

Université Lille I

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

THÈSE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE I

Formation Doctorale: Ecotoxicologie

Ecole Doctorale: Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'Environnement

Intérêts et validation de marqueurs précoces de génotoxicité environnementale

Présentée et soutenue publiquement par

Fabien BERNARD

Le 6 décembre 2013

Devant le jury composé de :

Pr. Alain LEPRETRE, Université de Lille 1	Président du jury
Dr. Carole COSSU-LEGUILLE, Université de Lorraine	Rapporteur
Dr. Séverine PARIS-PALACIOS, Université Reims Champagne-Ardennes	Rapporteur
Pr. François LEBOULENGER, Université du Havre	Examineur
Dr. Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI, Université du Littoral Côte d'Opale	Examinatrice
Dr. Franck MAROT, Ingénieur ADEME	Examineur
Dr. Annabelle DERAM, Université de Lille 2	Co-directrice de thèse
Pr. Franck VANDENBULCKE, Université de Lille 1	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Tout d'abord je tiens à remercier toutes les personnes qui ont pris part d'une manière ou d'une autre au bon déroulement de cette thèse.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux personnes qui m'ont permis de bénéficier d'un financement ADEME / Région Nord/Pas-de-Calais pour réaliser cette thèse et plus particulièrement M. Franck MAROT, ingénieur ADEME.

Je tiens à remercier en tout premier lieu le Pr. Franck VANDENBULCKE et la Dr. Annabelle DERAM, qui ont co-dirigé cette thèse dans la continuité de mon stage de Master 2. Je remercie ces deux personnes du fond du cœur pour m'avoir proposé ce projet de thèse. Vous avez cru en mes compétences et en mes qualités personnelles. Je vous remercie aussi pour votre soutien et votre disponibilité tout au long de ces trois années ainsi que pour votre grande aide pour la rédaction de ce mémoire. Ce fut un honneur et un très grand plaisir de partager ces trois années avec vous.

Je tiens à remercier le Pr. Isam SHAHROUR, directeur du Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement (Université de Lille 1), le Pr. Alain LEPRETRE, directeur de l'équipe Ecologie Numérique et Ecotoxicologie (Université de Lille 1) et le Pr. Régis COURTECUISSÉ, directeur du Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques (Université de Lille 2) qui m'ont accueilli dans leur laboratoire dans un cadre propice pour mener à bien ce travail.

Mes remerciements vont également vers le Dr Claude COCQUERELLE, grâce à qui j'ai beaucoup appris en biologie moléculaire, pour ses nombreux conseils, ses remarques toujours pertinentes, son soutien et sa bonne humeur au quotidien.

Mes remerciements s'adressent également au Dr. Carole COSSU-LEGUILLE et au Dr. Séverine PARIS-PALACIOS qui me font l'honneur de juger ce travail.

Je tiens également à remercier le Pr. François LÉBOULENGER (Université du Havre) et le Dr. Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI (Université du Littoral Côte d'Opale) qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je voudrais également remercier les membres du jury du comité de suivi de thèse le Dr. Anissa LOUNES-HADJ SAHRAOUI, de l'Unité de Chimie Environnementale et Interactions sur le Vivant (Université du Littoral Côte d'Opale) et le Dr. Marc BONNARD, du

Laboratoire d'Ecologie-Ecotoxicologie (Université de Reims Champagne-Ardennes) pour leurs discussions, leurs conseils et leur intérêt pour ce travail de thèse.

Mes remerciements vont également vers Mme Cécile GODE, assistante ingénieur au Laboratoire de Génétique et Evolution des Populations Végétales (Université de Lille 1) et Mme Valérie MONTEL, assistante ingénieur au Département de Neurosciences et de Physiologie/Endocrinologie (Université de Lille1), pour leur disponibilité et pour l'utilisation du LightCycler® 480.

Je tiens à remercier Christophe (Technicien) du Laboratoire de Toxicologie/Génopathies (Centre de Biologie et Pathologie du Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille) pour l'utilisation du NanoDrop.

Mes remerciements les plus sincères s'adressent également à l'équipe du Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques (Université de Lille 2) pour leur accueil durant mes séjours «test des comètes». Merci beaucoup à Damien CUNY pour son aide et ses conseils lors du test des comètes, à Inès DEVRED pour son aide précieuse pour le tamisage des sols et sa bonne humeur au quotidien et à Stéphanie QUARRE, Julie LECLERCQ et Florent OCCELI pour leur aide dans l'entretien et la collecte des échantillons.

Je tiens à remercier du fond du cœur le Dr. Sylvain DUMEZ (Ingénieur de Recherche) pour sa disponibilité, sa bonne humeur au quotidien et ses nombreux conseils en biologie moléculaire et lors de la rédaction des articles. Un grand merci à toi Sylvain, j'ai appris beaucoup de nouvelles méthodes grâce à toi.

Je tiens à remercier vivement le Dr. Franck BRULLE pour ses nombreux conseils en biologie moléculaire et pour la rédaction des articles ainsi que pour sa disponibilité et sa bonne humeur au quotidien. J'ai été très honoré de pouvoir travailler de nouveau avec toi et d'avoir acquis des compétences supplémentaires grâce à toi.

Mes remerciements les plus sincères et chaleureux aux membres de l'Equipe d'Ecologie Numérique et d'Ecotoxicologie (Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement, Université de Lille 1) pour leur soutien, le Dr. Sébastien LEMIERE, le Dr. Claude COCQUERELLE, la Dr. Céline PERNIN, le Dr. Sylvain DEMUYNCK, le Dr. Fabien GRUMIAUX, Régine LEROUX (adjointe technique) et Brigitte MACQUART (secrétaire et gestionnaire). Je tiens aussi à remercier Marion DELATTRE qui a grandement contribué aux expérimentations.

Je voudrais remercier plus particulièrement le Dr. Sébastien LEMIERE pour ses nombreux conseils lors de la rédaction des articles, pour son soutien lors des colloques et pour sa bonne humeur au quotidien.

Je voudrais également remercier les personnes qui ont été présentes au laboratoire lors de ma thèse: le Pr. Peter ENGELMANN (Université de Pecs, HONGRIE), Levente (Université de Pecs, HONGRIE) et Abby (Université de Lincoln, NOUVELLE-ZELANDE) grâce à qui j'ai pu perfectionner mon anglais; Coralie, Dima, Hanine, Lieselot, Léa (INRA de Versailles) et Agnieszka (Université de Czestochowa, POLOGNE) pour leur bonne humeur au quotidien et leur sympathie.

Enfin, c'est pour moi un grand honneur et un très grand plaisir de pouvoir dédier ce travail à mes proches, mes parents (Joël et Claudine), ma sœur (Muriel), Stéphanie (ma femme) et Gioia Noa (ma fille) pour leur énorme soutien. Je tiens à dire un grand merci à Stéphanie et à Gioia Noa pour m'avoir permis d'accomplir ce mémoire dans les meilleures conditions.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	1
SOMMAIRE	4
TABLEAUX	5
FIGURES	5
INTRODUCTION.....	6
PREMIERE PARTIE	15
I.1) Activités enzymatiques versus expressions géniques	16
I.2) Test des comètes	105
I.2.1) Le test des comètes.....	105
I.2.2) Test des comètes chez les Annélides.....	106
I.2.3) Test des comètes chez les végétaux supérieurs.....	111
I.3) Modèles d'étude.....	114
I.3.1) <i>Eisenia fetida</i>	114
I.3.2) <i>Trifolium repens</i>	116
SECONDE PARTIE	120
II.1) Identification de gènes de référence appropriés afin d'obtenir une quantification robuste des niveaux d'expression de gènes chez une espèce donnée.....	122
II.2) Etude au niveau transcriptionnel de protéines impliquées dans le stress oxydatif chez <i>Trifolium repens</i> et <i>Brassica oleracea</i> exposés à du Cd et du Pb	156
II.3) Utilisation du test des comètes afin d'évaluer les dommages à l'ADN chez <i>Trifolium repens</i> exposé à des éléments traces métalliques (Cd et Pb).....	209
II.4) Etude au niveau transcriptionnel de protéines impliquées dans le stress oxydatif et évaluation des dommages à l'ADN (test des comètes) chez <i>Eisenia fetida</i> exposé à du Cd et du Pb.....	234
DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS & PERSPECTIVES.....	291
LISTE DES PUBLICATIONS.....	311
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	316

TABLEAUX

Tableau 1: Etudes utilisant le test des Comètes pour l'évaluation des dommages à l'ADN chez les Annélides exposés à des xénobiotiques.....	108
Tableau 2: Etudes utilisant le test des Comètes pour l'évaluation des dommages à l'ADN chez les végétaux supérieurs exposés à des xénobiotiques.....	111
Tableau 3: Synthèse des résultats de l'étude de l'expression génique réalisée sur les coelomocytes d' <i>E. fetida</i> suite aux différentes expositions en conditions contrôlées (sols artificiellement contaminés).....	294
Tableau 4: Synthèse des résultats de l'étude de l'expression génique réalisée sur les feuilles de <i>T. repens</i> suite aux différentes expositions en conditions contrôlées (sols artificiellement contaminés)	297
Tableau 5: Synthèse des résultats du test des comètes réalisés chez <i>B. oleracea</i>	307
Tableau 6: Synthèse des résultats d'expression génique pour <i>B. oleracea</i>	308

FIGURES

Figure 1: Photographie de l'Annélide Oligochète <i>Eisenia fetida</i>	115
Figure 2: Morphologie de <i>Trifolium repens</i>	118

INTRODUCTION

La gestion des sites pollués dépend étroitement des études de diagnostic destinées à caractériser au mieux la source de contamination, le transfert des polluants dans l'environnement et les organismes cibles qu'elle peut atteindre (National Research Council, USA, 1983). Le 14 novembre 2007, le parlement européen a adopté en première lecture le projet de directive-cadre sur la protection des sols visant à lutter contre la régression et la dégradation de la qualité des sols (Directive cadre sol, 2006). En 2006, la commission estimait que 3,5 millions de sites étaient «potentiellement contaminés» dans l'Union Européenne. Au niveau national, 52% des sites ayant fait l'objet d'un diagnostic de pollution ont été placés sous surveillance et seuls 10% sont considérés comme banalisables. Ces quelques données montrent la persistance des contaminations pesant sur cette ressource non renouvelable. De plus, ce recensement des sites pollués fait apparaître qu'il existe des situations considérées comme potentiellement «à risque» pour l'environnement et la santé humaine (<http://basol.environnement.gouv.fr>).

