/webdrire/files/DEI/BIL09_SSP.pdf))

Droge S.T.J., León Paumen M., Bleeker E.A.J., Kraak M.H.S. & Van Gestel C.A.M., 2006. Chronic toxicity of PACs to the springtail *Folsomia candida* and the enchytraeid *Enchytraeus crypticus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25, 2423-2431.

Douros C., Mouneyrac C. & Amiard-Triquet C., 2005. Tolerance to metals and assessment of energy reserves in the polychaete *Nereis diversicolor* in clean and contaminated estuaries. *Environmental Toxicology*, 20, 23-31.

Douros C., Mouneyrac C., Pellerin J. & Péry A., 2006. Conséquences des perturbations du métabolisme énergétique. Dans : Amiard J-C. & Amiard-Triquet C. (Eds), Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France, pp 273-294.

## -E-

Eastmond D.A., MacGregor J.T. & Sleninski R.S., 2008. Trivalent chromium: assessing the genotoxic risk of an essential trace element and widely used human and animal nutritional supplement. *Critical Reviews in Toxicology*, 38, 173-190.

EC SCF, 2002. Polycyclic aromatic hydrocarbons-occurrence in foods, dietary exposure and health effects. European Commission, Scientific Committee for Food (SCF), Brussels, Belgium, SCF/SC/CNTM/PAH29Final ([http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out154_en.pdf)).

Environnement Canada, 1993. Environnement Canada, Protocole-Test de fluctuation, Laboratoire CandP (CSL).

Eom I-C., Rast C., Veber A.M. & Vasseur P., 2007. Ecotoxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67, 190-205.

## -F-

Faust F., Kassie F., Knasmüller S., Boedecker R.H., Mann M. & Mersch-Sundermann V., 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutation Research*, 566, 209-229.

Feisthauer N.C., Stephenson G.L., Princz J.I. & Scroggins R.P., 2006. Effects of metal-contaminated forest soils from the Canadian shield to terrestrial organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(3), 823-835.

Fent K., 2003. Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, 140-141, 353-365.

Ferrara G., Loffredo E. & Senesi N., 2000. Aquatic humic substances inhibit clastogenic events in germinating seed of herbaceous plants. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 1652-1657.

Fernandez M.D., Cagigal E., Vega M.M., Urzelaia A., Babin M., Pro J. & Tarazona J.V., 2005. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 174-184.



Fourie F., Reinecke S.A. & Reinecke A.J., 2007. The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 67(3), 361-368.

Fournier M., Cyr D., Blakley D., Boermans H. & Brousseau P., 2000. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *American Zoologist*, 40, 412-420.

Fritsche W. & Hofrichter M., 2000. Aerobic degradation by microorganisms. *Bio/Technology*, 11b, 145-167.

Fugère N., Brousseau P., Krzystyniak K., Coderre D. & Fournier M., 1996. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different *in vitro* sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Toxicology*, 109, 157-166.

## -G-

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*, 559, 49-57.

Gichner T., Patková Z., Száková J. & Demnerová K., 2006. Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 420-426.

Gichner T., Znidár I. & Száková J., 2008a. Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutation Research*, 252, 186-190.

Gichner T., Patková Z., Száková J., Znidár I. & Mukherjee A., 2008b. DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and gamma rays. *Environmental and Experimental Botany*, 62, 113-119.

Gong P., Wilke B.-M., Strozzi E. & Fleischmann S., 2001. Evaluation and refinement of a continuous seed germination and early seedling growth test for the use in the ecotoxicological assessment of soils. *Chemosphere*, 44, 491-500.

Greenslade P. & Vaughan G.T., 2003. A comparison of Collembola species for toxicity testing of Australian soils. *Pedobiologia*, 47, 171-179.

Gruber C., Stürzenbaum S.R., Gehrig P., Sack R., Hunziker P., Berger B. & Dallinger R., 2000. Isolation and characterization of a self-sufficient one-domain protein (Cd)-Metallothionein from *Eisenia fetida*. *European Journal of Biochemistry*, 267, 573-582.

## -H-

Haeseler F., Blanchet D., Druelle V., Werner P. & Vandecasteele J.-P., 1999. Ecotoxicological assessment of soils of former manufactured gas plant sites: bioremediation potential and pollutant mobility. *Environmental Science and Technology*, 33(24), 4379-4384.

- Hankard P.K., Bundy J.G., Spurgeon D.J., Weeks J.M., Wright J., Weinberg C. & Svendsen C., 2005. Establishing principal soil quality parameters influencing earthworms in urban soils using bioassays. *Environmental Pollution*, 133, 199-211.
- Hartwig A., 1995. Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*, 8(1), 3-11.
- Hatzinger P.B. & Alexander M., 1995. Effect of ageing of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology*, 29, 537-545.
- Helling B., Reinecke S.A. & Reinecke A.J., 2000. Effects of fungicide copper oxchloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 46, 108-116.
- Henner P., Schiavon M., Druelle V. & Lichtfouse E., 1999. Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Organic Geochemistry*, 30, 963-969.
- Hery M., Nazaret S., Jaffré T., Normand P. & Navarro E., 2003. Adaptation to nickel spiking of bacterial communities in neocaledonian soils. *Environmental Microbiology*, 5(1), 3-12.
- Huang X-D., El-Alawi Y., Penrose D.M., Glick B.R. & Greenberg B.M., 2004. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution*, 130, 453-463.

## -I-

- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1987. Monograph on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC Monographs volumes 1 to 42, Lyon, France, 142 pp.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1990. Chromium, nickel and welding. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to humans, Vol 49, Lyon, France, 677 pp.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Beryllium, cadmium, mercury and exposures in the glass manufacturing industry. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemical to humans, Vol 58, Lyon, France, 444 pp.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2004. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Tobacco smoke and involuntary smoking, Vol 83, Lyon, France, 1452 pp.
- International Agency for Research on Cancer (IARC), 2007. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks of chemicals to humans. Smokelles tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines, Vol 89, Lyon, France, 626 pp.
- Iscan M., 2004. Hazard identification for contaminants. *Toxicology*, 205, 195-199.
- International Organization for Standardization (ISO 7346), 1996 (-1, -2, -3). Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë létale de substances vis-à-vis d'un poisson d'eau douce *Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Téléostei, Cyprinidae).

International Organization for Standardization (ISO 10390), 1994. Qualité du sol - Détermination du pH.

International Organization for Standardization (ISO 10706), 2000. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité à long terme de substances vis-à-vis de *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea).

International Organization for Standardization (ISO 11266), 1994. Qualité du sol - Lignes directrices relatives aux essais en laboratoire pour la biodégradation de produits chimiques organiques dans le sol sous conditions aérobies.

International Organization for Standardization (ISO 11267), 1999. Qualité du sol - Inhibition de la reproduction des collemboles (*Folsomia candida*) par les polluants du sol.

International Organization for Standardization (ISO 11268-1), 1993. Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) - Partie 1: Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel.

International Organization for Standardization (ISO 11268-2), 1998. Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*) - Partie 2: Détermination des effets sur la reproduction.

International Organization for Standardization (ISO 11269-1), 1993. Qualité du sol - Détermination des effets des polluants sur la flore du sol - Partie 1: Méthode de mesure de l'inhibition de la croissance des racines.

International Organization for Standardization (ISO 11269-2), 2005. Qualité du sol - Détermination des polluants sur la flore du sol - Partie 2: Effets des substances chimiques sur la germination et la croissance des plantes supérieures.

