

# Effets du pH du sol sur le test de génotoxicité *Vicia*-micronoyaux

A. Dhyèvre\*, A.-S. Foltête, D. Aran, S. Muller et S. Cotelle

Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC) - CNRS UMR 7360, Université de Lorraine, Campus Bridoux, Bât. IBISE, 8 rue du Général Delestraint, 57070 Metz, FRANCE

\* : Auteur correspondant : adriendhyevre@yahoo.fr

## RÉSUMÉ

Face à la multiplication des sites et sols contaminés, il est nécessaire d'apporter une solution technique pour évaluer le potentiel génotoxique des sols. En effet, il n'existe actuellement aucun test normalisé au niveau international pour mesurer la génotoxicité (toxicité vis-à-vis du matériel génétique) des matrices solides par exposition directe. La normalisation ISO du test *Vicia*-micronoyaux nous a amenés à travailler sur l'effet du pH sur la fréquence des micronoyaux ainsi que la gamme de pH dans laquelle le test est réalisable. Deux approches ont été envisagées : la modification artificielle du pH d'un sol et l'exposition à des sols de pH naturellement différents. Les résultats montrent que le test peut être réalisé en respectant les critères de validité dans une gamme de pH allant de 3,1 à 9,0 sans observer d'augmentation de la fréquence des micronoyaux. Les tests réalisés avec les sols naturels de pH différents confirment ces résultats.

## Mots clés

Génotoxicité, *Vicia*-micronoyaux, pH, exposition directe, sites et sols contaminés.

**SUMMARY****EFFECTS OF SOIL PH ON THE GENOTOXICITY TEST VICIA-MICRONUCLEUS**

*In the area of contaminated sites and soils management, it is necessary to bring technical solution to study the potential genotoxicity of soils. Indeed, there is no international standardized test to assess the genotoxicity (toxicity towards genetic material) of soils and soil materials by direct exposure. The ISO standardization of Vicia-micronucleus test brought us to work on the effects of pH on the micronucleus frequency as well as the range of pH in which the test is practicable. Two approaches were envisaged : the artificial modification of a soil and the exposure at soils bearing naturally different pHs. Results show that the test could be performed by respecting validity criteria in pHs ranging from 3.1 to 9.0 without increase of micronucleus frequency. Tests carried out with soils bearing different pHs confirm these results.*

**Key-words**

*Genotoxicity, Vicia-micronucleus, pH, direct exposure, soil, soil materials.*

**RESUMEN****EFFECTOS DEL PH DEL SUELO SOBRE EL TEST DE GENOTOXICIDAD VICIA-MICRONÚCLEOS**

*Frente a la multiplicación de los sitios y suelos contaminados, se debe aportar una solución técnica para evaluar el potencial genotóxico de los suelos. En efecto, actualmente no existe ningún test normalizado al nivel internacional para medir la genotoxicidad (toxicidad vis à vis del material genético) de las matrices sólidas por exposición directa. La normalización ISO del test Vicia-micronúcleos nos llevó a trabajar sobre el efecto del pH sobre la frecuencia de micronúcleos así que la gama de pH en la cual el test está factible. Se contemplo dos enfoques : la modificación artificial del pH de un suelo y la exposición a suelos de pH naturalmente diferentes. Los resultados muestran que el test puede estar realizado respetando los criterios de validez en una gama de pH que va de 3,1 a 9,0 sin observar aumento de la frecuencia de micronúcleos. Los testes realizados con suelos naturales de pH diferentes confirman estos resultados.*

**Palabras clave**

*Genotoxicidad, Vicia-micronúcleos, pH, exposición directa, sitios y suelos contaminados*

L'étude de notre environnement vis-à-vis des contaminants, de son comportement, de son fonctionnement et de son évolution nécessite des outils pour le caractériser. L'étude physico-chimique, au demeurant indispensable, ne permet pas de prévoir les réponses telles que la biodisponibilité ou les réactions complexes du vivant face à une matrice multi-contaminée. Il est donc nécessaire de mettre au point des tests d'écotoxicologie robustes utilisant des organismes pertinents vis-à-vis de la biologie des sols. De plus, il est apparu indispensable, parmi ces tests d'écotoxicologie, d'étudier la génotoxicité des sols (toxicité vis-à-vis du matériel génétique) afin de les caractériser au mieux. Néanmoins, il n'existe pas de bio-essais permettant une évaluation rigoureuse du potentiel génotoxique des sols, mais seulement des tests utilisant des procaryotes marins (Mutatox) ou génétiquement modifiés (test d'Ames). D'autre part, la méthodologie appliquée à l'échantillon de sol (e.g. lixiviation, filtration, ajustement du pH...) peut rendre l'interprétation des résultats délicate.

Cette nécessité est bien réelle, d'une part pour l'évaluation des sites contaminés, mais également pour aider la recherche et les industriels à mieux appréhender les effets des moyens de traitements lourds qu'ils ont développés ces dernières années (oxydoréduction, utilisation des nanoparticules).