Les polluants pris en considération dans ce travail de recherche sont le cadmium (Cd) et le plomb (Pb), seuls ou en mélange. Ces deux métaux font partie des polluants les plus toxiques pour les organismes vivants. Ces éléments ont un large éventail d'effets délétères sur les organismes avec par exemple des effets toxiques pour le système nerveux ou des effets génotoxiques (Palus *et al.*, 2003; Florea & Büsselberg, 2006). Ils sont rejetés dans l'environnement lors de la mise en œuvre de procédés industriels (fonderies, usines sidérurgiques et métallurgiques, etc.) mais aussi lors des combustions de pétrole et de charbon ou des déchets ménagers. Le trafic routier (rejets et usure des véhicules) contribue également aux émissions atmosphériques de ces éléments traces métalliques. Des particules atmosphériques retombent au niveau des sols et peuvent être accumulées au travers des réseaux trophiques, constituant ainsi un risque pour l'Homme et pour l'environnement. Le Cd possède des propriétés génotoxique et cancérigène reconnus. Par exemple, des cas de cancers

en rapport avec les fortes concentrations de Cd ont été rapportés chez l'Homme (Nawrot *et al.*, 2006). Chez les animaux et plus précisément chez les macroinvertébrés du sol, une exposition au Cd peut porter atteinte aux communautés (Pawert *et al.*, 1996), induire un ralentissement du développement larvaire et une surmortalité des larves (Mozdzer *et al.*, 2003), entraîner une fécondité moindre (Lagisz *et al.*, 2002), une sensibilité aux stress additionnels (Stone *et al.*, 2001) et une diminution de la densité de population (Pizl & Josen, 1995). Chez les plantes, le Cd peut entraîner divers symptômes de phytotoxicité tels que le brunissement des apex racinaires, l'inhibition de l'élongation racinaire, la réduction de la biomasse, la chlorose et parfois la mort de la plante (Sanita di Toppi & Gabbrielli, 1999; Wojcik & Tukiendorf, 2004; Mohanpuria *et al.*, 2007). La toxicité du Cd peut favoriser l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène telles que les radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), les radicaux hydroxyls (OH^{\bullet}) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Romero-Puertas *et al.*, 2004; Ranieri *et al.*, 2005; Iannone *et al.*, 2010). Contrairement au Cd, il n'a pas été montré de caractère génotoxique pour le Pb mais ce métal s'avère très toxique pour les organismes vivants (Sharma & Dubey, 2005; Schell *et al.*, 2010). Par exemple, des cas de saturnisme ont été observés chez certains enfants en relation avec de fortes concentrations en Pb (Declercq & Beaubois, 2000). Le Pb peut altérer le système nerveux des animaux (Palus *et al.*, 2003) ainsi que la croissance et le développement végétatif des plantes (Sharma & Dubey, 2005; Lamb *et al.*, 2010). Plusieurs études ont montré que des plantes exposées aux Pb présentaient des perturbations au niveau des systèmes antioxydants (Kastori *et al.*, 1992; Kratovalieva & Cvetanowska, 2001; Verma & Dubey, 2003; Malecka *et al.*, 2009).

Les études diagnostiques ont notamment pour but d'apporter des éléments concernant la dangerosité à long terme des milieux contaminés. Pour cela, des approches combinant évaluations physico-chimiques et biologiques apportent une information robuste concernant la disponibilité des polluants vis-à-vis d'organismes vivants. En effet, il est maintenant acquis

qu'une approche physico-chimique seule ne renseigne pas sur la biodisponibilité des polluants, ni sur leurs interactions éventuelles ou encore sur leur métabolisation. De plus, une approche uniquement analytique suppose que l'ensemble des polluants présents ait été identifié, ce qui est rarement le cas, notamment pour les contaminations multiples. En d'autres termes, elle ne suffit pas pour évaluer la toxicité d'un sol sur les organismes vivants (Vasseur & Féraud, 1991; Bispo *et al.*, 1997).

Afin de pouvoir surveiller la qualité des sols, le développement d'outils biologiques de diagnostic est proposé. Pour cela, deux organismes modèles appartenant à des niveaux trophiques différents sont étudiés: un producteur primaire, *Trifolium repens* (Trèfle blanc) et un décomposeur, *Eisenia fetida* (Ver du fumier). *T. repens* est l'une des Légumineuses du genre *Trifolium* les plus importantes sur le plan agronomique. Il existe un très grand nombre de cultivars ayant chacun ses propres traits d'adaptation (Voisey *et al.* 1994). Sur le plan génétique, *T. repens* est une espèce qui possède une forte hétérogénéité génétique (Williams, 1987; Ansari *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2003) qui permet à *T. repens* de s'adapter facilement à des micro-environnements compétitifs. De fait, il s'agit d'une espèce sauvage commune et ubiquiste, capable de se développer sur une multitude de matrices environnementales (y compris polluées), ce qui permet l'étude de matrices réelles et offre la possibilité de réaliser par la suite des études *in situ*. *T. repens* possède également la spécificité de former des nodules (association symbiotique au niveau des racines avec la bactérie *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*). Cette association symbiotique permet au végétal de fixer l'azote atmosphérique sous forme N₂ et contribue fortement à la fertilisation des sols et peut apporter de 100 à 200 kg d'azote par hectare (Ledgard *et al.* 2001). Cette particularité confère à cette espèce une grande importance écologique de par sa contribution à la fertilisation des sols. *T. repens* est de plus en plus utilisée dans les études portant sur les sols contaminés par les métaux. Cette espèce est également tolérante à la présence de métaux (Bidar *et al.*, 2007;

2009). Récemment, Manier *et al.* (2009a) ont adapté le test du micronoyaux chez *T. repens* et des mesures d'activités enzymatiques ont également été réalisées (Manier *et al.*, 2012).

E. fetida appartient à un des groupes faunistiques les plus étudiés en écotoxicologie du sol, les Annélides Oligochètes. Depuis les premiers travaux de Darwin (1883), les vers de terre (Embranchement des Annélides, sous-classe des Oligochètes) sont considérés comme des ingénieurs de l'écosystème sol du fait de leurs effets directs et indirects sur l'eau, les nutriments et le cycle du carbone dans les sols sous les climats tempérés et tropicaux. Ces animaux, qui représentent une part importante de la macrofaune du sol, jouent un rôle clé dans la plupart des écosystèmes continentaux et sont impliqués dans l'entretien de la structure et de la fertilité des sols. Les vers ont ainsi été adoptés par la communauté internationale pour le diagnostic des écosystèmes et pour l'étude de l'impact potentiel de contaminants, tels que les pesticides, les hydrocarbures et les métaux provenant de sources anthropiques (Spurgeon *et al.*, 2003a). La quantification de la toxicité des éléments chimiques pour les Annélides est couramment réalisée via la mesure des principaux traits de vie (survie, croissance et reproduction) dans les conditions contrôlées au laboratoire avec des organismes tests (*Eisenia fetida*, *Eisenia andrei* et *Lumbricus rubellus*). Ces organismes considérés comme prioritaires en écotoxicologie (Spurgeon *et al.*, 2003a) sont affectés par la pollution métallique. Par conséquent, l'exposition métallique de certains Annélides Oligochètes pourrait engendrer des modifications exploitables permettant de dresser un état des lieux et de mesurer les risques provoqués par la présence de métaux polluants dans le sol.

Cette thèse a été réalisée dans le cadre du projet MarGeEn («Marqueurs de Génotoxicité Environnementale»). Ce projet, qui vient de s'achever, a été co-financé par l'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) et l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses), et vise à mettre en place des marqueurs de génotoxicité environnementale pour l'évaluation de sols présentant des

contaminations complexes. Ce projet prend en considération une exposition environnementale globale des organismes étudiés en considérant concomitamment les matrices complexes auxquelles ils sont exposés: l'eau, l'air et le sol. Pour cela, plusieurs espèces «test» ont été utilisées dont un animal, *Eisenia fetida* (Ver du fumier, espèce recommandée par l'OCDE dans les études en écotoxicologie) et deux végétaux, *Trifolium repens* (Trèfle blanc, espèce d'intérêt agronomique de plus en plus utilisée dans les études en écotoxicologie) et *Brassica oleracea* var. *viridis* (Chou fourrager, espèce d'intérêt agronomique et modèle en surveillance de la qualité de l'air (VDI, 2000)). Les trois espèces ont été exposées pendant 3, 10 et 56 jours à un sol naturel urbain qui a été artificiellement contaminé à des doses réalistes par des gammes de Cd et de Pb, seuls ou en mélanges. Le dispositif expérimental est le même pour les trois espèces. Il est composé de microcosmes dans lesquels sont co-exposés animaux et végétaux (microcosmes *E. fetida* et *T. repens* et microcosmes *E. fetida* et *B. oleracea*). *E. fetida* et *T. repens*, espèces plus particulièrement travaillées dans le cadre de la thèse, sont présentés plus en détail. Cependant, certains travaux également réalisés chez *B. oleracea* et dont les méthodes sont identiques à celles utilisées chez *E. fetida* et *T. repens* seront également présentés.

L'objectif principal est de pouvoir évaluer le potentiel génotoxique des sites contaminés, y compris pour des contaminations induisant une exposition à des faibles doses. En effet, de nombreux polluants environnementaux ont un pouvoir génotoxique important pouvant induire chez des organismes vivants une mutagénicité. Cette mutagénicité va se traduire par des cassures de l'ADN (effet clastogène) ou des malségrégations chromosomiques (effet aneugène) non négligeables (Gischner, 2006; 2007). L'implication de la mutagénicité dans la cancérogenèse et dans la genèse de maladies héréditaires chez les Mammifères est largement reconnue (Zakrzewski, 2002; Lu, 1991).

L'intérêt de ce projet sera d'apporter des éléments concernant la dangerosité à long terme de ces milieux. Notre objectif vise à mettre en place des biomarqueurs d'exposition c'est-à-dire apprécier au niveau individuel les effets des contaminants sur les mécanismes de détoxification des xénobiotiques et/ou de défenses cellulaires chez les organismes exposés aux métaux. Dans la plupart des cas, le premier niveau d'organisation affecté par un changement environnemental (ex: contamination) est le niveau moléculaire, entraînant ainsi des changements de niveaux d'expression de gènes. Des variations d'expressions géniques bien identifiées peuvent être utilisées comme «biomarqueurs d'exposition» (Brulle *et al.*, 2006; 2007; 2008a,b; Vanhoudt *et al.*, 2011a,b; Puckett *et al.*, 2012).