International Organization for Standardization (ISO 11274), 1998. Qualité du sol - Détermination de la caractéristique de la rétention en eau - Méthodes de laboratoire.

International Organization for Standardization (ISO 13829), 2000. Qualité de l'eau - Détermination de la génotoxicité des constituants de l'eau et des eaux résiduaires par le test umu.

International Organization for Standardization (ISO 14328), 1997. Qualité du sol - Détermination de la minéralisation de l'azote et de la nitrification dans les sols, et de l'influence des produits chimiques sur ces processus.

International Organization for Standardization (ISO 15799), 2001. Qualité du sol. Lignes directrices relatives à la caractérisation des sols et des matériaux du sol. *International Standardisation organisation*.

International Organization for Standardization (ISO 15952), 2006. Qualité du sol - Effets des polluants sur des escargots juvéniles (Helicidae) - Détermination des effets sur la croissance.

International Organization for Standardization (ISO 16387), 2004. Qualité du sol - Effets des polluants sur les enchytrées (*Enchytraeus* sp.) - Détermination des effets sur la reproduction et la survie.

International Organization for Standardization (ISO 18772), 2008. Qualité du sol - Lignes directrices relatives aux modes opératoires de lixiviation en vue d'essais chimiques et écotoxicologiques ultérieurs des sols et matériaux du sol.

International Organization for Standardization (ISO 20079), 2005. Qualité de l'eau - Détermination de l'effet toxique des constituants de l'eau et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau (*Lemna minor*) - Essai d'inhibition de la croissance des lentilles d'eau.

International Organization for Standardization (ISO 20666), 2008. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité chronique vis-à-vis de *Brachionus calyciflorus* en 48 heures.

International Organization for Standardization (ISO 21427-1), 2006. Qualité de l'eau - Évaluation de la génotoxicité par la mesure de l'induction de micronoyaux - Partie 1: Évaluation de la génotoxicité à l'aide de larves d'amphibiens.

International Programme on Chemical Safety (IPCS), 1998. Environmental Health Criteria 202: Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbon. WHO, Geneva, Switzerland (<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc202.htm>).

## -J-

Jauzein M., Jourdain M-J., Bispo A. & Savanne D., 1999. Ecotoxicité des sols et des déchets : extraction des polluants. ADEME Editions, Paris, France, 138 pp.

Jeannot R., Lemièrre B., Chiron S., Augustin F. & Darmendrail D., 2001. Guide méthodologique pour l'analyse des sols pollués. Editions BRGM, Orléans, France, 85 pp.

Jensen J. & Sverdrup L.E., 2002. Joint toxicity of linear alkylbenzene sulfonates and pyrene on *Folsomia fimetaria*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52, 75-81.

Jha A.N., 2008. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. *Mutagenesis*, 23(3), 207-221.

Johnson D.L., Jones K.C., Langdon C.J., Pearce T.G. & Semple K.T., 2002. Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 1363-1370.

Joner E.J., Hirmann D., Szolar O.H.J., Todorovic D., Leyval C. & Loibner A.P., 2004. Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment. *Environmental Pollution*, 128, 429-435.

Juhasz A.L. & Naidu R., 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 45, 57-88.

## -K-

Khalil M.A., Abdel-Lateif H.M., Bayoumi B.M. & Van Straalen N.M., 1996. Analysis of separate and combined effects of heavy metals on the growth of *Aporrectodea caliginosa* (Oligochaeta; Annelida), using the toxic unit approach. *Applied Soil Ecology*, 4, 213-219.

Knasmüller S., Gottmann E., Steinkellner H., Fomin A., Pickl C., Paschke A., Göd R. & Kundi M., 1998. Detection of genotoxic effects of heavy metal contaminated soils with plant bioassays. *Mutation Research*, 420, 37-48.

Komiyama K., Okaue M., Miki Y., Ohkubo M., Moro I. & Cooper E.L., 2003. Non-specific cellular function of *Eisenia fetida* regulated by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Pedobiologia*, 47, 717-723.

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. *Mutation Research*, 360, 193-200.

Kumaravel T.S., Vilhar B., Faux S.P. & Jha A.N., 2009. Comet Assay measurements: a perspective. *Cell Biology and Toxicology*, 25(1), 53-64.

Kula H. & Larink O., 1997. Development and standardization of test methods for the prediction of sublethal effects of chemicals on earthworms. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(3/4), 635-639.

## -L-

Langdon C.J., Hodson M.E., Arnold R.E. & Black S., 2005. Survival, Pb-uptake and behaviour of three species of earthworm in Pb treated soils determined using an OECD-style toxicity test and a soil avoidance test. *Environmental Pollution*, 138, 368-375.

Lanno R., Wells J., Conder J., Bradham K. & Basta N., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 39-47.

Lee R.F. & Steinert S.A., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutation Research*, 544, 43-64.

Leitgib L., Kalman J. & Gruiz K., 2007. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere*, 66, 428-434.

Lemière B., Seguin J.J., Le Guern C., Guyonnet D., Baranger P., Darmendrail D. & Conil P., 2001. Guide sur le comportement des polluants dans les sols et les nappes. Applications dans un contexte d'Evaluation Détaillée des Risques pour les ressources en eau. Bureau de Recherches Géologiques et Minières, 122 pp.

Lemière S., Cossu-Leguille C., Bispo A., Jourdain M.-J., Lanhers M.-C., Burnel D. & Vasseur P., 2005. DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill. *Mutation Research*, 581(1/2), 11-21.

Lemière S., Godet J.-P., Tanguy M., Brulle F. & Leprêtre A., 2009. Evaluation d'agents de remédiation des sols contaminés par les métaux : une approche écotoxicologique (<http://cnriut09.univ-lille1.fr/articles/Articles/Fulltext/158a.pdf>).

León Paumen M., Steenbergen E., Kraak M.H.S., Van Straalen N.M. & Van Gestel C.A.M., 2008. Multigeneration exposure of the springtail *Folsomia candida* to phenanthrene: dose-response relationship to threshold concentrations. *Environmental Science and Technology*, 42, 6985-6990.

Lewis C. & Galloway T., 2008. Genotoxic damage in polychaetes: a study of species and cell-type sensitivities. *Mutation Research*, 654, 69-75.

Lewis C. & Galloway T., 2009. Reproductive consequences of paternal genotoxin exposure in marine invertebrates. *Environmental Science and Technology*, 43(3), 928-933.