Les plantes ont un intérêt tout particulier en écotoxicologie en effet, par leur immobilité et leur lieu de vie, elles sont directement exposées au sol et à une potentielle pollution de ce dernier. De plus, elles possèdent un système racinaire étendu formant une surface d'échange importante avec leur environnement. Ces différents facteurs auxquels s'ajoute leur place fondamentale dans les réseaux trophiques en font des organismes de choix en écotoxicologie (Hock et Elstner, 2005).

Ma *et al.* (1999) décrivent les plantes supérieures comme les plus sensibles pour la détection des effets mutagènes et génotoxiques des polluants environnementaux. Parmi celles-ci, la fève (*Vicia Faba*) est un modèle végétal très utilisé en écotoxicologie. En effet cette espèce se révèle être très sensible à la pollution des sols, notamment lors d'une contamination en éléments traces métalliques. De plus, dans le domaine de la génotoxicité, son caryotype simple (Duc, 1997) lui a permis d'être utilisée dans de nombreuses études (De Marco *et al.*, 1995 ; Kanaya *et al.*, 1994 ; Sang & Li, 2004). Sur une batterie de 20 bio-essais d'écotoxicité des sols, *Vicia faba* apparaît comme le modèle le plus sensible et pourtant peu utilisé (Bierkens *et al.*, 1998 ; White et Claxton, 2004). A l'inverse les auteurs observent que les tests les plus courants se révèlent également être les moins sensibles. Le test *Vicia-micronoyaux* est également peu onéreux, ne demandant qu'une enceinte thermostatée et un microscope optique (Grant *et al.*, 1981).

L'un des critères largement répandus pour l'évaluation de la génotoxicité est la formation de micronoyaux. Ces derniers peuvent se définir comme étant « un petit noyau surnuméraire et séparé du noyau principal de la cellule, formé pendant la

télophase mitotique ou méiotique et constitué de chromosomes entiers ou de fragments acentriques d'ADN résultant de modifications structurales, spontanées ou expérimentales, des chromosomes » (Rieger, 1968).

Les avantages de ce critère sont multiples : les micronoyaux sont notamment visibles dans les cellules en interphase, stade le plus long du cycle mitotique, permettant ainsi d'observer un échantillon cellulaire conséquent. De plus, ce critère est plus simple que celui des aberrations chromosomiques et la formation spontanée de micronoyaux est rare. Cependant, l'apparition de micronoyaux est un processus mitose-dépendant, ce qui empêche leur formation lors d'une forte cytotoxicité (Cotelle, 1999).

Depuis le programme international sur les bio-essais utilisant des plantes en 1995, sous l'égide du programme des nations unies pour l'environnement, nos travaux se sont dirigés vers le développement du test *Vicia-micronoyaux* (Foltête *et al.*, 2011) en vue de sa normalisation au niveau international par l'ISO (ISO/DIS 29200).

L'objectif de notre étude est de délimiter la gamme de pH du sol dans laquelle le test *Vicia-micronoyaux* peut être réalisé et d'observer l'effet de cette variable sur différents paramètres tels que l'élongation racinaire, l'indice mitotique et la fréquence de micronoyaux. Pour cela nous avons suivi deux approches : d'une part un essai où le pH du sol a été artificiellement modifié avec l'ajout d'acide ou de base, d'autre part un essai avec des sols de pH naturellement différents.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Prélèvement et description des sols

#### Sol LUFA 2.2.

La modification artificielle du pH du sol a été réalisée sur un sol de référence de type LUFA 2.2. (Speyer, Allemagne)<sup>1</sup>. C'est un sol commercial issu d'une prairie, sablo-limoneux avec un pH de 5,7. Nous avons modifié son pH par ajout d'acide chlorhydrique (1N) ou de Soude (1N) dans les proportions présentées dans le *tableau 1*.

Une série a également été contaminée artificiellement avec du cuivre à une concentration de 2 mmol.kg<sup>-1</sup> sols sec de CuSO<sub>4</sub> pour évaluer l'effet du pH sur cet élément trace métallique.

#### Sols Naturels

Les sols naturels ont été prélevés dans des prairies de la région Lorraine suite à l'étude de paramètres du milieu (matériau

<sup>1</sup> <http://www.lufa-speyer.de/images/stories/bodanalyse.pdf>

**Tableau 1 - Quantification des ajouts d'acide et de soude dans le sol LUFA2.2.**

**Table 1 - Quantification of acid and soda additions in LUFA 2.2. soil.**

pH désiré	masse sol (g)	HCl 1N (mL)	NaOH 1N (mL)
4	1 450	62,25	-
5	1 450	29	-
6	1 450	7,25	-
7	1 450	-	7,25
8	1 450	-	21,75
9	1 450	-	80
10	1 450	-	130

parental notamment) et des assemblages phytosociologiques, ces derniers permettant d'obtenir un ordre de grandeur du pH. Les horizons A ont été prélevés, séchés à l'air libre puis tamisés à 2 mm. Le pH du sol a été mesuré en suivant la norme NF ISO 10390, l'humidité résiduelle du sol et la capacité de rétention ont été mesurées respectivement en suivant les normes ISO 11465 et ISO 11268-2.