Ainsi, la première étape vise à générer des connaissances sur les mécanismes de fragmentation de l'ADN (lien potentiel avec le stress oxydatif, effet synergique ou non entre les polluants génotoxiques et non génotoxiques pouvant conduire à une augmentation du risque par des mécanismes indirects). La génotoxicité environnementale est évaluée sur la base du test des comètes (Comet assay) qui permet la quantification des cassures de l'ADN dans des populations cellulaires. C'est une technique de détection rapide et visuelle des lésions de l'ADN dans des noyaux de cellules isolées (Östling & Johanson, 1984; Singh *et al.*, 1988; Olive *et al.*, 1990). Ce test sera réalisé après exposition aux mêmes matrices environnementales chez nos 2 espèces modèles. L'étude concomitante de ces organismes est d'intérêt pour l'appréhension de la sensibilité des réponses obtenues par les espèces test en termes de détection du caractère génotoxique d'un site. Les résultats obtenus nous autoriseront à formuler des hypothèses sur l'expression d'une réponse de même nature par des organismes très différents et sur l'entrée en jeu des mécanismes de détoxification et/ou de réparation qui pourraient induire une réponse différentielle vis-à-vis de la génotoxicité suite à l'exposition contrôlée.

Une atteinte à l'ADN peut être une conséquence d'une exposition à un stress oxydatif. En effet, c'est un état physiologique dans lequel des espèces réactives de l'oxygène (EROs) ou des radicaux libres, générés par des processus physiologiques vitaux, peuvent avoir des effets toxiques sur les différents constituants des cellules. La deuxième étape qui consiste à observer au niveau moléculaire les effets des expositions à des métaux chez nos 2 espèces notamment à travers l'étude des variations des niveaux d'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif. L'émergence des techniques de biologie moléculaire appliquées à l'écotoxicologie a permis de mieux appréhender les mécanismes d'action des contaminants sur les organismes vivants. En effet, les profils d'expression génique représentent le premier niveau d'intégration entre les « stress » environnementaux et le génome qui, à travers la synthèse de protéines, conduit la réponse des organismes aux changements externes. L'analyse des changements dans l'expression génique est donc un outil puissant, 1- pour diagnostiquer l'existence d'un stress dans une population et 2- pour analyser les mécanismes de réponse à un stress.

La **première partie** de ce manuscrit est consacrée à des bilans bibliographiques. Un premier bilan bibliographique analyse les travaux portant sur les mesures d'activités enzymatiques et/ou les mesures des niveaux d'expressions de gènes codant des protéines impliquées dans le mécanisme de stress oxydatif chez des espèces apparentées aux deux espèces étudiées (*T. repens* et *E. fetida*) exposées à des xénobiotiques. Cet important travail bibliographique fait l'objet d'une Revue actuellement soumise (**Publication 1**). Une seconde synthèse bibliographique fait un bilan des travaux utilisant le test des comètes comme outils de surveillance chez des espèces proches de *T. repens* et *E. fetida* exposées à des contaminants. Ce travail ne fait pas l'objet d'une publication car des revues récentes sont d'ores et déjà disponibles (Dhawan *et al.*, 2009; Ventura *et al.*, 2013). Cependant, cela a

permis de faire un état de l'art et d'orienter nos travaux afin d'apporter des informations supplémentaires et/ou complémentaires.

La **seconde partie** concerne la présentation des résultats obtenus (organisés en 4 publications). Une bonne part de nos résultats est basée sur la quantification grâce à la PCR en temps réel des niveaux d'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif. Notons qu'afin d'obtenir des résultats robustes, une mise au point des gènes de référence pour la quantification des niveaux d'expression génique a été réalisée chez *B. oleracea*, une espèce étudiée dans le cadre du projet «MarGeEn» et pour laquelle il existait de la donnée de séquençage (**Publication 2**). La même stratégie d'identification des meilleurs gènes de référence a ensuite été menée chez *T. repens* et *E. fetida*. Cette étape d'identification de gènes de référence nous a ensuite permis d'étudier le niveau d'expression des principaux candidats impliqués dans le stress oxydatif. En effet, une exposition à des métaux tels que le Cd et le Pb peut entraîner l'apparition d'un stress oxydatif ainsi que des dommages à l'ADN. L'évaluation des dommages à l'ADN à l'aide du test des comètes a aussi été réalisée chez *T. repens* et *E. fetida*.

L'ensemble des résultats, comprenant mesures d'expression géniques et évaluation des dommages à l'ADN, permettra de mieux comprendre l'éventuel lien entre stress oxydatif et dommages à l'ADN pour chacune des espèces étudiées mais aussi de voir si l'utilisation d'espèces différentes appartenant à des niveaux trophiques différents présente un intérêt d'un point de vue diagnostic.

Enfin, ce mémoire se terminera par une discussion plus globale basée sur les résultats obtenus suivie des conclusions et des perspectives.

PREMIERE PARTIE
ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

La synthèse bibliographique est composée de deux parties. La première concerne des études portant sur les mesures d'activités enzymatiques et/ou le niveau d'expression génique de candidats impliqués dans le stress oxydatif chez les Annélides Oligochètes (famille d'*E. fetida*) et chez les Fabaceae (famille de *T. repens*) lors d'expositions à des xénobiotiques (métaux, composés aromatiques, pesticides, mélanges de polluants). Cette partie se présente sous la forme d'une revue. La seconde partie est un état de l'art des principaux travaux portant sur l'utilisation du test des comètes mis en œuvre pour évaluer les dommages à l'ADN lors d'exposition à des contaminants chez les Annélides Oligochètes et chez les espèces végétales les plus utilisées pour ce test de génotoxicité.

I.1) Activités enzymatiques versus expressions géniques

Les espèces réactives de l'oxygène (EROs) sont des molécules réactives produites dans les cellules lors de processus vitaux de base (transport des électrons lors de la photosynthèse, la respiration, les réactions catalysées par les enzymes, etc.) et sont générées dans la plupart des compartiments cellulaires (Mittler *et al.*, 2004; del Rio *et al.*, 2006; Navrot *et al.*, 2007). En conditions normales, il y a un équilibre entre la production de molécules pro-oxydantes et anti-oxydantes où ces dernières assurent une bonne protection de la cellule contre les EROs. En conditions de stress (stress hydrique (Pan *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2008), stress thermique (Suzuki & Mittler, 2006, Lushchak, 2011), exposition aux radiations UV (Agarwal, 2007; Yang *et al.*, 2008), expositions aux xénobiotiques (Skorzynska-Polit *et al.*, 2003/04; Mobin *et al.*, 2007, Dixon *et al.*, 2010), attaques de pathogènes (Bolwell & Woftastek, 1997, Dixon *et al.*, 2010)), la balance entre molécules pro-oxydantes et anti-oxydantes peut être déséquilibrée. Ainsi, les EROs peuvent affecter les propriétés des membranes intracellulaires, causer des dommages oxydatifs aux acides nucléiques, aux lipides et aux protéines rendant ainsi ces molécules non fonctionnelles (Foyer *et al.*, 2005). Un état physiologique dans lequel

les EROs ou les radicaux libres peuvent avoir des effets néfastes pour les composants d'une cellule est appelé «stress oxydatif» (Gill & Tuteja, 2010).

Les animaux et les plantes possèdent des systèmes de défenses enzymatiques (superoxydes dismutases, catalases, glutathion peroxydases, glutathion réductases, ...) et non-enzymatiques (glutathion, proline, α -tocophérol, caroténoïdes, flavonoïdes) pour se protéger du stress oxydatif (Mittler *et al.*, 2004, Gill *et al.*, 2011). Dans le domaine de la toxicologie environnementale et de l'écotoxicologie, les niveaux d'activités des enzymes de défense sont largement utilisés comme «biomarqueurs/indicateurs» pour étudier les effets du stress causé lors d'expositions à des xénobiotiques. Dans la littérature, les activités de certaines enzymes impliquées dans le stress oxydatif ont été mesurées. Cependant, la réponse anti-oxydative des organismes aux xénobiotiques n'a pas seulement été étudiée au niveau biochimique au travers la mesure des activités enzymatiques. Dans la plupart des cas, le premier niveau d'organisation affecté par un changement environnemental (ex: contamination) est le niveau moléculaire, entraînant ainsi des changements dans des expressions de gènes. Des variations d'expressions géniques bien identifiées peuvent être utilisées comme «biomarqueurs d'exposition» (Brulle *et al.*, 2006; 2007; 2008a,b; Vanhoudt *et al.*, 2011a,b; Puckett *et al.*, 2012). Depuis plus de 10 ans, les outils de biologie moléculaire ont permis de mieux comprendre les changements qui ont lieu au niveau transcriptionnel et donc d'acquérir un grand nombre de données génomiques et transcriptomiques très utiles. Comparée à l'approche enzymatique, l'étude des variations des niveaux d'expression génique permet de distinguer l'implication de chaque enzyme lors du stress oxydatif.

Une synthèse bibliographique des réponses biochimiques (activités enzymatiques) et des variations des expressions de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif chez 3 espèces importantes dans les études en écotoxicologie du sol (*E. fetida*, *T. repens* et *B. oleracea*) ainsi que chez les espèces voisines de ces 3 espèces a été réalisée. Cette synthèse est

présentée sous la forme d'une Revue actuellement soumise. Elle intègre des résultats originaux en termes d'analyse des niveaux d'expression de la plupart des familles de candidats impliqués dans le stress oxydatif chez les 3 espèces. En effet, en exploitant la conservation des molécules observée entre les espèces et en utilisant les techniques de biologie moléculaire, nous avons partiellement cloné et mesuré les niveaux d'expression génique de candidats impliqués dans le stress oxydatif et la détoxification des métaux chez les 3 espèces sélectionnées. Les données moléculaires concernant *E. fetida* étaient déjà disponibles dans les banques de données. En revanche, un manque important de données concernant les effecteurs impliqués dans le stress oxydatif chez *T. repens* et *B. oleracea* nous a obligé à cloner les candidats manquants. Les niveaux d'expressions géniques ont été mesurés au moyen de la PCR en temps réel dans les cœlomocytes chez *E. fetida* et dans les feuilles chez les végétaux exposés *in vivo* pendant 10 jours à un sol de référence artificiellement contaminé par du Cd à des concentrations réalistes (0 à 20 mg.kg⁻¹ Cd) afin de valider notre approche.

Publication 1 (Ecotoxicology and Environmental Safety, soumis)

Identification, cloning and gene expression study of the genes involved in oxidative stress in three soil ecotoxicology important test species.