- L'Huillier L. & Edighoffer S., 1996. Extractibility of nickel and its concentration in cultivated plants in Ni rich ultramafic soils of New Caledonia. *Plant and Soil*, 186, 255-264.
- Li M., Liu Z., Xu Y., Cui Y., Li D. & Kong Z., 2009. Comparative effects of Cd and Pb on biochemical response and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Chemosphere*, 74(5), 621-625.
- Lin A-J., Zhu Y. & Tong Y., 2005. Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and imidacloprid. *Science in China Series C Life Sciences*, 48(1), 7-13.
- Lin A-J., Zhang X-H., Chen M-M. & Cao Q., 2007. Oxydative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Sciences*, 19, 596-602.
- Liu W., Yang Y.S., Li P., Zhou Q. & Sun T., 2004. Root growth inhibition and induction of DNA damage in soybean (*Glycine max*) by chlorobenzenes in contaminated soils. *Chemosphere*, 57, 101-106.
- Liu W., Zhu L-S., Wang J., Wang J-H., Xie H. & Song Y., 2009. Assessment of the genotoxicity of endosulphan in earthworm and white clover plants using the comet assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 56, 742-746.
- Lock K. & Janssen C.R., 2002a. Ecotoxicity of chromium (III) to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51, 203-205.
- Lock K. & Janssen C.R., 2002b. Ecotoxicity of nickel to *Eisenia fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere*, 46, 197-200.
- Loehr R.C. & Webster M.T., 1996. Performance of long-term field-scale bioremediation processes. *Journal of Hazardous Materials*, 50, 105-128.
- López-Luna J., González-Chávez M.C., Esparza-García F.J. & Rodríguez-Vázquez R., 2009. Toxicity assessment of soil amended with tannery sludge, trivalent chromium and hexavalent chromium, using wheat, oat and sorghum plants. *Journal of Hazardous Materials*, 163, 829-834.
- Lors C., Périé F. & Damidot D., 2009. Ecotoxicological and chemical assessment of contaminated soils. *14th International Symposium on Toxicity Assessment (ISTA 14)*, 30 August-4 September, Metz, France (poster).
- Lors C., Mossmann J.R., Périé F., Belkessam L., Oustrière P. & Laboudigue A., 2005. Hazard characterization of polluted soils using both ecotoxicological and physico-chemical approaches. Article paru dans les *Proceedings of the 9th International Conference on Soil-Water Systems (CONSOIL)*, Bordeaux, France.
- Lukkari T., Aatsinki M., Väisänen A. & Haimi J., 2005. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Applied Soil Ecology*, 30(2), 133-146.
- Lutz W.K., 1998. Dose-response relationships in chemical carcinogenesis: superposition of different mechanisms of action, resulting in linear-nonlinear curves, practical thresholds, J-shapes. *Mutation Research*, 405(2), 117-124.

---

## -M-

Ma W.C., 1984. Sublethal toxic effects of copper on growth, reproduction and litter breakdown activity in the earthworm *Lumbricus rubellus*, with observations on the influence of temperature and soil pH. *Environmental Pollution*, 33, 207-219.

Ma Y., Dickinson N.M. & Wong M-H., 2002. Toxicity of Pb/Zn mine tailings to the earthworm *Pheretima* and the effects of burrowing on metal availability. *Biology and Fertility of Soils*, 36, 79-86.

Maboeta M.S., Reinecke A.J. & Reinecke S.A., 1999. The effects of low lead levels on the growth and reproduction of the African earthworm *Eudrilus eugeniae* (Oligochaeta). *Biology and Fertility of Soils*, 30, 113-116.

Maboeta M.S., Reinecke S.A. & Reinecke A.J., 2004. The relationship between lysosomal biomarker and organismal responses in an acute toxicity test with *Eisenia fetida* (Oligochaeta) exposed to the fungicide copper oxychloride. *Environmental Research*, 96, 95-101.

Maila M.P. & Cloete T.E., 2002. Germination of *Lepidium sativum* as method to evaluate polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) removal from contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 50, 107-113.

Majer B.J., 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. *Mutation Research*, 515, 111-124.

Maliszewska-Kordybach B. & Smreczak B., 2003. Habitat function of agricultural soils as affected by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *Environment International*, 28, 719-728.

Manerikar R.S., Apte A.A. & Ghole V.S., 2008a. *In vitro* and *in vivo* genotoxicity assessment of Cr(VI) using comet assay in earthworm coelomocytes. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 25, 63-68.

Manerikar R.S., Apte A.A. & Ghole V.S., 2008b. *In vitro* genotoxicity of fly ash leachate in earthworm coelomocytes. *Toxicological and Environmental Chemistry*, 90, 293-300.

Marcato-Romain C.E., Guirese 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.

Martin F.L., Pearce T.G., Hewer A., Phillips D.H. & Semple K.T., 2005. A biomarker model of sublethal genotoxicity (DNA single-strand breaks and adducts) using the sentinel organism *Aporrectodea longa* in spiked soil. *Environmental Pollution*, 138, 307-315.

Massicotte R., Robidoux P-Y., Sauvé S., Flipo D., Mathiot A., Fournier M. & Trottier B., 2004. Immunotoxicological response of the earthworm *Lumbricus terrestris* following exposure to cement kiln dusts. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 10-16.

Maxam G., Rila J.P., Dott W. & Eisentraeger A., 2000. Use of bioassays for assessment of water-extractable ecotoxic potential of soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 45, 240-246.

Mendonça E. & Picado A., 2002. Ecotoxicological monitoring of remediation in a coke oven soil. *Environmental Toxicology*, 17, 74-79.

Miller J.A. & Miller E.C., 1971. Chemical carcinogenesis: mechanisms and approaches to its control. *Journal of the National Cancer Institute*, 47, 5-14.

Mouchet F., Gauthier L., Mailhes C., Jourdain M.J., Ferrier V., Triffault G. & Devaux A., 2006. Biomonitoring of the genotoxic potential of aqueous extracts of soils and bottom ash resulting from municipal solid waste incineration, using the comet and micronucleus tests on amphibian (*Xenopus laevis*) larvae and bacterial assays (Mutatox and Ames tests). *Science of the Total Environment*, 355, 232-246.

Mougin C., 2002. Bioremediation and phytoremediation of industrial PAH-polluted soils. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 22(5), 1011-1043.

Mougin C., Jolival C., Briozzo P. & Madzak C., 2003. Fungal laccases: from structure-activity studies to environmental applications. *Environmental Chemistry Letters*, 1(2), 145-148.

## -N-

Nahmani J., Hodson M.E. & Black S., 2007. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution*, 149(1), 44-58.

Nakashima T., Okada T., Asahi J., Yamashita A., Kawai K., Kasai H., Matsuno K., Gamou S. & Hirano T., 2008. 8-hydroxydeoxyguanosine generated in the earthworm *Eisenia fetida* grown in metal-containing soil. *Mutation Research*, 654(2), 138-144.

Nisbet I.C. & Lagoy P.K., 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 16, 290-300.

Norini M-P., 2007. Ecodynamique des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) et des communautés microbiennes dans des sols à pollution mixte (HAP, métaux) avant et après traitement par biopile et par désorption thermique : Influence de la rhizosphère et de la mycorhization. Thèse de Doctorat en Géosciences, Laboratoire des Interactions microorganismes-minéraux-Matière Organique dans les Sols (LIMOS) – Université Henri Poincaré, Nancy, 243 pp.

Norme Française (NF T 90043), 1988. Essais des eaux. Dosage du chrome (VI) – Méthode par spectrométrie d'absorption moléculaire.

Nowak C., Mossman J.R. & Saada A., 2003. Etat des connaissances sur l'atténuation naturelle : mécanismes et mise en œuvre. Bureau de Recherches Géologiques et Minières, 101 pp.

National Research Council (NRC), 1993. Issues in Risk Assessment. National Academy Press, Washington D.C.

## -O-

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 1984. OECD Guidelines for testing of chemicals, Test No. 207: Earthworm Acute Toxicity Tests.



Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2004a. OECD Guidelines for testing of chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems, Test No. 222: Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/Eisenia andrei*).

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2004b. OECD Guidelines for testing of chemicals, Test No. 220: Enchytraeid reproduction test.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2006. OECD guidelines for the testing of chemicals, Test No. 208: Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test.