## Réalisation du test Vicia-micronoyaux

### Préparation des fèves

Des graines de *Vicia faba* variété *aguadulce* (Fabre, France) ont été placées dans deux fois leur volume d'eau déminéralisée durant une nuit pour amorcer la germination puis mises à germer durant 72 heures dans du coton hydrophile, après avoir retiré leur tégument. Avant d'être mises en terre, les racines primaires ont été coupées à 2 mm de leur extrémité pour amorcer la croissance des racines secondaires.

### Croissance des fèves en milieu solide

Les fèves ont été plantées en triplicat par pot dans 200 g de sol sec, humidifié avec 70 % de leur capacité de rétention en eau. La croissance a été réalisée durant 5 jours sous lumière artificielle (Enviro-lite UK, 125 W, 6 400 °K) avec une photopériode 16 (h/h) et une température de 24 °C ± 2 °C dans un phytotron.

### Récolte et stockage des fèves

A l'issue de la croissance, les fèves ont été déterrées et l'ensemble des racines a ensuite été prélevé et placé dans une solution de Carnoy (éthanol absolu : acide acétique ; 75v : 25v) pour l'étape de fixation des cellules pendant 24 heures puis stocké à 4 °C dans de l'alcool à 70 % jusqu'à l'étape d'hydrolyse.

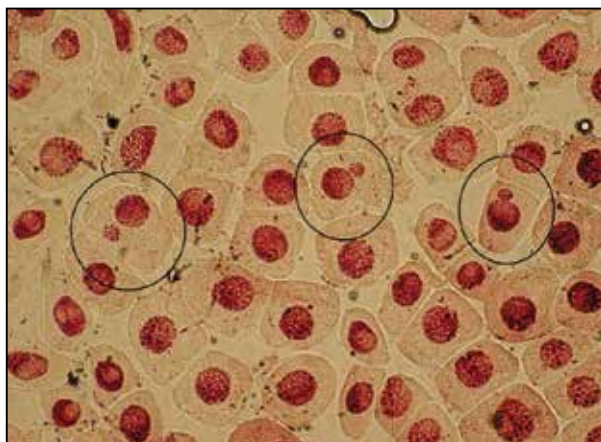
**Figure 1 - Dispositif expérimental.**

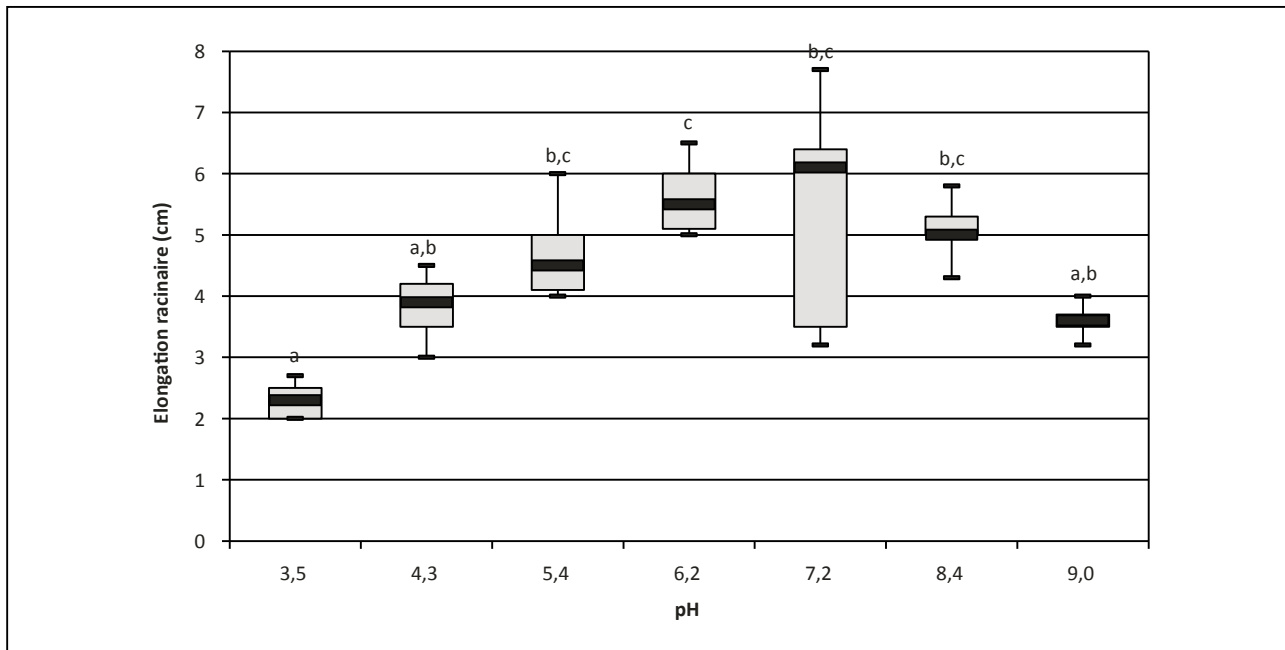
**Figure 1 - Experimental device.**



**Figure 2 - Micronoyaux dans les cellules de racines de Vicia.**

**Figure 2 - Micronuclei in root cells of Vicia.**



**Figure 3** - Elongation des racines secondaires exposées à des sols de pH modifié.**Figure 3** - Secondary root elongation exposed to the artificially modified pH soils.