Bernard F.^{1,2,3}, Brulle F.^{1,3}, Dumez S.^{1,3}, Lemiere S.^{1,2}, Platel A.^{1,4}, Nesslany F.^{1,4}, Cuny D.^{1,3}, Deram A.^{1,3,5} and Vandebulcke F.^{1,2*}

¹ Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

² Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement EA4515 – Université Lille Nord de France - Lille 1, Ecologie Numérique et Ecotoxicologie, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

³ Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques – Université de Lille 2, EA4483, F-59006 Lille Cedex, France

⁴ Laboratoire de Toxicologie – Institut Pasteur de Lille, EA 4483, F-59800 Lille, France

⁵ Faculté de Management de la Santé (ILIS) - Université de Lille 2, EA4483, F-59120 Loos, France

* Corresponding author : Franck Vandebulcke
Université Lille Nord de France-Lille 1
Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement EA4515
F-59655 Villeneuve d'Ascq, France
tel : + 33 3 20 33 59 99
franck.vandebulcke@univ-lille1.fr

Abstract

Pollutants can impact DNA structure of living organisms and thus generate damage. For instance, cadmium is a well-known genotoxic and mechanisms explaining its clastogenicity are mainly indirect: inhibition of DNA repair mechanisms and/or induction of Reactive Oxygen Species (ROS). In order to better understand potential ROS effects *in vivo*, we analysed the gene expression level of most genes involved in oxidative stress in 3 test species

living in close contact with soil that are often used in ecotoxicology: the worm *Eisenia fetida*, *Trifolium repens* (white clover) and *Brassica oleracea* (cabbage). *Eisenia fetida* is a soil-dwelling organism often used for biomonitoring. *Trifolium repens* is a symbiotic plant species which forms root nodule with soil bacteria while *Brassica oleracea* is a non-symbiotic plant. In literature, some oxidative stress enzyme activities have already been measured but such analyses do not allow distinction between individual enzyme involvements in oxidative stress. Gene expression studies do allow this distinction at the transcriptomic level. Molecular data regarding *E. fetida* were already available in databases, but a lack of data regarding oxidative stress related genes was observed for *T. repens* and *B. oleracea*. By exploiting the conservation observed between species and using molecular biology techniques, we partially cloned and measured the gene expression of missing candidates involved in oxidative stress and in metal detoxification in *E. fetida*, *T. repens* and *B. oleracea*. Then, expression levels of each gene were measured by real-time PCR in *E. fetida* coelomocytes and in leave cells of *T. repens* and *B. oleracea*, each exposed 10 days *in vivo* to a well-characterised reference soil spiked with cadmium at environmentally relevant concentrations.

Keywords: oxidative stress, gene expression, cadmium, soil ecotoxicology, *Eisenia fetida*, *Brassica oleracea*, *Trifolium repens*.

1) Introduction

“Reactive Oxygen Species” (ROS) are reactive molecules produced in living cells during normal vital processes (e.g. electron transport processes in photosynthesis and aerobic respiration, enzyme-catalyzed reactions, ...) and are generated in most cell compartments (Mittler *et al.*, 2004; Del Río *et al.*, 2006; Navrot *et al.*, 2007). Under normal conditions, there is a balance between "pro-oxidant" and "antioxidant" molecules where the latter provide a

good protection against ROS. Interactions between free radicals and between free radicals and antioxidant molecules may occur. In stress conditions e.g. - water stress (Pan *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2008), - temperature stress (Suzuki and Mittler, 2006; Lushchak, 2011), - exposure to UV radiation (Agarwal, 2007; Yang *et al.*, 2008), - exposure to inorganic or organic contaminants (Skórzyńska-Polit *et al.*, 2004; Mobin *et al.*, 2007, Dixon *et al.*, 2010) and - challenge by pathogens (Bolwell and Woftastek, 1997, Dixon *et al.*, 2010), the balance between “pro-oxidant” and “antioxidant” molecules may change. In these stressful conditions, ROS or free radicals can have toxic effects on various components in cells. For instance, it has been observed that ROS affect membrane properties, cause oxidative damage to nucleic acids, lipids and proteins making these molecules non-functional (Foyer *et al.*, 2005; Gill and Tuteja, 2010).

Animal or vegetal cells use antioxidant defense systems to get protection against ROS produced during oxidative stress. These defense systems which are distributed in all cell compartments (cytoplasm and organelles) are both non-enzymatic (e.g. glutathione, proline, α -tocopherol, carotenoids and flavonoids) or enzymatic (e.g. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), glutathione reductase (GR), etc...) (Mittler *et al.*, 2004, Gill and Tuteja, 2010). ROS were first observed during exposure to pathogens (biotic stress) (Doke, 1983; Doke and Ohashi, 1988; Montalbini, 1992) then during exposure to abiotic stress (Corpas *et al.*, 1993; Hernández *et al.*, 1993). The mechanisms of production and management of ROS were studied as markers of biotic and abiotic stress. This was mainly done through the measurement of enzyme activities.

The enzyme activities and proteins such as superoxide dismutases (Cu / Zn SOD, Mn SOD, Fe SOD) (Skórzyńska-Polit *et al.*, 2004; Eyidogan and Oz, 2007; Mobin *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008), catalases (CAT) (Balestrasse *et al.*, 2001; Hsu and Kao, 2004; Cho and Seo, 2005; Mobin *et al.*, 2007), ascorbate peroxidases (APX) (Aravind and Prasad, 2003;

Mobin *et al.*, 2007, Khan *et al.*, 2007, Singh *et al.*, 2008), glutathione reductases (GR) (Skórzyńska-Polit *et al.*, 2004, Khan *et al.*, 2007; Mobin *et al.*, 2007, Singh *et al.*, 2008), glutathione transferases (GST) (Dixit *et al.*, 2001; Iannelli *et al.*, 2002; Moons, 2003), glutathione peroxidases (GPX) (Li *et al.*, 2000; Dixit *et al.*, 2001; Leisinger *et al.*, 2001; Avsian-Kretchmer *et al.*, 2004) and metallothioneins (MT) (Anderson *et al.*, 1999; Chiang *et al.*, 2006; Goupil *et al.*, 2009) influence the tolerance of organisms exposed to abiotic stress. Tolerance of organisms depends, at least partially, of their ability to cope with ROS.

In ecotoxicology, activities of defense enzymes have been widely used as "biomarkers / indicators" to assess effects of stress induced by xenobiotics. Indeed, many studies have been conducted in both aquatic and soil ecotoxicology. For example, activity measures of CAT (Teisseire *et al.*, 1998), SOD (Gomes *et al.*, 2012), POX (Mohan and Hosetti, 1997) and GR (Azarte-Cardenas and Martínez-Jerónimo, 2012) were performed in aquatic organisms exposed to xenobiotics. In soil organisms, measures of defense enzyme activities have been conducted in many plant and animal species exposed to a large panel of contaminants.

Antioxidant response of organisms has not only been studied at the biochemical level. In most cases, the first level of organization affected by an environmental change (e.g. pollution) is the molecular level, which may lead to changes in gene expression. Well characterized gene expression variations can be used as "biomarkers of exposure" (Brulle *et al.*, 2006; 2007; 2008a,b; Vanhoudt *et al.*, 2011a,b; Puckett *et al.*, 2012). For more than a decade, molecular biology has led to a better understanding of changes occurring at transcriptional level and allowed acquisition of a large number of very useful genomic and transcriptomic data. Therefore, it is now possible to analyze in detail expression levels of genes belonging to the same physiological function under stress conditions induced by contaminants (Spurgeon *et al.*, 2004; Brulle *et al.*, 2006; Höckner *et al.*, 2009; Bernard *et al.*, 2010; Nakamori *et al.*, 2010; Moudouma *et al.*, 2011). However, many organisms are characterized by a lack of

molecular data available in databases such as Genbank™. Access to sequence data is crucial for species that are non-model species but are widely used in specific research fields, such as in ecotoxicology (e.g. *Eisenia fetida*; *Helix aspersa*, *Trifolium repens*).

Despite the numerous studies, it is very difficult to assess the role of antioxidant system in key species that can be considered as model species in soil ecotoxicology. However, some species are more favorable because of their biology and eventually the data already available: the oligochaeta annelid *Eisenia fetida* (manure worm) (Łaszczyca *et al.*, 2004; Brulle *et al.*, 2006), the Brassicaceae *Brassica oleracea* (cabbage) (Posmyk *et al.*, 2009; Kusznerewicz *et al.*, 2012) and the Fabaceae *Trifolium repens* (white clover) (Bidar *et al.*, 2009; Manier *et al.*, 2012).

Eisenia fetida is a soil-dwelling organism belonging to the Lumbricidae family. They are considered as soil ecosystem engineers (Lavelle and Spain, 2001) and are good candidate for biomonitoring (Römbke *et al.*, 2005; Sanchez-Hernández, 2006). Indeed, they play an important role in water, nutrients and carbon cycles in terrestrial ecosystems and increase soil fertility (Singh and Pillai, 1973; Edwards and Lofty, 1977; Edwards, 1988). They also provide information on soil structure, microclimatic conditions, nutritional status and presence of toxic elements in soils (Christensen, 1988; Edwards and Bohlen, 1996; Edwards, 1998; Kautenburger, 2006). Annelids live in close contact with the soil through cuticle and gut (Spurgeon *et al.*, 2004; Brulle *et al.*, 2006, Bernard *et al.*, 2010). Therefore, they have been adopted by the international community as sentinel species for the study of the potential environmental impact of anthropogenic contaminants such as pesticides, hydrocarbons and metallic trace elements (MTEs) (Edwards and Bohlen, 1996; Edwards, 1998; Spurgeon *et al.*, 2003; Seeber *et al.*, 2005; Kautenburger, 2006). *E. fetida* is commonly used in soil ecotoxicology and is recommended by OECD for soil contaminants testing since 1984 (OECD, 1984a, 2007). Recently, most of the genes encoding oxidative stress protein have

been cloned and sequenced (Brulle *et al.*, 2006, 2007, 2008a).

B. oleracea is commonly used in biomonitoring for the accumulation of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) (German standard VDI 3957, 2000). Mechanisms of accumulation of light organic compounds and their mechanisms of action at the cellular and tissue levels (generation of oxidative stress [MDA contents, APX and GPOX activities], genotoxicity [comet assay]) have been studied (Rzepka, 2007). This species is also used in phytoremediation of metal-contaminated soils (Shahandeh and Hossner, 2002b; Kusznierewicz *et al.*, 2012). This plant, which is in close contact with the soil by its roots, is also able to accumulate Zn and Cd in the shoots which have a large leaf area (Kusznierewicz *et al.*, 2012). Measurements of enzyme activities were also conducted in individuals exposed to soil contaminated by metals (Hajiboland and Hamjad, 2007; Posmyk *et al.*, 2009; Zaimoglu *et al.*, 2011). A partial sequencing of the genome has been performed by Ayele *et al.* (2005). Thus, a large number of molecular data is now available for this species in different databases. For example, more than 180000 expressed sequence tags (ESTs) can be found in Genbank™. Nevertheless, it is necessary to be careful with this important amount of data because it comes from different *B. oleracea* varieties. Furthermore, after screening of the entire dataset, few sequences were identified as oxidative stress enzymes and some other were still missing (<http://www.ocri-genomics.org/bolbase/>;<http://brassica.icvi.org/cgi-bin/brassica/gbrowse.cgi>).