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 2009. OECD Guidelines for testing of chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems, Test No. 232: Collembolan Reproduction Test in Soil.

Östling O. & Johanson K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 123, 291–298.

## -P-

Pagnout C., Rast C., Veber A-M., Poupin P. & Férard J-F., 2006. Ecotoxicological assessment of PAHs and their dead-end metabolites after degradation by *Mycobacterium sp.* strain SNP11. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65, 151-158.

Pagnout C., Frache G., Poupin P., Maunit B., Muller J-F. & Férard J-F., 2007. Isolation and characterization of a gene cluster involved in PAH degradation in *Mycobacterium sp.* strain SNP11: Expression in *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup> 155. *Research in Microbiology*, 158, 175-186.

Panda R., Pati S.S. & Sahu S.K., 1999. Accumulation of zinc and its effects on the growth, reproduction and life cycle of *Drawida willsi* (Oligochaeta), a dominant earthworm in Indian crop fields. *Biology and Fertility of Soils*, 29, 419-423.

Plaza G., Nalecz-Jawecki G., Ulfig K. & Brigmon R.L., 2005. Assessment of genotoxic activity of petroleum hydrocarbon-bioremediated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62, 415-420.

Potin O., Rafin C. & Veignie E., 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54, 45–52.

## -Q-

Qiao M., Chen Y., Wang C-X., Wang Z. & Zhu Y-G., 2007. DNA damage and repair process in earthworm after *in-vivo* and *in-vitro* exposure to soils irrigated by wastewaters. *Environmental Pollution*, 148(1), 141-147.

**-R-**

Rajaguru P., Suba S., Palanivel M. & Kalaiselvi K., 2003. Genotoxicity of a polluted river system measured using the alkaline comet assay on fish and earthworm tissues. *Environmental Molecular and Mutagenesis*, 41, 85-91.

Rama R., Sigoillot J-C., Chaplain V., Asther M., Jolivald C. & Mouglin C., 2001. Inoculation of filamentous fungi in manufactured gas plant site soils and PAH transformation. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 18(4), 397-414.

REseau COopératif de Recherche sur les Déchets (RECORD), 2007. Etat des connaissances sur le devenir des polluants organiques dans les sols lors de la biodégradation naturelle et après biotraitements : Identification des composés « métabolites » et des cinétiques, 148 p, n°05-0513/1A.

Reid B.J., Stokes J.D., Jones K.C. & Semple K.T., 2000. Nonexhaustive cyclodextrin-based extraction technique for the evaluation of PAH bioavailability. *Environmental Science and Technology*, 34, 3174-3179.

Reinecke A.J., Reinecke S.A. & Maboeta M.S., 2001. Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species. *Pedobiologia*, 45, 61-68.

Reinecke S.A. & Reinecke A.J., 2004. The comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 46, 208-215.

Roch P., 1979. Protein analysis of earthworm coelomic fluid. 1-polymorphic system of the natural hemolysin of *Eisenia fetida andrei*. *Developmental and Comparative Immunology*, 3, 599-608.

Rojas E., Lopez M.C. & Valverde M., 1999. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal of Chromatography B.*, 711(1-2), 225-254.

Rollin C. & Quiot F., 2005. Hydrocarbures aromatiques polycycliques – Guide méthodologique : acquisition des données d'entrée des modèles analytiques ou numériques de transferts dans les sols et les eaux souterraines. Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques, 99 pp.

**-S-**

Saint-Denis M., Labrot F., Narbonne J.F. & Ribera D., 1998. Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(4), 602-614.

Saint Denis M., Narbonne J.F., Arnaud C., Thybaud E. & Ribera D., 1999. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of benzo[a]pyrene. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1837-1846.

Saint Denis M., Pfohl-leszkowicz A., Narbonne J.F. & Ribera D., 2000. Dose-response and kinetics of the formation of DNA adducts in the earthworm *Eisenia fetida Andrei* exposed to B[a]P-contaminated artificial soil. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 18(2), 117-127.

Šalagović J., Gilles J., Verschaeve L. & Kalina I., 1996. The comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biologica (Praha)*, 42, 17-21.

- Salanitro J.P., Dorn P.B., Huesemann M.H., Moore K.O., Rhodes I.A., Rice Jackson L.M. Vipond T.E., Western M.M. & Wisniewski H.L., 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environmental Science and Technology*, 31, 1769-1776.
- Sandifer R.D. & Hopkin S.P., 1996. Effects of pH on the toxicity of Cd, Cu, Pb and Zn to *Folsomia candida* in a standard laboratory test system. *Chemosphere*, 33, 2475-2486.
- Sandifer R.D. & Hopkin S.P., 1997. Effects of temperature on the relative toxicities of Cd, Cu, Pb, and Zn to *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 37, 125-130.
- Sasek V., Bhatt M., Cajthaml T., Malachova K. & Lednicka D., 2003. Compost-mediated removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 44, 336-342.
- Saterbak A., Toy R.J., Wong D.C.L., McMain B.J., Williams P., Dorn P.B., Brzuzy L.P., Chai E.Y. & Salanitro J.P., 1999. Ecotoxicological and analytical assessment of hydrocarbon-contaminated soils and application to ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(7), 1591-1607.
- Sauvé S., Hendawi M., Brousseau P. & Fournier M., 2002. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following *in vitro* exposure to trace elements. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 52, 21-29.
- Sayles G.D., Acheson C.M., Kupferle M.J., Shan Y., Zhou Q., Meier J.R., Chang L. & Brenner R.C., 1999. Land treatment of PAH-contaminated soil: Performance measure by chemical and toxicity assays. *Environmental Science and Technology*, 33, 4310-4317.
- Scott-Fordsmand J.J., Krogh P.H. & Hopkin S.P., 1999. Toxicity of nickel to a soil-dwelling springtail, *Folsomia fimetaria* (Collembola: Isotomidae). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 43, 57-61.
- Scullion J., 2006. Remediating polluted soils. *Naturwissenschaften*, 93, 51-65.
- Schultz E., Joutti A., Räsänen M-L., Lintinen P., Martikainen E. & Lehto O., 2004. Extractability of metals and ecotoxicity of soils from two old wood impregnation sites in Finland. *Science of the Total Environment*, 326, 71-84.
- Semple K.T., Morris W.J. & Paton G.I., 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *European Journal of Soil Science*, 54, 809-818.
- Seth C.S., Misra V., Chauhan L.K.S. & Singh R.R., 2008. Genotoxicity of cadmium on root meristem cells of *Allium cepa*: cytogenetic and comet assay approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 711-716.
- Shin K.H. & Kim K.W., 2001. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil using earthworm (*Eisenia fetida*). *Environmental Monitoring and Assessment*, 70, 93-103.
- Singh P., McCoy M.T., Tice R.R. & Schneider E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175, 184-191.
- Sivakumar S. & Subbhuraam C.V., 2005. Toxicity of chromium(III) and chromium(VI) to the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 62(1), 93-98.