Cette dernière étape a été réalisée durant 6 minutes dans de l'acide chlorhydrique (1N) à 60 °C.

### Mesure de l'élongation racinaire

Pour chaque fève, les trois plus grandes racines secondaires ont été coupées et mesurées à l'aide d'un double décimètre afin de mesurer l'élongation racinaire, critère macroscopique de toxicité des polluants.

### Observation des cellules

La détermination de la fréquence de micronoyaux (généotoxicité) et de l'indice mitotique (cytotoxicité) a été réalisée sous microscope optique avec un grossissement de 400x. Pour cela le premier millimètre de la racine, correspondant à la coiffe et aux cellules mères, a été supprimé et le millimètre suivant a été coloré avec de l'orcéine puis placé entre lame et lamelle. Le comptage a été réalisé en aveugle sur un effectif d'environ 1 000 cellules.

### Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel R. Le test de Kruskal-Wallis, suivi d'un test multi-comparaisons pour échantillons non paramétriques et non appariés ont été utilisés avec un risque d'erreur bilatéral de 5 %.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

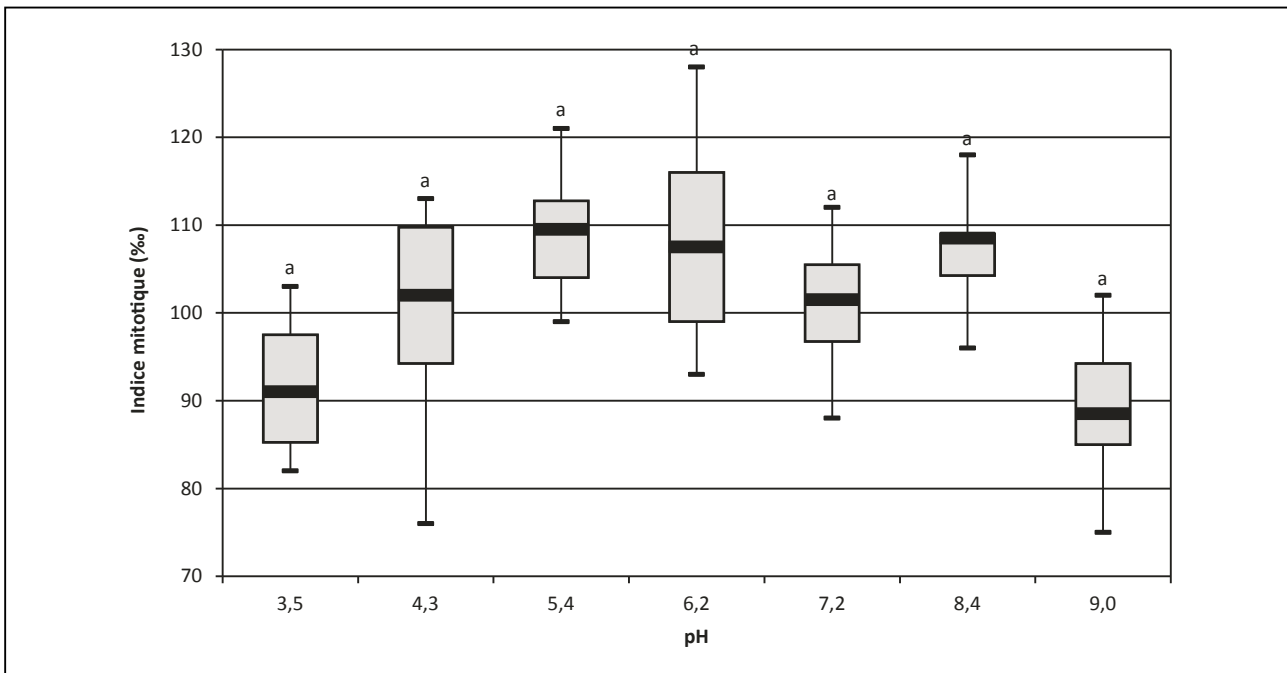
### Modification artificielle du pH

Avec l'ajout d'acide et de base, nous avons obtenu 8 échantillons de sols couvrant une gamme de pH allant de 3,5 à 10,0. Les racines secondaires se sont développées dans tous les échantillons à l'exception de ceux avec le pH le plus basique, les racines primaires étant nécrosées. Les racines secondaires s'allongent de 2 à 3 cm pour les pH extrêmes avec un maximum de 6 cm lorsque le pH est neutre (figure 3). Cela permet donc de poursuivre la suite du test en réalisant des étalements cellulaires. Les différences de croissances peuvent être expliquées par la modification de la disponibilité des nutriments résultant des variations de pH.