T. repens is a wild, common and ubiquitous species of agronomic interest. Indeed, it is spread over a wide geographical area (sub-arctic zone to sub-tropical regions) and is able to establish a root symbiosis (nodules) with atmospheric nitrogen-fixing bacteria and thus contribute to soil fertilization with nitrogen. As a consequence, *T. repens* is increasingly used in studies focusing on metal-contaminated soils (Bidar *et al.*, 2007; 2009; Manier *et al.*, 2009a; 2012). At the beginning of our study, there were no sequences encoding oxidative

stress proteins in databases for *T. repens* although 40000 ESTs were produced by Sawbridge *et al.* (2003) by means of high throughput sequencing.

In this review, we propose 1 – a detailed literature survey of the biochemical responses (enzyme activities) and expression variations of genes encoding proteins involved in antioxidant response in three species that are important in soil ecotoxicology (and in related species), 2 –the cloning of the genes encoding major effectors of the oxidative system in all three species and 3 – a quantification in the 3 species of the level of expression of most studied genes encoding oxidative system effectors during an *in vivo* experiment in order to validate the approach.

2) Oxidative stress

Organisms exposed to pollution can be more or less damaged depending on type and dose of pollutants in environment. Presence of contaminants may disturb major physiological functions such as survival, nutrition, immunity, growth and reproduction. Disturbance may also be manifested at biochemical level by an imbalance between production and scavenging of free radicals generated in presence of pollutants. Oxidative stress, which occurs both in plants and animals, has been extensively studied in numerous species and many contexts (Mascher *et al.*, 2002; Drążkiewicz *et al.*, 2003a,b; Łaszczyca *et al.*, 2004; Lemiere *et al.*, 2005; Brulle *et al.*, 2006; Remans *et al.*, 2007; Bidar *et al.*, 2007; Posmyk *et al.*, 2009; Manier *et al.*, 2012). Exposure to xenobiotics can produce many changes both in activity levels ("biomarkers / indicators") and/or gene expression variations ("biomarkers of exposure") of defense enzymes. A detailed literature survey of the biochemical responses (enzyme activities) and expression variations of genes encoding proteins involved in antioxidant response in Annelids, Brassicaceae and Fabaceae has been done.

2.1) Annelids

Annelids represent a significant part of soil macrofauna biomass (60-80%). As soil engineers, earthworms play a key role in many soil processes (e.g., soil aeration, decomposition of organic matter, soil microbial activity) and are in full contact with the soil (aqueous and solid phase), which makes them relevant indicators of environmental changes (Cortet *et al.*, 1999; Paoletti, 1999; Arnold *et al.*, 2003; Römcke *et al.*, 2005). Moreover, although their ecology vary, most earthworm species are likely to be in contact with soil contaminants. Contamination may take various routes i.e., ingestion of contaminated soil or food particles, passive adsorption of the metal dissolved in interstitial water through the body wall, ingestion of contaminated soil solution (Arnold *et al.*, 2003). The literature review was carried out on the basis of keywords in Scopus (<http://www.scopus.com>) and in PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) using combinations of the following keywords: '*Eisenia fetida** earthworms* Lumbricidae* enzyme activity* gene expression* xenobiotics* metals* organics* pesticides* aromatic compounds*' in Topics. Publications which appeared relevant for the review were sorted using titles, abstracts and full texts. Concerning gene expression studies, only those using real-time PCR were selected. This procedure allowed us to select a corpus of 43 references (Table 1). Data search in molecular databases was carried out first on the basis of keywords in Genbank™ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) using combinations of the following keywords '*Eisenia fetida** earthworms* Lumbricidae* "name of enzyme or protein of interest"* (e.g.: catalase)' in Topics then by means of a BLAST when few sequences were available for a given candidate.

2.1.1) Exposition to metals

2.1.1.1) Enzyme activity

In 2004, Łaszczyca *et al.* worked on superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GPX) and glutathione transferase (GST) enzyme activities in whole body of three earthworm species (*Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea caliginosa* and *Eisenia fetida*) collected from soils contaminated by cadmium (Cd), copper (Cu), lead (Pb) and zinc (Zn) (3.3 to 82; 10.7 to 47, 136 to 2635 and 151 to 10454 mg.kg⁻¹, respectively). The aim of the study was to clarify whether non-specific enzymatic indices were of any diagnostic value in order to determine signs of acclimation of soil fauna to a gradient of metal trace element (MTE) contamination. They observed that GST, GPX and GR activities increased in animals exposed to metal contamination and that CAT and SOD activities decreased when earthworms are exposed to soil containing high levels of metals. In a context of pollution monitoring using biomarkers, they postulated that these enzymatic activities variations might be of diagnostic value.

In 2008, Antunes *et al.* developed an *in situ* bioassay using *Eisenia andrei*. Their objective was to validate their *in situ* soil bioassay procedures to complement the ongoing risk evaluation based on laboratory assays. Earthworms were placed during 48h in microcosms containing a contaminated soil (Cd, Zn and uranium (U)) from an abandoned uranium mine. Microcosms were buried *in situ*, in such a way that the top of microcosms was leveled to the adjacent soil surface and were covered with a black plastic bag to prevent direct sunlight. CAT and GPX activities were measured in earthworm whole body after a 48 h exposure. From this experiment, authors concluded that oxidative stress biomarkers did not fully work as sensitive parameters to environmental contamination.

In 2011, Li *et al.* studied the impact of ZnO nanoparticles (NPs) on the earthworm *E. fetida*. Organisms were exposed during 96 h either in agar (0, 50, 100, 200, 500 and 1000

mg.kg⁻¹), or on filter paper (0, 50, 100, 200, 500 and 1000 mg.L⁻¹). CAT, SOD and GPX activities were measured in whole body. A slight increase of SOD activities at the lowest exposure dose of ZnO (50 mg.kg⁻¹), followed by a decrease at 100 mg.kg⁻¹ in the agar cubes was observed. This activity is similar to hormesis. SOD activities in earthworms exposed on filter paper was similar. CAT and GPX activities were not significantly influenced in individuals exposed to ZnO NPs whatever NPs concentration and exposure medium.

The same year, Colacevich *et al.* (2011) exposed *L. terrestris* to mercury (Hg) contaminated soil. The aim of this study was to examine whether biomarkers of oxidative stress in earthworms can be a complementary methodology in the assessment of soils historically contaminated by Hg. Earthworms were exposed to Hg-spiked soils in microcosms during 44 days. A range of polluted soils was used (0.11, 73, 116, 124 and 1287 mg.kg⁻¹ of Hg). Earthworms were collected after a 2-day and a 44-day exposure, to observe short- and long-term effects respectively. GST, GR and GPX activities were measured in whole body. Authors concluded that GR activities were correlated with reduced glutathione / oxidized glutathione ratio after a 44-day exposure suggesting that GR activities play a key role in cell homeostasis of glutathione.

Tsyusko *et al.* (2012) measured CAT activities in whole body of *E. fetida* exposed up to 7 days (1, 3 and 7d) to a soil spiked with Ag NPs or AgNO₃. CAT activities decreased with increasing exposure time to AgNO₃.

2.1.1.2) Gene expression

In 2006, Brulle *et al.* cloned and tested expression of 14 potential biomarkers in *E. fetida* following cadmium exposure. Real-Time PCR testing of each candidate was done following exposures to Cd spiked soils (8, 80 and 800 mg.kg⁻¹). Among these candidates, a cysteine-rich protein involved in metal detoxification, cadmium-metallothionein (*Cd-mt*), and two oxidative

stress enzymes (CAT (*cat*) and Cu/Zn SOD (*Cu/Zn sod*)) were studied in coelomocytes. *Cd-mt* was significantly induced in *E. fetida* exposed to Cd. This induction was later confirmed in *E. fetida* exposed to field-collected polluted soils (Bernard *et al.*, 2010; Brulle *et al.*, 2011) and also in close related species, *L. rubellus*, collected from polluted sites (Stürzenbaum *et al.*, 2004; Bernard *et al.*, 2010). Concerning oxidative stress enzyme, only *cat* was significantly but transiently induced. This work was one of the first antioxidative enzymes study performed at transcriptomic level.

In 2010, Bernard *et al.* analyzed gene expression of four candidates (*Cd-mt*, coactosin-like protein (*clp*), phytochelatin synthase (*pcs*) and lysenin (*lys*)) in coelomocytes of *E. fetida* exposed in microcosms to soils sampled from the field. They also analyzed gene expression of three candidates (*Cd-mt*, *clp* and translated controlled tumor protein (*tctp*)) in *Lumbricus rubellus* sampled from the field (one slightly contaminated site, used as a reference soil and another highly contaminated site). The aims of this work were (1) to evaluate expression variation of biomarker candidates, (2) to gain insight the detoxification processes and the long-term response to a metallic stress through the responses of 4 genes and (3) to compare responses observed in a test species (*E. fetida*) with responses of a field species (*L. rubellus*). Worms were submitted to a long exposure phase (exposure phase 1 with a highly contaminated topsoil collected near a former Pb smelter), during 2 months, followed by a long depuration period (worms were exposed 6 months to a slightly contaminated urban garden topsoil) and then a novel exposure episode (exposure phase 2 with the highly contaminated soil during 1 month). In *L. rubellus*, gene expression of *Cd-mt* was induced significantly in individuals from the highly contaminated site compared to those from the slightly contaminated site. In *E. fetida*, *Cd-mt* was induced significantly in individuals exposed for a long time to the contaminated soil and *pcs* was induced significantly in individuals exposed for a short time to the contaminated soil. These results are in agreement with those obtained

by Brulle *et al.* (2008a; 2011). Cooperation between gene expressions of both candidates was also suggested by the authors. Indeed, phytochelatin synthase (PCS) is an enzyme which catalyzes phytochelatin (PCs) synthesis from molecules of glutathione, PCs being able to chelate metals. Cd-MT is involved in metal detoxification mechanisms.

The same year, Unrine *et al.* (2010) measured gene expression of *mt2*, *cat* and *sod* in whole body of *E. fetida* exposed during 28 days to a Cu NP contaminated soil. Only *mt2* gene expression was induced in worms exposed to Cu NPs. This induction is NP form- and Cu-dependent.

Bigorgne *et al.* (2011) exposed *E. fetida* to suspensions containing 0.1, 1 and 10 mg.L⁻¹ of titanium dioxide (TiO₂) byproducts for 24h and measured *mt2* and *sod* gene expressions in whole body. Those genes were only significantly induced for exposures to high doses of TiO₂ (10 mg.L⁻¹), suggesting a specific response of *mt2* and *sod* to oxidative stress.