- Smit C.E. & Van Gestel C.A.M., 1997. Comparison of the toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida* in artificially contaminated and polluted field soils. *Applied Soil Ecology*, 3, 127–136.
- Smit C.E. & Van Gestel C.A.M., 1998. Effects of soil type, prepercolation, and ageing on bioaccumulation and toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17, 1132-1141.
- Smith M.J., Flowers T.H., Duncan H.J. & Alder J., 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environmental Pollution*, 141, 519-525.
- Song Y.F., Wilke B.M., Song X.Y., Gong P., Zhou Q.X. & Yang G.F., 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, 1859–1868.
- Song Y.F., Gong P., Wilke B.M., Zhang W., Song X.Y., Sun T.H. & Ackland M.L., 2007. Genotoxicity assessment of soils from wastewater irrigation areas and bioremediation sites using the *Vicia faba* root tip micronucleus assay. *Journal of Environmental Monitoring*, 9(2), 182-186.
- Song Y., Zhu L.S., Wang J., Wang J.H., Liu W. & Xie H., 2009. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia fetida*) induced by atrazine. *Soil Biology and Biochemistry*, 41, 905-909.
- Sorensen T.S. & Holmstrup M., 2005. A comparative analysis of the toxicity of eight common soil contaminants and their effects on drought tolerance in the collembolan *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60, 132-139.
- Speit G. & Hartmann A., 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*, 10(6), 555-559.
- Spurgeon D.J., Hopkin S.P. & Jones D.T., 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny). *Environmental Pollution*, 84, 123-130.
- Spurgeon D.J. & Hopkin S.P., 1995. Extrapolation of the laboratory-based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. *Ecotoxicology*, 4, 190–205.
- Spurgeon D.J. & Hopkin S.P., 1996. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia fetida*, with particular reference to zinc. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 35, 86-95.
- Spurgeon D.J., Tomlin M.A. & Hopkin S.P., 1997. Influence of temperature on the toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 58(2), 283-290.
- Spurgeon D.J., Svendsen C., Rimmer V.R., Hopkin S.P. & Weeks J.M., 2000. Relative sensibility of live-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(7), 1800-1808.
- Spurgeon D.J., Weeks J.M. & Van Gestel C.A.M., 2003. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia*, 47, 588-606.
- Spurgeon D.J., Svendsen C., Kille P., Morgan A.J. & Weeks J.M., 2004. Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57(1), 54-64.

- Steinert S.A., Streib-Montee R., Leather J.M. & Chadwick D.B., 1998a. DNA damage in mussels at sites in San Diego Bay. *Mutation Research*, 399, 65-85.
- Steinert S.A., Streib-Montee R. & Sastre M.P., 1998b. Influence of sunlight on DNA damage in mussels exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Marine Environmental Research*, 46, 355-358.
- Steinkellner H., Mun-Sik K., Helma C., Ecker S., Ma T., Horak O., Kundi M. & Knasmuller S., 1998. Genotoxic effects of heavy metals: comparative investigation with plant bioassays. *Environmental Molecular and Mutagenesis*, 31, 183-191.
- Stenersen J., Guthenberg C. & Mannervik B., 1979. Glutathion S-transferases in earthworms (Lumbricidae). *Biochemical Journal*, 181, 47-50.
- Stroo H.F., Jensen R., Loehr R.C., Nakles D.V., Fairbrother A. & Liban C.B., 2000. Environmentally acceptable endpoints for PAHs at a manufactured gas plant site. *Environmental Science and Technology*, 34, 3831-3836.
- Stroomberg G.J., Zappey H., Steen R.J.C.A., Van Gestel C.A.M., Ariese F., Velthorst N.H. & Van Straalen N.M., 2004. PAH biotransformation in terrestrial invertebrates - a new phase II metabolite in isopods and springtails. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 138(2), 129-137.
- Stürzenbaum S.R., Kille P. & Morgan A.J., 1998. The identification, cloning and characterization of earthworm metallothionein. *FEBS Letters*, 431(3), 437-442.
- Sverdrup L.E., Kelley A.E., Krogh P.H., Nielsen T., Jensen J., Scott-Fordsmand J. & Stenersen J., 2001. Effects of eight polycyclic aromatic compounds on the survival and reproduction of the springtail *Folsomia fimetaria* L. (collembolan, isotomidae). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(6), 1332-1338.
- Sverdrup L.E., Jensen J., Krogh P.H. & Stenersen J., 2002a. Studies on the effect of soil aging on the toxicity of pyrene and phenantrene to a soil-dwelling springtail. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21, 489-492.
- Sverdrup L.E., Jensen J., Krogh P.H. & Stenersen J., 2002b. Soil ecotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons in relation to soil sorption, lipophilicity, and water solubility. *Environmental Science and Technology*, 36, 2429-2435.
- Sverdrup L.E., Krogh P.H., Nielsen T., Kjaer C. & Stenersen J., 2003. Toxicity of eight polycyclic aromatic compounds to red clover (*Trifolium pratense*), ryegrass (*Lolium perenne*) and mustard (*Sinapsis alba*). *Chemosphere*, 53, 993-1003.

## -T-

- Tang J., Carroquino M.J., Robertson B.K. & Alexander M., 1998. Combined effect of sequestration and bioremediation in reducing the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environmental Science and Technology*, 32, 3586-3590.
- Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J.C. & Sasaki Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environmental Molecular and Mutagenesis*, 35, 206-221.

## -U-

US Environmental Protection Agency (US-EPA), 1982. Methods for organic chemical analysis of municipal and industrial wastewater - Method 610: Polynuclear Aromatic Hydrocarbons (<http://www.epa.gov/waterscience/methods/method/organics/610.pdf>).

US Environmental Protection Agency (US-EPA), 1996. An assessment of the risk assessment paradigm for ecological risk assessment. United States Environmental Protection Agency, Washington, DC (<http://www.epa.gov/ncea/pdfs/riskcom/menzie.pdf>).

## -V-

Valembois P., Lassegues M. & Roch P., 1992. Formation of brown bodies in the coelomic cavity of the earthworm *Eisenia fetida andrei* and attendant changes in shape and adhesive capacity of constitutive cells. *Developmental and Comparative Immunology*, 16, 95-101.

Valembois P., Seymour J. & Lassegues M., 1994. Evidence of lipofuscin and melanin in the brown body of the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Cell and Tissue Research*, 277, 183-188.

Van Gestel C.A.M., Dirven-Van Breemen E.M., Baerselman R., Emans H.J.B., Janssen J.A.M., Postuma R. & Van Vliet P.J.M., 1992. Comparison of sublethal and lethal criteria for nine different chemicals in standardized toxicity tests using the earthworm *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 23, 206-220.

Van Gestel C.A.M. & Hensbergen P.J., 1997. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida Willem* (Collembolae: isotomidae) in relation to bioavailability in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 16(6), 1177-1186.

Van Gestel C.A.M., Van Der Waarde J.J., Derksen J.G.M., Van Der Hoek E.E., Veul M.F.X., Bouwens S., Rusch B., Kronenburg R. & Stokman G.N.M., 2001. The use of acute and chronic bioassays to determine the ecological risk and bioremediation efficiency of oil-polluted soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20, 1438-1449.

Van Gestel C.A.M. & Weeks J.M., 2004. Workshop Report, Recommendations of the 3rd International Workshop on Earthworm Ecotoxicology, Aarhus, Denmark, August 2001, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 57, 100-105.

Van Schooten F.J., Maas L.M., Moonen E.J.C., Kleinjans J.C.S. & Van Der Oost R., 1995. DNA dosimetry in biological indicator species living on PAH-contaminated soils and sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 30, 171-179.

Vasseur P., Bonnard M., Palais F., Eom I.C. & Morel J-L., 2008a. Bioavailability of chemical pollutants in contaminated soils and pitfalls of chemical analyses in hazard assessment. *Environmental Toxicology*, 23(5), 652-656.