L'étude de l'indice mitotique montre que le pH n'a pas d'effet sur l'indice mitotique malgré une légère diminution aux extrêmes. Il est supérieur à 20 % pour tous les échantillons, le test *Vicia-micronoyaux* peut donc être considéré comme valide dans toute la gamme de pH testée (figure 4).

La variation de pH n'entraîne pas d'augmentation significative de la fréquence de micronoyaux dans la gamme testée, les médianes n'excédant jamais 1 micronoyau/1 000 cellules (tableau 2).

D'après nos essais avec la modification artificielle du pH, le test *Vicia-micronoyaux* peut être réalisé dans une gamme

**Figure 4** - Indice mitotique dans les racines secondaires de *Vicia faba* exposées à des sols de pH modifié.**Figure 4** - Mitotic index in the secondary roots of *Vicia faba* exposed to artificially modified pH soils.**Tableau 2** - Fréquence des micronoyaux dans les racines secondaires de *Vicia faba* exposées à des sols à pH modifié.**Table 2** - Micronuclei frequency in the secondary roots of *Vicia faba* exposed to artificially modified pH soils.

pH	Fréquence μN/1 000 cellules		
3,5	0,8	±	0,8
4,3	0,8	±	0,8
5,4	0,5	±	0,5
6,2	0,8	±	0,8
7,2	0,8	±	1,0
8,4	0,7	±	0,5
9,0	0,3	±	0,5

allant de 3,2 à 9,0. Cependant, cette approche ne reflète pas complètement la réalité, le pH du sol étant régi par des mécanismes complexes.

### Variation naturelle du pH

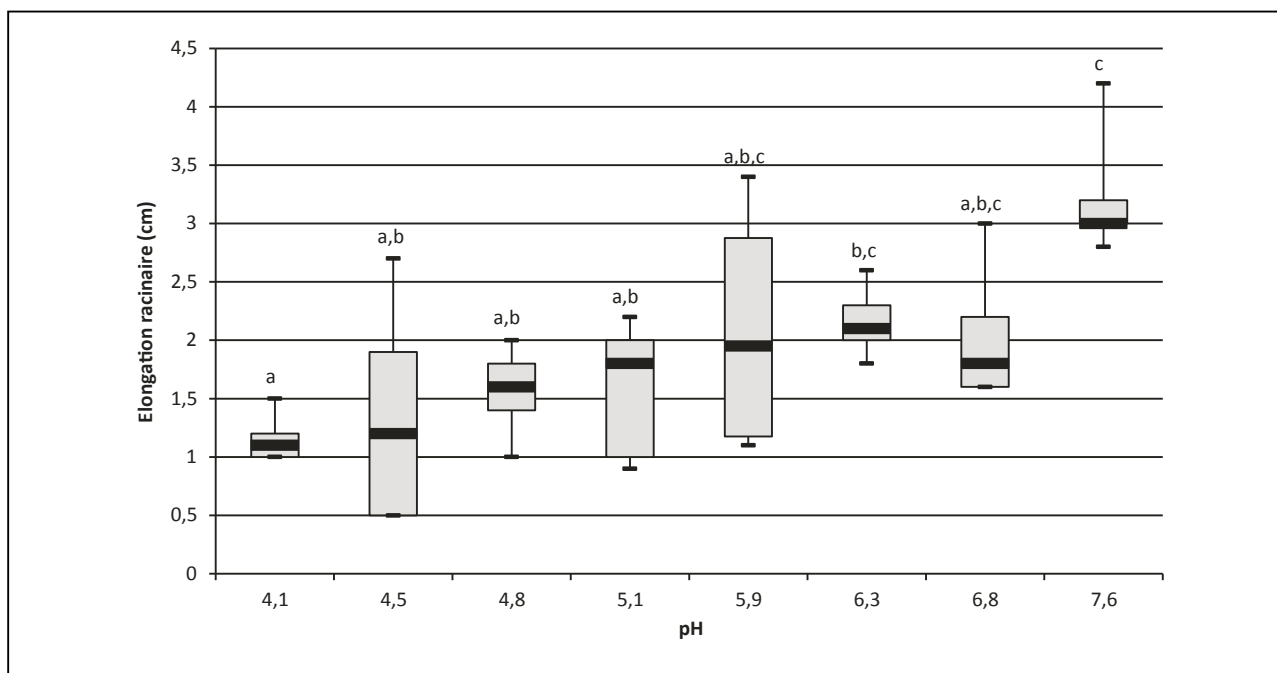
Les 8 sols prélevés couvrent une gamme de pH de 4,1 à 7,6 (tableau 3). Malgré une inhibition partielle de l'élongation racinaire lorsque le pH devient acide, l'ensemble des sols a permis une

**Tableau 3** - pH des différents sols.**Table 3** - pH of the different soils.

Nom du sol	pH
GF	4,1
PF2	4,5
B1	4,8
PF3	5,1
FR	5,9
M	6,3
LPL	6,8
LPE	7,6

croissance racinaire suffisante avec 1 cm de croissance pour le sol le plus acide et 3 cm pour le sol avec le pH le plus élevé (figure 5).