A year later, the same team exposed *E. fetida* cœlomocytes *in vitro* to well-dispersed suspension of small aggregates (130 nm) of TiO₂ NPs (1, 5, 10 and 25 µg.mL⁻¹) for 24h (Bigorgne *et al.*, 2012). Gene expression of *mt2*, *cat*, *gstp* and *sod* were measured in cœlomocytes. Results for *mt2* were in agreement with those obtained by Bigorgne *et al.*, 2011 with induction observed after 4h and 12h of exposure to high concentrations of NPs. Nevertheless, *cat*, *gstp* and *sod* did not display any variation of expression suggesting that TiO₂ NPs do not induce oxidative stress for concentrations tested in this study. *sod* results were not in agreement with those obtained by Bigorgne *et al.* (2011).

In 2011, Liang *et al.* measured *mt2* gene expression in posterior body part of three earthworm species (*Metaphire posthuma*, *Polypheretima elongata* and *Pontoscolex corethrurus*). For each species, one group of individuals was exposed to a non-contaminated field soil and another one was exposed to a Cd-spiked soil (20, 40 and 80 mg.kg⁻¹) up to 14 days (1, 3, 7 and 14d). A dose- and time-dependent induction of *mt2* was observed by the

authors. MT2 could allow cell protection against oxidative stress caused by Cd by increasing Cd-bioaccumulation ability.

2.1.2) Exposition to aromatic compounds

2.1.2.1) Enzyme activity

In 1999, Saint-Denis *et al.* measured CAT and GST activities in whole body of *E. andrei* exposed during 14 days to an artificial soil (OECD, 1984a) contaminated by benzo(a)pyrene (B(a)P; 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, 1, 100 and 1000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). The aim of the study was to elucidate in worms the mechanisms of toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and to determine whether worm enzymatic responses could be used for monitoring PAH-contaminated soils in laboratory sublethal assays. No variation in enzyme activities was observed. These results are in agreement with those obtained by Zhang *et al.* (2009) who measured CAT, SOD and peroxidases (POX) activities in whole body of *E. fetida* exposed 48h to filter paper contaminated by B(a)P. SOD and POX activities increased only after exposure to high doses of B(a)P (10^{-2} $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

Investigation of DNA damage and oxidative stress generation by toluene, ethylbenzene or xylene in worms was done by Liu *et al.* (2010). In *E. fetida* exposed 48 hours to an artificially contaminated field soil, CAT, SOD and POX activities were measured on whole body whereas the alkaline version of the Comet assay was performed on cœlomocytes to assess genotoxicity.

The activity of enzymes could be related to the exposure of the three pollutants but the sensitivity of the three enzymes was different. On the other hand, comet assay results showed that tested pollutants could significantly induce DNA damage in earthworms and the dose-dependent relationships that were displayed clearly indicated genotoxic effects of toluene,

ethylbenzene and xylene on *E. fetida*. Toluene seems to be more genotoxic than ethylbenzene and xylene.

In 2011, Liu *et al.* investigated the responses of antioxidant systems after exposure of *Eisenia fetida* to soil contaminated with 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethyl-cyclopenta-c-2-benzopyran (HHCB). Earthworms were exposed to a field soil contaminated by a range of HHCB (0, 10, 50 and 100 mg.kg⁻¹) during 28 days (3, 7, 14 and 28d). CAT, SOD and POX activities were measured on whole body. SOD and CAT activities decreased slightly for short-term exposures (3 and 7 d) then increased for long-term exposures (14 and 28d). From those results, SOD seemed to be more sensitive than CAT. POX inhibition was noted as HHCB dose increase whatever exposure duration.

2.1.2.2) Gene expression

In 2011, Chen *et al.* exposed *E. fetida* to galaxolide (AHTN) and tonalide (HHCB) in two separated experiments. Earthworms were exposed to contaminated filter paper (Chen *et al.*, 2011a) or to contaminated soil (Chen *et al.*, 2011b). *cat* and *sod* were used as biomarkers in whole body of earthworms, to assess AHTN and HHCB adverse effects. Both studies showed a significant increase of *cat* and *sod* expressions during low-dose expositions (AHTN: 0,6 µg.cm⁻² et 10 µg.g⁻¹ / HHCB: 0,3 µg.cm⁻² et 10 µg.g⁻¹ for filter paper and soil exposition, respectively) and a significant decrease of gene expressions during high-dose expositions (AHTN: 6 µg.cm⁻² et 100 µg.g⁻¹ / HHCB: 3 µg.cm⁻² et 100 µg.g⁻¹ for filter paper and soil exposition respectively).

2.1.3) Exposition to pesticides

2.1.3.1) Enzyme activity

In 2001, Ribera *et al.* exposed *E. andrei* to increasing concentrations of carbaryl (CA; 12, 25 and 50 mg.kg⁻¹ artificial soil) for different time periods (2, 7 and 14 days) using the standard soil test method. CAT, GR and GST activities were measured on whole body. Carbaryl is known to inhibit acetylcholinesterase activities in the nervous system of insects and other animals (Baron, 1991). In *E. andrei*, size reduction, neurotoxicity and immunomodulator effects after exposure to carbaryl were observed (Stenersen, 1979; Gupta and Sundararaman, 1991; Stenersen *et al.*, 1992; Ville *et al.*, 1997). The aims of this study were to elucidate the mechanisms of toxicity for worms of carbamate compounds and to explore the potential use of these responses as biomarkers to monitor carbamate-contaminated soil. No significant variation was observed suggesting that carbaryl inhibited biotransformation enzyme activities but did not induce oxidative stress.

In 2008, Schreck *et al.* investigated on a vineyard population of *Aporrectodea caliginosa nocturna* the effects of a mixture of insecticides (λ -Cyhalothrin and Chlorpyrifos-ethyl) and/or fungicides (Folpet, Metalaxyl, Myclobutanil and Fosetyl-Al) at different environmental concentrations. CAT and GST activities were measured on whole body. The aim was to observe the global effects of pesticide exposure, as in a vineyard, rather than focus on each isolated biomarker variation, or on each compound's impact. In total, 13 microcosms were used: 2 for control, 4 for insecticide exposition, 4 for fungicide exposition and 3 for insecticide/fungicide mix exposition. Earthworms were collected after 3, 7, 14 and 34 days of exposure. After a 3-day exposure, CAT activities increased significantly in earthworms exposed to insecticides and to pesticide mix. GST activities increased significantly in individuals exposed to fungicides and to pesticide mix. After a 14-day exposure, CAT activities decreased significantly in earthworms exposed to all contaminated conditions. GST

activities decreased significantly in individuals exposed to insecticides and to pesticide mix. The significant increase in GST and CAT activities revealed the metabolisation of these compounds resulting in the production of reactive oxygen species. After a long period of exposure or high concentrations, earthworms were physiologically damaged: they could not cope with the high toxicity (cellular dysfunction, protein catabolism, etc).

In 2009, Song *et al.* exposed *E. fetida* to an OECD artificial soil spiked with atrazine to study if induction of oxidative stress and DNA damage occurred in earthworms after this herbicide exposure. Atrazine was added to artificial soil at rates of 0, 2.5, 5 and 10 mg.kg⁻¹. Two earthworms, one for enzyme and another for comet assays, exposed to each treatment were collected after 7, 14, 21 and 28 days of exposure. CAT, SOD and POX activities were measured on whole body and Comet assay was conducted on cœlomocytes. SOD activities were inhibited whatever exposure condition. POX activities increased in individuals exposed to contaminated soil during 28 days. CAT activities increased in earthworms for low dose exposures and decreased for high dose exposures. Comet assay results showed DNA damage in a time- and dose-dependent manner. Thus, atrazine induces oxidative stress and DNA damage in earthworms.

In 2010, Lin *et al.* conducted 48 h filter paper contact and 28-day spiked soil tests to study the toxic effects of triclosan (TCS) on the antioxidative and DNA damage indices of *E. fetida* (Lin *et al.*, 2010a). CAT and SOD activities and the Comet assay were performed as Song *et al.* (2009). CAT and SOD activities increased significantly for low dose exposure and decreased significantly for high dose exposure. CAT activities results are in agreement with those obtained by Schreck *et al.* (2008). Important DNA damages in earthworms exposed to TCS-spiked soil during 28 days were observed. A dose-dependence relationship was brought out.

The same year, the same group published an additional study by adding analysis of GST activities to those of CAT and SOD (Lin *et al.*, 2010b). GST activities showed same variations than CAT and SOD activities, i.e., increased significantly for low dose exposure and decreased significantly for high dose exposure.

In 2012, Dong *et al.* exposed *E. fetida* to a natural forest soil spiked with tetracycline or chlortetracycline. CAT and SOD activities, measured on whole body, were used as a biomarker of oxidative stress and DNA damage measured by means of the comet assay as a genotoxicity marker. A range of antibiotic-spiked soil (0, 0.3, 3, 30, 100 and 300 mg.kg⁻¹) was used and earthworms were collected after 7, 14 and 28 days of exposure. CAT and SOD activities indicated biochemical stresses induced by antibiotics. These results are in agreement with those obtained by Lin *et al.* (2012) during a chlortetracycline exposure. Enzyme activities showed non informative variations. Both antibiotics induced significant genotoxicity on earthworm cœlomocytes in a dose-dependent manner and chlortetracycline has a stronger effect than tetracycline in the short term. Compared to enzyme activities, the genotoxicity response was more sensitive.

2.1.3.2) Gene expression

To our knowledge, no pesticide exposure study performed at transcriptomic level in *Eisenia fetida* reported oxidative stress enzymes gene expression variations by means of real-time PCR.

2.1.4) Exposition to metals and organics

2.1.4.1) Enzyme activity

In 1999, Hønsi *et al.* conducted a 6-day filter paper exposure of *Eisenia veneta* and *E. fetida* to Zn, Cu, Hg and paraquat. *E. veneta* was also exposed 14 days to the same metals in

OECD artificial soil. CAT and SOD activities were measured and were not affected in earthworms by any of the tested compounds neither for 6 day-exposure in liquid medium nor 14 days of exposure in soil. These results suggest that activities are not suitable as biomarkers of oxidative stress generated by MTEs (Zn, Cu or Hg) or paraquat in earthworms.

In 2008, Berthelot *et al.* exposed *E. andrei* to soils from military range and training areas, contaminated by HMX (1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine) and by weapon metals (Zn, Pb, Cd, ...). The objective was to achieve a bioavailability assessment of soil samples by adopting an integrated approach which combines both chemical and biological tools. Earthworms were exposed to soils during 7 days (2 and 7 days) and CAT, SOD and GST activities were then measured on whole body. GST activities were not affected by metals presence. CAT activities were measurable after 2 days of exposure and inhibited after 7 days. SOD activities increased after 2 days of exposure, which is not in agreement with SOD results obtained by Hønsi *et al.* (1999).