Vasseur P., Cossu-Leguille C., Atienzar F., Rodius F. & Lemièrre S., 2008b. Marqueurs de génotoxicité et effets in situ, individuels et populationnels. Dans : Amiard J-C. & Amiard-Triquet C. (Eds), Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques. Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, France, pp 295-330.

Verschaeve L., Gilles J., Schoeters J., Van Cleuvenbergen R. & De Fré R., 1993. The single cell gel electrophoresis technique or comet test for monitoring dioxin pollution and effects. In: Fiedler H., Frank H., Hutzinger O., Parzefall W., Riss A. & Safe S., editors, Organohalogen compounds 11, Federal Environment Agency, Austria, 213-216.

Verschaeve L. & Gilles J., 1995. Single cell gel electrophoresis assay in the earthworm for the detection of genotoxic compounds in soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 112-119.

Ville A.T., Roch P., Cooper E.L., Masson P. & Narbonne J-F., 1995. PCBs increase molecular-related activities (lysosyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *Journal of Invertebrate Pathology*, 65, 217-224.

Voua Otomo P. & Reinecke S.A., 2009. Increased cytotoxic and genotoxic tolerance of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) to cadmium after long-term exposure. *Ecotoxicology*, 19(2), 362-368.

## -W-

Walsh P., El Adlouni C., Mukhopadhyay M.J., Viel G., Nadeau D. & Poirier G.G., 1995. <sup>32</sup>P-postlabelling determination of DNA adducts in the earthworm *Lumbricus terrestris* exposed to PAH-contaminated soils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 654-661.

Walsh P., El Adlouni C., Nadeau D., Fournier M., Coderre D. & Poirier G.G., 1997. DNA adducts in earthworms exposed to a contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(3/4), 721-724.

Wessel N., Rousseau S., Caisey X., Quiniou F. & Akcha F., 2007. Investigating the relationship between embryotoxic and genotoxic effects of benzo[a]pyrene, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol and endosulphan on *Crassostrea gigas* embryos. *Aquatic Toxicology*, 85, 133-142.

White P.A. & Claxton L.D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutation Research*, 567, 227-345.

## -X-

Xiao N-W., Song Y., Ge F., Liu X-H. & Ou-Yang Z-Y., 2006a. Biomarkers responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere*, 65(6), 907-912.

Xiao R-Y., Wang Z., Wang C-X., Yu G. & Zhu Y-G., 2006b. Genotoxic risk identification of soil contamination at a major industrialized city in Northeast China by a combination of *in vitro* and *in vivo* bioassays. *Environmental Science and Technology*, 40, 6170-6175.

## -Z-

Zang Y., Zhong Y., Luo Y. & Kong Z.M., 2000. Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 108, 271-278.

Zheng S., Song Y., Qiu X., Sun T., Ackland M.L. & Zhang W., 2008. Annetocin and TCTP expressions in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to PAHs in artificial soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 71, 566-573.

Zhu J., Zhao Z-Y. & Lu Y-T., 2006. Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and phenanthrene on earthworm. *Journal of Environmental Sciences*, 18(6), 1210-1215.

Zmirou D., Beausoleil M., de Coninck P., Déportes I., Dor F., Empereur-Bissonet P., Hours M., Keck G., Lefebvre L. & Rouisse L., 2003. Déchets et sols pollués. In, Environnement et santé publique – Fondements et pratiques, Gévin M., Gosselin P., Cordier S., Viau C., Quénel P. & Dewailly E., rédacteurs. Edisem / Tec & Doc, Acton Vale, Paris, pp. 397-440.



# *ANNEXES*

# Annexe 1 : Sol Homécourt (HOM)

Analyse des terres de la cokerie d' <i>Homécourt</i>							
Affectation des lots	BRGM	LIEBE	BFE	LIMOS	G2R	LSGC	LSE
N° de lot	2221	2222	2223	2224	2225	2226	2227
<b>Granulométrie</b>							
Argile (<2µm) (g/kg)	119	107	120	99	128	106	108
Limons fins (2-20µm) (g/kg)	131	135	149	151	145	150	154
Limons grossiers (20-50 µm) (g/kg)	84	86	98	91	96	103	101
Sables fins (50-200 µm) (g/kg)	199	193	197	184	185	179	198
Sables grossiers (200-2000 µm) (g/kg)	467	479	436	475	446	462	439
<b>Paramètres agronomiques</b>							
pH (eau)	9,58	9,6	9,43	9,55	9,58	9,54	9,53
Calcaire total (g/kg)	357	355	358	369	370	365	369
Phosphore (g/kg)	0,0912	0,0912	0,0955	0,0904	0,0909	0,0915	0,0935
Azote total (g/kg)	2,1	2,17	2,19	2,25	2,19	2,2	2,14
Carbone organique (g/kg)	97,7	100	101	102	99,2	101	99,7
Matière organique(g/kg)	169	174	174	177	172	175	173
C/N	46,5	46,1	45,9	45,4	45,2	46,1	46,7
<b>Éléments échangeables à l'acétate d'ammonium</b>							
Calcium CaO (g/kg)	18,1	16,8	16,5	16,8	16,7	19,6	17
Calcium Ca (g/kg)	13	12	11,8	12	12	14	12,2
Magnesium MgO (g/kg)	0,16	0,167	0,159	0,168	0,161	0,158	0,157
Magnesium Mg (g/kg)	0,0962	0,1	0,096	0,101	0,0972	0,095	0,0943
Potassium K2O (g/kg)	0,339	0,368	0,357	0,349	0,341	0,343	0,349
Potassium K (g/kg)	0,281	0,306	0,296	0,289	0,283	0,284	0,289
<b>Métaux totaux (HF)</b>							
Bore (mg/kg)	0,695	0,659	0,606	0,625	0,599	0,653	0,683
Cuivre (mg/kg)	26,6	26,6	25,5	28,4	27,4	27,6	28,5
Zinc (mg/kg)	341	353	348	369	359	375	361
Chrome (mg/kg)	53,3	54,9	54,7	56,6	56,9	56,8	55,5
Nickel (mg/kg)	22,8	23,3	23	24,9	24	24,4	24,3
Cobalt (mg/kg)	9,99	10,3	10	10,9	10,7	10,7	10,7
Plomb (mg/kg)	121	124	116	128	123	119	121
Cadmium (mg/kg)	6,16	7,38	6,64	6,23	6,67	6,39	6,25
Mercure (mg/kg)	11,8	12,1	12,3	12,8	12	14,5	12
Molybdène (mg/kg)	1,46	1,47	1,48	1,58	1,67	1,51	1,55
<b>Métaux extractible à l'EDTA</b>							
Cuivre (mg/kg)	6,95	6,58	6,45	6,85	6,47	6,4	6,5
Manganèse (mg/kg)	92,9	93,2	93,1	88,6	88,1	92,4	91,9
Zinc (mg/kg)	25,1	23,5	23,3	24,4	23,7	23,5	23,7
Fer (mg/kg)	60,1	60,3	63,2	60,6	59,4	59,3	59,3
<b>Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques</b>							
16HAP US-EPA (mg/kg MS)	2 675	2 851	2 375	3 031	2 379	2 080	2 401
naphtalène (mg/kg MS)	8,73	4,94	3,89	3,45	5,39	2,48	5,94
acénaphthylène (mg/kg MS)	4,36	4,94	4,37	6,89	5,39	2,97	4,45
acénaphthène (mg/kg MS)	50,42	45,94	43,25	47,27	43,11	33,20	40,56
fluorène (mg/kg MS)	106,18	109,17	92,82	133,45	96,50	75,33	91,52
phénanthrène (mg/kg MS)	383,01	424,84	331,91	415,13	329,17	306,77	375,96
anthracène (mg/kg MS)	191,51	221,81	143,84	388,54	197,40	133,81	147,91
fluoranthène (mg/kg MS)	569,19	606,14	508,31	600,78	492,29	445,04	515,95
pyrène (mg/kg MS)	381,07	406,07	350,37	400,85	340,44	305,78	350,73
benzo(a)anthracène (mg/kg MS)	233,20	247,49	208,96	249,67	206,71	183,37	210,24
chrysène (mg/kg MS)	199,75	210,94	178,35	218,15	180,26	156,61	174,62
benzo(b)fluoranthène (mg/kg MS)	148,84	152,65	137,04	153,64	129,81	117,95	131,59
benzo(k)fluoranthène (mg/kg MS)	91,63	92,38	82,13	93,56	79,35	70,87	79,15
benzo(a)pyrène (mg/kg MS)	144,48	153,14	136,07	152,66	130,30	115,97	129,11
dibenzo(ah)anthracène (mg/kg MS)	16,00	15,81	14,58	15,76	13,23	11,89	13,36
benzo(ghi)pérylène (mg/kg MS)	64,48	68,17	61,72	66,97	57,31	51,54	56,89
indénopyrène (mg/kg MS)	82,91	86,94	77,75	85,19	72,50	67,40	73,71