La diminution du pH entraîne une diminution de l'indice mitotique (figure 6), avec une différence significative entre un sol neutre et le sol le plus acide (pH = 4,1). Malgré tout, la division cellulaire est supérieure à 20 % dans tous les sols testés, le test peut donc être considéré comme valide. Une fois de plus, la variation de pH n'a pas induit la formation de micronoyaux,

**Figure 5** - Elongation des racines secondaires selon les différents sols (pH naturel).**Figure 5** - Secondary roots elongation for the different soils (natural pH).**Tableau 4** - Fréquence des micronoyaux ( $\mu N$ ) dans les racines secondaires de *Vicia faba* selon les différents sols (pH naturel).**Table 4** - Micronuclei frequency ( $\mu N$ ) in the secondary roots of *Vicia faba* exposed to the different soils (natural pH).

Sol	Fréquence $\mu N/1\ 000$ cellules	
GF	0,3	± 0,5
PF2	0,3	± 0,5
B1	0,7	± 0,5
PF3	0,8	± 1,0
FR	0,3	± 0,5
M	0,0	± 0,0
LPL	0,2	± 0,4
LPE	0,2	± 0,4

la médiane maximale, obtenue avec le sol de PF3, étant de 0,8 micronoyau/1 000 cellules (tableau 4).

Nos résultats corroborent ceux de De Marco *et al.*, (1995). Les auteurs avaient utilisé une approche avec des sols de différents pH dans une gamme allant de 5,1 à 8,5. Ils n'observent pas d'induction des micronoyaux avec la variation de pH, mais

ne fournissent aucun résultat sur l'indice mitotique, critère de validité fondamental ajouté *a posteriori* dans la norme ISO. De plus, notre gamme de sols est légèrement plus acide que celle utilisée par les auteurs et ne contient que des horizons de surfaces.

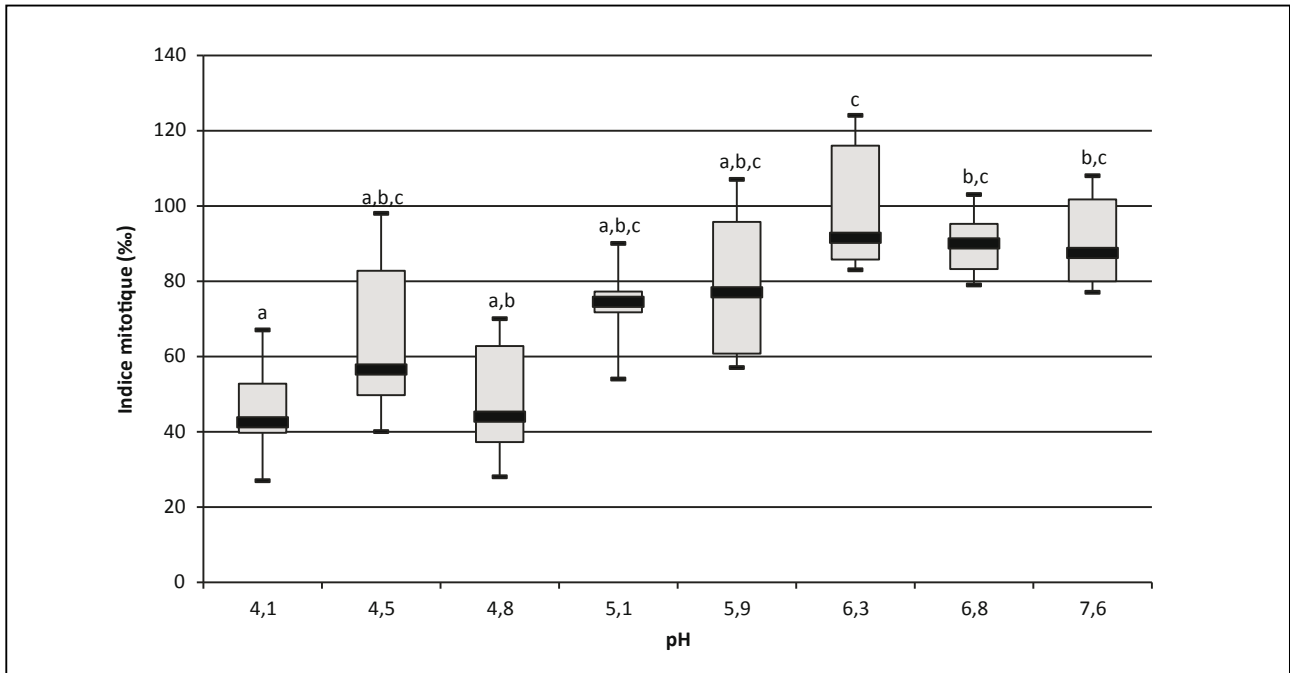
Une autre étude sur les effets du pH montre que ce dernier peut légèrement augmenter la fréquence des micronoyaux en conditions acides (Yi *et al.*, 2009). Cependant, cette étude a été réalisée en milieu liquide et les auteurs ne précisent pas la méthodologie d'ajustement du pH.