In 2009, Zhang *et al.* conducted contact and soil tests to study the effects of Cd and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pyrene alone on *E. fetida*. GST and CAT activities were studied as biomarkers in whole body of earthworms after 2, 14 and 28 days. Induction of CAT and GST in earthworms exposed to Cd and pyrene during 14 days in the acute soil test revealed that the metabolism of these chemicals results in the production of reactive oxygen species. After a 28-day exposure, earthworms exposed to pyrene failed to handle the high toxicity and were physiologically damaged, while those exposed to Cd were acclimated to the disturbed environment through effective metabolism of the chemical and management of the oxidative stress.

2.1.4.2) Gene expression

In 2008, Owen *et al.* exposed *Lumbricus rubellus* to bark-amended loam soils spiked with cadmium (Cd; 50, 200 and 600 mg.kg⁻¹), fluoranthene (FLA; 62, 140, 316, 711 and 1066 mg.kg⁻¹) and atrazine (ATZ; 12 and 35 mg.kg⁻¹) during 28 days. Microarray libraries were made. Among these libraries, *MTs 2A, 2B* and *2C*, *GST α* and *GST pi* were studied on whole body. During Cd exposure, all *MTs* show a strong and significant up-regulation with increasing Cd concentration. The highly significant correlation between the microarray and qPCR data within the experiment provides confirmation of the validity of these microarray findings. *GST α* was also significantly up-regulated with increasing Cd concentration. *GST pi* was significantly up-regulated with increasing FLA concentration. These up-regulations were attributed to a response to ROS-induced damages.

In 2012, Manier *et al.* exposed 10 weeks simultaneously two test species (*T. repens* and *E. fetida*) to a reference soil contaminated by a landfill leachate (metal and organic compound mixture). *Cd-mt* and *pcs* were characterized by an increase in their transcript levels in worms exposed to the reference soil spiked with the leachate, regardless the presence of *T. repens*.

2.2) Brassicaceae

Brassicaceae are plants belonging to mustards family. *Arabidopsis thaliana*, plant genetic model and *Brassica oleracea*, our model species, belong to this large family. In this section, a balance of *Arabidopsis* and *Brassica* studies is done. The literature review was carried out on the basis of keywords in Scopus and PubMed using combinations of the following keywords: '*Brassica oleracea** cabbage* Brassicaceae* enzyme activity* gene expression* xenobiotics* metals* organics* pesticides* aromatic compounds*' in Topics. Publications which appeared relevant for the review were sorted using titles, abstracts and full texts. Concerning gene expression studies, only those using real-time PCR were selected. This procedure allowed us

to select a corpus of 50 references (Table 2A). Data search in molecular databases was carried out first on the basis of keywords in Genbank™ and in the John Craig Venter Institute Brassica genomics database (<http://blast.jcvi.org/er-blast/index.cgi?project=bog1>) using combinations of the following keywords ‘*Brassica oleracea** cabbage* Brassicaceae* “name of enzyme or protein of interest”* (e.g.: catalase)’ in Topics then by means of a BLAST analysis when few sequences were available for a given candidate.

2.2.1) Exposition to metals

2.2.1.1) Enzyme activity

Drażkiewicz *et al.* (2003a) studied APX, GR, dehydroascorbate reductase (DHAR) and monodehydroascorbate reductase (MDHAR) activities in leaves of *A. thaliana* treated with excess of Cu (0, 5, 25, 50 and 100 µM) for 1, 3 and 7 days. GR activities were time-dependent whereas those of DHAR were dose-dependent. MDHAR activities increased after a 1-day exposure to 5 µM of Cu then remained important for high Cu concentrations. Finally, APX activities decreased whatever exposure time and copper concentration.

In 2005, Pandey *et al.* grew *Brassica juncea* for 15 days in hydroponic culture supplemented with 0.2, 2 and 20 µM of chromium (Cr⁶⁺). SOD, CAT, GR, GST and ascorbate peroxidases (APX) activities were measured on whole plant. SOD and CAT activities at lower levels of Cr⁶⁺ supply remained higher all through the treatment. While APX activities was very susceptible to excess Cr⁶⁺, GR and GST activities increased at elevated levels of Cr⁶⁺. The results suggested Cr⁶⁺ induced depression in plant growth of *B. juncea* to be a function of increased cellular accumulation of Cr despite increase in the activities of some of the antioxidant enzymes.

In 2007, Mobin and Khan exposed two *Brassica juncea* cultivars (RH-30 and Varuna) to artificial Cd-spiked soils (0, 25, 50 and 100 mg.kg⁻¹). CAT, APX, SOD and GR activities

were measured in leaves. Enzyme activities in Varuna cultivar were higher than those measured in RH-30 cultivar, except for SOD activities. The enhanced activities of antioxidant enzymes, APX, CAT, GR and also lower activities of SOD in Varuna cultivar alleviated Cd stress and protected the photosynthetic activity.

The same year, Hajiboland and Hamjad (2007) performed hydroponics experiments with 2 varieties of *B. oleracea* (cabbage and kohlrabi) exposed to selenium (Se) solutions (10 and 20 μM). CAT, APX, SOD, GR and POX activities were measured on whole plant. Cabbage and kohlrabi expressed very low enzyme activities. A progressive oxidative stress was noted. Results imply that the function of antioxidant system of plants could not explain either the growth stimulatory effect of Se in cabbage and kohlrabi.

Semane *et al.* (2007) exposed *A. thaliana* plants to Cd solutions (0, 1 and 10 μM) during one week. APX, GR, CAT, SOD and guaiacol peroxidase (GPOX) activities were measured in leaves. CAT, APX, SOD and GR activities increased with Cd doses.

Drażkiewicz *et al.* (2007) grew for 7 days *A. thaliana* plants in a nutrient solution containing 0, 5 and 50 μM Cd or Cu excess. Activities of SOD classes (Cu/Zn SOD, Mn SOD and Fe SOD) were determined in leaves. Plants exposed to Cd solutions showed a decrease of Cu/Zn SOD activity and a high activity of Fe SOD and Mn SOD. In plants exposed to Cu solutions, Cu/Zn SOD activity increased with Cu concentration, Mn SOD activity was stable and Fe SOD activity decreased slightly with Cu concentration. These results allow refining those obtained by Drażkiewicz *et al.*, 2004.

In 2008, Smeets *et al.* grew hydroponically *A. thaliana* seedlings for 24 h in 0, 5, 10 and 20 μM Cd-spiked solutions. SOD, CAT, APX, GPOX and GR activities were measured in leaves. GPOX and APX activities increased significantly with Cd concentration. However, a slight decrease of these enzyme activities was observed in plants exposed to 20 μM of Cd.

Russo *et al.* (2008) grew *Brassica napus* plants in nutrient solutions containing 0.25 μM of Cu. Then, plants were exposed during 6 h to a solution containing 100 μM of Cu and GR activities were measured. An increase of GR activities in leaves and a decrease in roots were observed. Oxidative stress seems to be present in plants exposed to 100 μM of Cu.

The same year, Chen *et al.* (2008) exposed *Brassica chinensis* to solutions contaminated by Cd (0, 5, 25, 50, 100 and 200 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) and sowed *B. chinensis* seeds in artificial soil contaminated by Cd (2, 20 and 200 mg.kg^{-1}). SOD, CAT, APX and GPOX activities were measured in leaves. Increasing Cd accumulation in the plant was accompanied by rapid accumulation of phytochelatins (PCs), and the sequestration of Cd by PCs provided a primary cellular mechanism for Cd detoxification and tolerance of *B. chinensis*. Increasing enzyme activities in response to concentrations of 5 to 50 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ of Cd showed an efficient defense against oxidative stress, suggesting that the antioxidative system was a secondary defensive mechanism. This resulted in reduced free Cd damage and enhanced Cd accumulation and tolerance. Furthermore, these results suggested that PCs and the antioxidant system may act in a synergic manner to allow plants to handle ROS generated by Cd that they play important roles in Cd detoxification of *B. chinensis*.

John *et al.* (2009) exposed *B. juncea* to Cd- and Pb-spiked soils. SOD, CAT, APX and GPOX activities were measured in leaves. CAT activities were increased at lower concentrations and decreased at higher concentrations of Cd and Pb. SOD, APX and GR activities increased up to 200 mg.kg^{-1} soil Cd and 300 mg.kg^{-1} soil Pb. Cd and Pb accumulated more at 200 mg.kg^{-1} soil Cd and 300 mg.kg^{-1} soil Pb in the shoots of *B. juncea*. This study demonstrated that *B. juncea* was tolerant to Cd and Pb and mobilized antioxidant enzymes in order to mitigate MTE stress damages.

In 2009, Posmyk *et al.* exposed red cabbage (*B. oleracea* var. *rubrum*) seedlings to Cu-containing solutions (0.5 and 2.5 mM) during 4 days. SOD, CAT, GPOX, APX, GPX and GR

activities were measured on whole plant. SOD, GPOX and APX activities increased whereas those of CAT, GR and GPX decreased. The analysis of the antioxidant enzyme activities suggested that peroxidases were the most active enzymes in red cabbage seedlings exposed to Cu^{2+} stress. Thus phenolic compounds (anthocyanins and sinapoyl esters), which could be also substrates for different peroxidases, might be the first line of defense against metal stress.

In 2009 too, Pinto *et al.* grew *B. juncea* plants in Cd-spiked soil ($0\text{-}35 \text{ mg.kg}^{-1}$) during 90 days. CAT, APX, GPOX and SOD activities were measured in leaves. CAT and APX activities results are in agreement with those obtained by John *et al.* (2009) and Mobin and Khan (2007). CAT activities are high whatever Cd concentration.

Shiyab *et al.* (2009) grew hydroponically in Hg-spiked solutions ($0, 1, 2, 5, 10$ and 20 mg.L^{-1}) two *B. juncea* cultivars (Florida Broadleaf and Longstanding). Their objectives were to study Hg-induced oxidative stress in order to examine the potential application of *B. juncea* to phytoremediation of Hg-contaminated soils, sediments and water. CAT, SOD and POX activities were measured in leaves. CAT activities increased. These antioxidative enzymes scavenge H_2O_2 resulting in lower H_2O_2 in shoots with higher mercury concentrations. Most Hg was accumulated in roots and low translocations of Hg from roots to shoots were found in both cultivars.

Szöllősi *et al.* (2009) grew *B. juncea* seeds in vitro at $0, 50, 100$ and 200 mg.L^{-1} of Cd in the dark for 24, 48, 72 and 96 hours. GST activities were measured and were induced with germination only after 24 h at the highest Cd concentration. An important oxidative stress was observed.