## Annexe 2 : Sol Neuves-Maisons (NM)

Analyse des terres de la cokerie de <b>Neuves-Maisons</b>			
Affectation des lots	LIEBE	LIMOS	LSE
N° de lot	2773	2774	2775
<b>Granulométrie</b>			
Argile (<2µm) (g/kg)	129	126	130
Limons fins (2-20µm) (g/kg)	138	164	146
Limons grossiers (20-50µm) (g/kg)	75	97	95
Sables fins (50-200µm) (g/kg)	84	120	123
Sables grossiers (200-2000µm) (g/kg)	574	493	506
<b>Paramètres agronomiques</b>			
pH (eau)	6,69	7,13	7,39
Calcaire (CaCO <sub>3</sub> ) total (g/kg)	32,9	37,7	35,7
Phosphore (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (g/kg)	0,229	0,287	0,3
Carbone Organique (C) (g/kg)	75,4	70,6	71,5
Azote total (N) (g/kg)	2,95	2,74	2,69
C/N	25,5	25,8	26,6
Matière organique (g/kg)	130	122	124
<b>Eléments échangeables à l'acétate d'ammonium</b>			
Calcium (cmol/kg)	158	144	137
Magnésium (cmol/kg)	8,52	7,57	7,35
Potassium (cmol/kg)	1,44	1,4	1,51
<b>Métaux extractibles à l'EDTA</b>			
Cuivre (Cu) (mg/kg)	8,4	8,8	8,54
Fer (Fe) (mg/kg)	112	83,2	82,7
Manganèse (Mn) (mg/kg)	476	353	420
Zinc (Zn) (mg/kg)	250	294	198
<b>Métaux totaux (HF)</b>			
Cobalt (Co) (mg/kg)	26,9	27	28,2
Plomb (Pb) (mg/kg)	639	683	684
Cadmium (Cd) (mg/kg)	2,05	2,37	2,31
Molybdène (Mo) (mg/kg)	11,1	11,36	12,4
Chrome (Cr) (mg/kg)	340	372	325
Cuivre (Cu) (mg/kg)	108	95,5	110
Nickel (Ni) (mg/kg)	104	102	260
Zinc (Zn) (mg/kg)	2490	2770	2680
Mercure (Hg) (mg/kg)	4,74	3,38	3,88
<b>Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques</b>			
16 HAP US-EPA (mg/kg MS)	1846	1219	1551
Naphthalene (mg/kg MS)	36	27	30
Acenaphthylene (mg/kg MS)	1,9	<1,5	1,7
Acenaphthene (mg/kg MS)	150	39	62
Fluorene (mg/kg MS)	85	34	57
Phenanthrene (mg/kg MS)	230	120	170
Anthracene (mg/kg MS)	72	51	63
Fluoranthene (mg/kg MS)	320	210	250
Pyrene (mg/kg MS)	240	170	200
Benzo[a]anthracene (mg/kg MS)	140	105	130
Chrysene (mg/kg MS)	120	95	110
Benzo[b]fluoranthene (mg/kg MS)	110	91	120
Benzo[k]fluoranthene (mg/kg MS)	67	53	68
Benzo[a]pyrene (mg/kg MS)	110	92	120
Dibenzo[ah]anthracene (mg/kg MS)	13	10	13
Benzo[ghi]perylene (mg/kg MS)	70	58	71
Indeno[1,2,3-cd]pyrene (mg/kg MS)	81	64	85

## Annexe 3 : Sol Neuves-Maisons thermodésorbé (NMDT)

Analyse de la terre de la cokerie de <i>Neuves-Maisons thermodésorbée</i>	
Affectation des lots	TT Des NM
N° de lot	3018
<b>Granulométrie</b>	
Argile (<2µm) (g/kg)	121
Limon fins (2-20µm) (g/kg)	100
Limon grossiers (20-50µm) (g/kg)	100
Sables fins (50-200µm) (g/kg)	161
Sables grossiers (200-2000µm) (g/kg)	518
<b>Paramètres agronomiques</b>	
pH (eau)	8,03
Calcaire (CaCO <sub>3</sub> ) total (g/kg)	53,7
Phosphore (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) (g/kg)	0,564
Carbone Organique (C) (g/kg)	61,7
Azote total (N) (g/kg)	0,913
C/N	67,5
Matière organique (g/kg)	107
<b>Éléments échangeables à l'acétate d'ammonium</b>	
Calcium CaO (g/kg)	38,9
Calcium Ca (g/kg)	27,8
Magnésium MgO (g/kg)	0,279
Magnésium Mg (g/kg)	0,168
Potassium K <sub>2</sub> O (g/kg)	0,514
Potassium K (g/kg)	0,427
<b>Métaux totaux (HF)</b>	
Bore (B) (mg/kg)	3,35
Cobalt (Co) (mg/kg)	24,1
Plomb (Pb) (mg/kg)	725
Cadmium (Cd) (mg/kg)	2,14
Molybdène (Mo) (mg/kg)	12,4
Chrome (Cr) (mg/kg)	491
Cuivre (Cu) (mg/kg)	105
Nickel (Ni) (mg/kg)	105
Zinc (Zn) (mg/kg)	2690
Mercure (Hg) (mg/kg)	2,23
<b>Métaux extractibles à l'EDTA</b>	
Cuivre (Cu) (mg/kg)	12,1
Fer (Fe) (mg/kg)	41,1
Manganèse (Mn) (mg/kg)	165
Zinc (Zn) (mg/kg)	364
<b>Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques</b>	
16 HAP US-EPA (mg/kg MS)	101
Naphthalene (mg/kg MS)	2,5
Acenaphthylene (mg/kg MS)	<1,5
Acenaphthene (mg/kg MS)	1,2
Fluorene (mg/kg MS)	1,6
Phenanthrene (mg/kg MS)	16
Anthracene (mg/kg MS)	4,6
Fluoranthene (mg/kg MS)	23
Pyrene (mg/kg MS)	15
Benzo[a]anthracene (mg/kg MS)	6,7
Chrysene (mg/kg MS)	6,8
Benzo[b]fluoranthene (mg/kg MS)	6,9
Benzo[k]fluoranthene (mg/kg MS)	3
Benzo[a]pyrene (mg/kg MS)	4,5
Dibenzo[ah]anthracene (mg/kg MS)	0,63
Benzo[ghi]perylene (mg/kg MS)	3,9
Indeno[1,2,3-cd]pyrene (mg/kg MS)	4,4