### Cas d'un sol artificiellement contaminé au cuivre

Lors d'une exposition à une concentration génotoxique de cuivre, nous observons une diminution significative de la fréquence des micronoyaux à partir d'un pH de 7,15 par rapport au pH le plus acide. L'indice mitotique est significativement supérieur à partir d'un pH de 6,15. D'une manière générale, l'augmentation du pH entraîne une diminution de la génotoxicité du cuivre visible par la diminution de la fréquence des micronoyaux. Cela peut s'expliquer par une modification de la biodisponibilité du cuivre : soit directement en modifiant la spéciation du métal, soit en modifiant les interactions de ce dernier avec le milieu (e.g. matière organique).

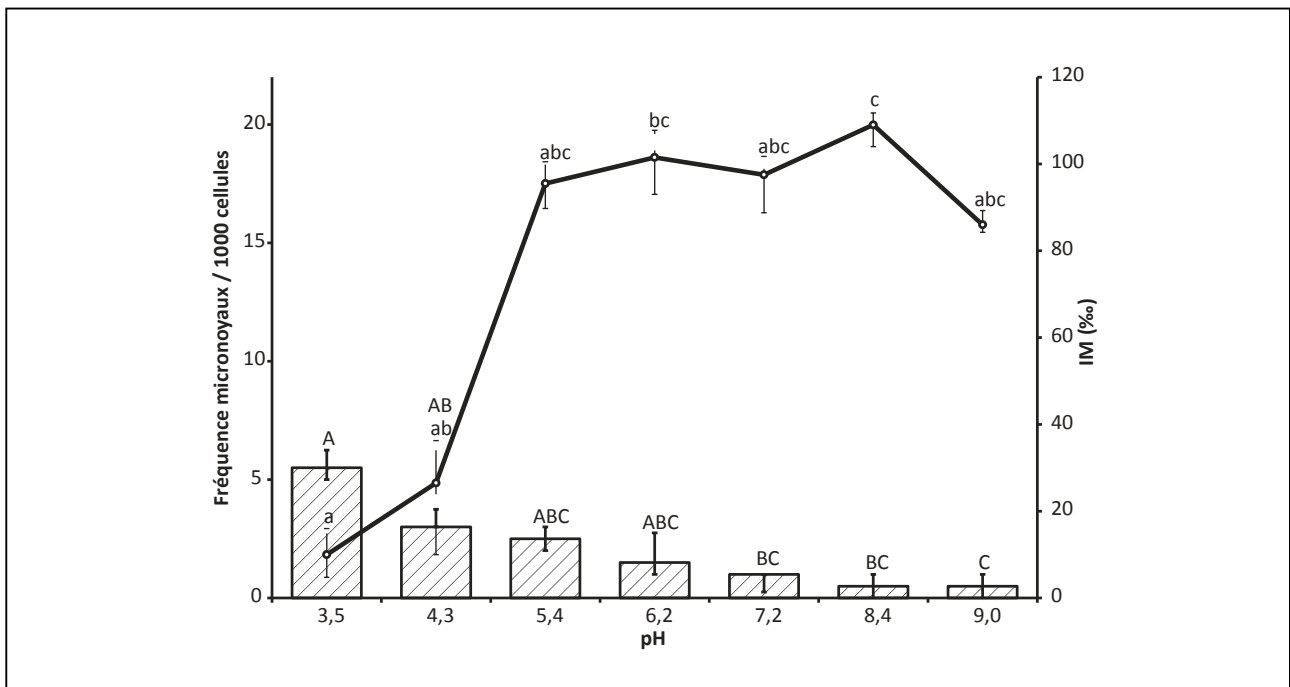
**Figure 6** - Indice mitotique dans les racines secondaires de *Vicia faba* selon les différents sols (pH naturel).

**Figure 6** - Mitotic index in the secondary roots of *Vicia faba* exposed to the different soils (natural pH).



**Figure 7** - Evolution de l'indice mitotique (courbe) et de la fréquence des micronoyaux (histogramme) en fonction du pH dans un sol artificiellement contaminé au cuivre (2 mmol.kg<sup>-1</sup> sol sec).

**Figure 7** - Evolution of mitotic index (curve) and micronucleus frequency (histogram) exposed to the different soils (natural pH) according to the pH in a copper spiked soil (2 mmol.kg<sup>-1</sup> dry soil).





## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'objectif de notre étude était de déterminer dans quelle gamme de pH le test *Vicia-micronoyaux* en phase solide était réalisable. Pour cela nous avons suivi deux approches : modifier le pH d'un sol de référence par l'ajout d'acide ou de base, et tester des sols de prairies non contaminés couvrant une large gamme de pH. Dans les deux approches, il est possible de réaliser le test dans une gamme de pH allant de 3,1 à 9,0. Dans cette plage, la croissance des racines secondaires est suffisante pour mener à bien la suite du test. De plus, les étalements cellulaires confirment un indice mitotique supérieur à 20 %, valeur limite en dessous de laquelle le test ne peut être considéré comme valide. Le pH ne semble pas avoir d'effet génotoxique au niveau chromosomique dans la gamme de pH testée.

Ces résultats permettent d'envisager l'étude de l'effet du pH sur différents polluants, notamment les éléments traces métalliques à la chimie pH-dépendante, en utilisant un sol de référence dont le pH sera modulé avec l'ajout d'acide ou de base comme nous l'avons fait avec le cuivre. Cela permet en outre de s'affranchir de l'effet possible des variations d'autres paramètres tels que la granulométrie ou la capacité de rétention en eau. Cependant, l'étude du comportement de la matière organique face aux modifications physico-chimiques induites par cette méthodologie doit être approfondie pour une meilleure interprétation des résultats futurs.

Le test *Vicia-micronoyaux*, en plus d'être le seul test de génotoxicité normalisé chez les végétaux supérieurs avec une exposition directe à une matrice solide, peut être effectué dans une large gamme de pH sans modification physico-chimique de l'échantillon, ce qui confirme sa pertinence. Ainsi une grande diversité de types de sols dans le Monde, mais aussi de nombreux anthroposols aux pH atypiques, peuvent être caractérisés au plus proche de la réalité.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement l'ADEME ainsi que la région Lorraine pour leur soutien financier.

## BIBLIOGRAPHIE

- Bierkens J., Klein G., Corbisier P., Van Den Heuvel R., Verschaeve L., Weltens R. and Schoeters G., 1998 - Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. *Chemosphere*, 37, 2935-2947.
- Cotelle S., 22/01/1999 - Etude de la génotoxicité de matrices complexes à l'aide de plantes supérieures, 201 p., Thèse de doctorat, Sciences de la vie, Toxicologie de l'environnement, Université Paul Verlaine-Metz (ED RP2E).
- De Marco A., De Simone C., Raglione M. & Lorenzoni P., 1995 - Influence of soil characteristics on the clastrogenic activity of maleic hydrazide in root tips of *Vicia faba*, *Mutation Research – Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 344 (1-2), 5-12.
- Duc G., 1997 - Faba bean (*Vicia faba* L.). *Field Crop. Res.*, 53, 99-109
- Foltête, A.-S., Dhyèvre, A., Féraud, J.-F., Cotelle, S., 2011 - Improvement of *Vicia-micronucleus* test for assessment of soil quality : A proposal for international standardization. *Chemosphere* (85), 1624-1629.
- Grant W.F., Zinov'eva-Stahevitch A.E., Zura K.D., 1981 - Plant genetic test systems for the detection of chemical mutagens, Short-term tests for chemical carcinogens, San RHC. Springer-Verlag, New York, 200-216
- Hock B., Elstner E.F., 2005 - Plant toxicology. New York : Marcel Dekker, 616 p.
- International Organization for Standardization (ISO 11465), 1993 - Détermination de la teneur pondérale en matière sèche et en eau – Méthode gravimétrique, 4 p.
- International Organization for Standardization (ISO 10390), 2005 - Détermination du pH, 7 p.
- International Organization for Standardization (ISO 11268-2), 2010 – Effets de polluants vis-à-vis des vers de terre – Partie 2 : détermination des effets sur la reproduction de *Eisenia fetida/Eisenia andrei*, 21 p.
- International Organization for Standardization (ISO/DIS 29200) – Qualité du sol – Evaluation des effets génotoxiques sur les végétaux supérieurs – Essai des micronoyaux sur *Vicia faba*, 22p.
- Kanaya N., Gill B.S., Murin A., Osiecka R., Sandhu S.S. & Anderson H.C., 1994 - *Vicia faba* chromosomal aberration assay. *Mut. Res. – Fund. Mol. M.*, 310 (2), 231-247.
- Ma T.H., 1999 - The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China. *Mut. Res.* (426), 103-106.
- Rieger R., Michaelis A. & Green M., 1968 - A glossary of genetics and cytogenetics, 3rd Eds. London : Allen and Unwin, 507p.
- Sang N. & Li G., 2004 - Genotoxicity of municipal landfill leachate on root tip of *Vicia faba*. *Muta. Res. – Gen. Tox.*, 560 (2), 257-263
- White PA, Claxton LD., 2004 - Mutagens in contaminated soil : a review. *Mutat. Res. – Rev. Mut. Res.* 567(2-3), 227-345.
- Yi M., Yi H., Li H., Wu L., 2010 – Aluminum induces chromosome aberrations, micronuclei, and cell cycle dysfunction in root cells of *Vicia faba*. *Environ. Toxicol.*, 25 (2), 124-129.