## **Annexe 4**

### Constituants du substrat artificiel ISO

#### **Sable de Fontainebleau (70%)**

Origine : PROLABO VWR

Référence produit : 27460.460

N° EINECS : 3101276

#### **Kaolin Lavé Technical (20%)**

Origine : PROLABO VWR

Référence produit : 24926.364

CAS : 1332-58-7

N° EINECS : 3101276

#### **Tourbe blonde de sphaigne (10%)**

Origine : Animalerie

Références produit : JBL80 613

Support de culture : NF U 44-551

Matière Sèche : 33%

Matière Organique : 90%

pH (H<sub>2</sub>O) : 4.4

Conductivité : 5 mS/m

Capacité de Rétention en Eau (CRE) : 70%

## Annexe 5

### Composition du tampon PBS (Phosphate Buffer Saline) sans Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup>

Pour un litre de tampon à 0.01 M, dissoudre successivement les sels suivants dans de l'eau ultrapure stérile :

- Chlorure de sodium (NaCl) 8 g
- Chlorure de potassium (KCl) 200 mg
- Monohydrogénophosphate de sodium anhydre (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 1150 mg
- Monohydrogénophosphate de potassium anhydre (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) 200 mg

Vérifier que le pH du tampon avoisine 7.4. Conserver à température ambiante.

### Solution de lyse

Pour un litre de solution de lyse :

2.5 M NaCl	146.1 g
100 mM Na <sub>2</sub> EDTA	37.2 g
10 mM Tris	1.2 g
<i>Ajuster le pH à 10 avec de la soude</i>	
1% N-laurylsarcosinate	10 g

Ajuster à 890 mL avec de l'eau ultrapure et stérile. Conserver à température ambiante 1 mois. Mettre 30 minutes à 4°C avant l'étape de lyse. Extemporément ajouter 1% de Triton X100 et 10% de DMSO (soit 1 mL de Triton et 10 mL de DMSO dans 89 mL de la solution précédente).

### Tampon d'électrophorèse (300 mM NaOH / 1mM Na<sub>2</sub>EDTA)

Préparer des solutions-stocks :

<b>S<sub>1</sub> :</b> 10 N NaOH	(pour 100 mL, peser 40 g NaOH)
<b>S<sub>2</sub> :</b> 200 mM Na <sub>2</sub> EDTA	(pour 100 mL, peser 7.45 g Na <sub>2</sub> EDTA)

Conserver à température ambiante au maximum 15 jours. Pour du tampon 1X, extemporément mélanger 30 mL de S<sub>1</sub> et 5 mL de S<sub>2</sub>. Ajuster le volume à 1 litre avec de l'eau ultrapure. Bien homogénéiser.

### Tampon de neutralisation

Préparer un tampon Tris (0.4 M) à pH 7.5. Pour cela, dissoudre 48.5 g de Tris dans 1 litre d'eau ultrapure et ajuster le pH à 7.5 avec de l'acide chlorhydrique HCl 36%. Conserver à température ambiante.







**Résumé :** L'objectif du travail de recherche était de mettre en relation dans des sols de cokeries anciennement contaminés, la biodisponibilité de polluants (HAP et/ou métaux lourds), leur génotoxicité et leurs effets populationnels chez le ver de terre *Eisenia fetida*.

Cette étude a montré que les sols étudiés, malgré une contamination similaire, présentaient une toxicité vis-à-vis des vers de terre et d'autres organismes terrestres (plantes, collemboles) totalement différente. Ces différences d'écotoxicité seraient imputables à la biodisponibilité des polluants, différente entre les sols. Cette étude a également montré que le traitement de thermodésorption, appliqué à l'un des sols contaminés, augmentait la biodisponibilité des métaux lourds. Le traitement de thermodésorption modifierait à la fois 1) la nature et la composition de la matière organique du sol, 2) la spéciation des métaux lourds, 3) les liens entre la matière organique et les métaux, les rendant plus biodisponibles et génotoxiques vis-à-vis des vers de terre.

L'approche biologique-écotoxicologique, qui prend en considération la biodisponibilité des polluants, se révèle donc essentielle en complément de l'approche physico-chimique dans l'évaluation 1) des risques et 2) de l'efficacité de remédiation des sols contaminés.

Cette étude a également montré que la mesure des dommages à l'ADN des coelomocytes de vers de terre est un biomarqueur pertinent dans l'évaluation de la génotoxicité des polluants des sols. Ce biomarqueur de génotoxicité peut être utilisé en tant qu'indicateur de biodisponibilité des polluants. Il s'est révélé plus sensible que la survie et au moins aussi sensible que la reproduction, qui sont deux paramètres étudiés classiquement chez les vers de terre. Ce biomarqueur de génotoxicité pourrait être utilisé en tant qu'indicateur précoce de perturbations physiologiques, même si le lien mécanistique entre les dommages à l'ADN et les répercussions sur la reproduction des vers de terre nécessite des recherches ultérieures.

**Mot clés :** *Eisenia fetida*, test comet, génotoxicité, écotoxicité, sols anciennement contaminés, friches industrielles, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), métaux lourds.

**Abstract:** The aim of this work research was to show in formerly-contaminated coking plant soils a relationship between the bioavailability of soil pollutants (PAH and/or heavy metals), their genotoxicity and their populational effects in the *Eisenia fetida* earthworm.

This study showed that despite a similar contamination studied soils exhibited a great difference in ecotoxicity to earthworms and other terrestrial organisms (plants, springtails). Differences in ecotoxicity of soils would be attributable to bioavailability of soil pollutants which is different between soils. This study also showed that thermal desorption applied on one of the contaminated soils increased bioavailability of heavy metals. Thermal desorption would modify 1) the nature and composition of soil organic matter, 2) the speciation of heavy metals, 3) links between soil organic matter and heavy metals, rendering them more bioavailable and genotoxic to earthworms.

The biological-ecotoxicological approach, which takes into consideration the bioavailability of soil pollutants, reveals to be necessary in addition of the physico-chemical approach in the evaluation of 1) risks and 2) remediation efficiency of contaminated soils.

This study also showed that the measure of DNA damage in coelomocytes of earthworms is a relevant biomarker in the evaluation of genotoxicity of soil pollutants. This biomarker of genotoxicity can be used as indicator of bioavailability of soil pollutants. It revealed more sensitive than survival and as sensitive as reproduction, which are classical endpoints measured in earthworms. This biomarker of genotoxicity could be used as early indicator of physiological disturbances, even if the mechanistic link between DNA damage and effects on reproduction require further studies.

**Keywords:** *Eisenia fetida*, comet assay, genotoxicity, ecotoxicity, formerly-contaminated soils, industrial wastelands, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), heavy metals.