In 2011, Zaimoglu *et al.* exposed *B. oleracea* and *B. juncea* 6-week old plants grown in turf mixture and then irrigated by chromium (Cr)-spiked solution ($0, 0.05, 0.25, 0.5$ and 1 mM) during 10 weeks. CAT, APX and GR activities were measured in leaf tissues. Both species showed a similar trend in response to Cr treatments, the total enzyme activities were

higher in *B. oleracea* than in *B. juncea*. Cr treatments significantly decreased CAT activities depending on Cr concentrations in both species. A coordinated increase in APX and GR activities in both species under Cr stress played a role as signals to protect plants from Cr-induced stress.

Cuypers *et al.* (2011) grew hydroponically *A. thaliana* seedlings for 24 hours in 5 or 10 μM Cd-spiked solutions and 2 or 5 μM Cu-spiked solutions. SOD, CAT, APX and GR activities were measured in roots and leaves. A significant increase of APX activities during a Cd exposure (5 and 10 μM) was noted in leaves. The same observation was done for SOD and GR activities during a Cu exposure. Concerning CAT activities, a significant increase in leaves and a significant decrease in roots were observed during a copper exposure.

In 2012, Remans *et al.* grew hydroponically *A. thaliana* seedlings and exposed plants to Zn-contaminated solutions (0, 100, 250 and 500 μM) during 24 hours. SOD, CAT, APX, GPOX and GR activities were measured in roots and leaves. On the one hand, CAT, SOD and GPOX activities in leaves and CAT activities in roots increased. On the other hand, GR activities in leaves and SOD activities in roots decreased.

Mohamed *et al.* (2012) grew hydroponically *B. juncea* seedlings for 7 days in 0, 50 or 200 μM Cd-spiked solutions. CAT and POX activities were measured in roots and leaves. CAT activities were much lower than POX activities. Enzyme activities were the highest in roots. According the authors, leaves seemed to be less efficient than roots in ROS scavenging.

2.2.1.2) Gene expression

In 2007, Semane *et al.* performed gene expression analysis of *pcs1* and *grcyt* in *A. thaliana* leaves (Semane *et al.*, 2007; part 2.2.1.1 of this review). *pcs1* expression level increased significantly and *grcyt* expression level decreased significantly with Cd doses. Data obtained suggests that the plants respond to Cd stress by the ascorbate-glutathione defence network at

both transcriptional and enzymatic level. It appears that *Arabidopsis* plants exposed to 1 μM Cd were able to adopt a new metabolic equilibrium, allowing them to cope with this metal. However, when exposed to 10 μM Cd, loss of cellular redox homeostasis resulted in oxidative stress and toxicity.

In 2008, Smeets *et al.* performed gene expression analysis in *A. thaliana* leaves and roots (Smeets *et al.*, 2008; part 2.2.1.1 in this review). *cat1*, *csd2*, *fsd2*, *msd1*, *dhar*, *gr1* and *gpx2* gene expression were measured. *csd2* expression level decreased in both organs whereas level of expression of the other genes increased. *gpx2* and *apx1* expression levels were stable in roots and *fsd1* and *msd1* expressions were stable in leaves.

In 2009, Vanhoudt *et al.* exposed *A. thaliana* seedlings to 0, 0.1, 1, 10 and 100 μM uranium (U)-spiked solutions for 3 days. *csd1*, *fsd1*, *msd1* and *cat1* gene expressions were measured in leaves and roots. The aim of the study was to analyze oxidative stress related response in *A. thaliana* after U exposure. The authors observed a decrease of *csd1* expression in roots and *fsd1* expression in leaves with increasing U concentration whereas *cat1* expression increased in leaves with increasing U concentrations except for 100 μM U. Results indicate that oxidative stress plays an important role in U toxicity but suggest that plant responses differ for leaves and roots. In 2010, the same authors went into depth with their research. Indeed, impact of an additional stress was assessed and *A. thaliana* were exposed to U either with gamma-rays (Vanhoudt *et al.*, 2010a) or Cd (Vanhoudt *et al.*, 2010b). Concerning Cd and U study, experimental scheme was the same as in Vanhoudt *et al.* (2009). *A. thaliana* seedlings were grown on hydroponics and then exposed for 3 days to μM U in combination with 5 μM Cd. Gene expression of *cat1*, *cat2*, *cat3*, *csd1*, *csd2*, *csd3*, *fsd1*, *fsd2*, *fsd3*, *msd1*, *apx1* and *gr1* were studied. Oxidative stress related responses are highly affected by Cd while U influence is more limited. While for roots, based on an increase in *fsd1* gene expression, oxidative stress was suggested to be superoxide induced, in leaves on the other

hand, hydrogen peroxide related genes (e.g. *cat1*, *cat2*, *cat3*) were mostly altered. In 2011, the same team performed an additional studies (Vanhoudt *et al.*, 2011a,b) and reached very similar conclusions.

In 2012, Opdenakker *et al.* grew hydroponically *A. thaliana* seedlings and exposed plants to Cu- or Cd-spiked solutions (2 and 5 μM respectively) during 24 hours (2, 4, 6 and 24 h). Gene expression of *csd1*, *csd2*, *fsd1*, *apx1*, *cat1*, *cat2* and *cat3* were measured in leaves and roots. During Cu exposure, *csd1* and *csd2* (leaves and roots), *apx1* and *cat1* (roots) and *cat3* (leaves) transcript levels increased whereas those of *fsd1* (leaves and roots), *cat2* and *cat3* (roots) decreased. During Cd exposure, *fsd1* and *cat1* (roots) transcript levels increased whereas those of *csd1* and *csd2* (roots) and *cat2* (leaves) decreased. Cu-exposed seedlings showed a direct effect of the metal on roots and a differed effect on leaves. Cd exposure showed direct effects of Cd on leaves and roots after 24 hours. These results are in agreement with those obtained by Smeets *et al.* (2009).

Remans *et al.* (2012) studied gene expression of *gr1*, *gr2*, *pcs1*, *pcs2*, *cat1*, *cat2*, *cat3*, *apx1*, *apx2*, *csd1*, *csd2*, *fsd1*, *fsd2* and *fsd3* in *A. thaliana* leaves and roots.

Gene expression of *csd1*, *csd2*, *fsd1*, *fsd1* and *fsd3* decreased in leaves whereas *apx2* transcript levels increased in leaves and roots. These results support the existence of Zn-specific signal transduction pathways influencing antioxidative responses.

2.2.2) Exposition to aromatic compounds

2.2.2.1) Enzyme activity

In 2012, Ahammed *et al.* sprayed 5 plant species among them *Brassica campestris* and *Brassica rapa* with a phenanthrene (PHE)-spiked solution (30, 100 and 300 μM) during 2 weeks. CAT, SOD, GPOX, GR and APX activities were measured in leaves. In *B. campestris*, enzyme activities increased. In *B. rapa*, enzyme activities were relatively stable even

decreasing when PHE concentration increased. *B. rapa* seems to be the most PHE-tolerant species whereas *B. campestris* seems to be the least tolerant.

2.2.2.2) Gene expression

In 2010, Weisman *et al.* exposed *Arabidopsis thaliana* to PHE (0, 0.25 and 0.5 mM) during 21 days. Seeds were grown on square Petri dishes containing half-strength Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with sucrose and 0, 0.25 or 0.5 mM PHE. Microarray libraries were made. Among these libraries, GSTs (*AtGSTU24* (At1g17170), *AtGSTF2* (At4g02520), *AtGSTF3* (At2g02930), *AtGSTF6* (At1g02930) and *AtGSTF7* (At1g02920)), CATs (*AtCAT1* (At1g20630), *AtCAT2* (At4g35090) and *AtCAT3* (At1g20620) and APXs (*AtAPX4* (At4g09010), *AtTAPX* (At1g77490)) gene expression were studied. *AtGSTU24* was upregulated on phenanthrene. Additionally, the microarray probe that recognized *AtGSTF2* and *AtGSTF3* indicated a 3.7-fold increase of the transcripts on phenanthrene. Similarly, the probe that binds the GSTs *AtGSTF7* and *AtGSTF6* indicated 12-fold upregulation of these genes. CATs (*AtCAT1*, *AtCAT2* and *AtCAT3*) and APXs (*AtAPX4* and *AtTAPX*) were down-regulated on PHE. While oxidative stress was occurring under phenanthrene treatment, several antioxidant genes were downregulated. This scenario can occur when plants invoke a positive feedback loop that amplifies ROS to serve as signaling molecules.

2.2.3) Exposition to pesticides

2.2.3.1) Enzyme activity

In 2000, Radetski *et al.* exposed three terrestrial species among them *B. campestris* cv. *chinensis* to different concentrations of herbicide TCA (sodium trichloroacetate) (0, 0.03, 0.12, 0.48, 0.98, 1.90 and 3.90 mg.kg⁻¹) in a growth test according to guideline OECD # 208 (OECD, 1984b). SOD, POX, CAT and GR activities were measured in whole plant. Enzyme

activities increased significantly from 0.48 mg TCA kg dry soil⁻¹. The increase in antioxidant enzyme activities observed in this study ensured the detoxification of increased levels of active oxygen species, and presumably prevented the plants from undergoing oxidative stress damage.

Drążkiewicz *et al.* (2003b) exposed *A. thaliana* hydroponic cultures to colchicine and H₂O₂ solutions. SOD, CAT, GPOX and APX activities were measured in leaves. In the presence of colchicine, SOD activities increased, while CAT, APX and GPOX activities decreased. Inhibitory H₂O₂ effects on the activity of the enzymes were found. Colchicine pre-treatment resulted in an increase in CAT activity and a further increase in SOD activity in plants treated with H₂O₂.

2.2.3.2) Gene expression

In 2007, Laloi *et al.* exposed *Arabidopsis thaliana* to paraquat (0 and 20 μM) during 21 days. Wild-type and thylakoidal ascorbate peroxidase-overexpressing plants were used. Seeds were grown on square Petri dishes containing culture medium (MS medium supplemented with sucrose) and were sprayed either with a solution of 20 μM paraquat in 0.1% Tween or with Tween alone. Microarray libraries were made. Among these libraries, *AtTAPX* (At1g77490) and *AtAPX1* (At1g07890) gene expressions were measured in leaves. The suppressive effect of *AtTAPX* on H₂O₂ concentrations within the transgenic line was tested by comparing transcript levels of four genes known to be specifically activated during paraquat or H₂O₂ treatment. In *AtTAPX*-overexpressing plants that were exposed to paraquat, transcript levels *AtAPX1* were 2.7-fold lower than in paraquat-treated wild-type plants. The chloroplast-specific H₂O₂ scavenger can reduce the endogenous H₂O₂ level in plastids of *AtTAPX*-overexpressing plants. The reduced activation of these marker genes further confirms their H₂O₂-specific responsiveness. Under no stress, the overexpression of *AtTAPX* did not affect

plant fitness and only very poorly affected gene expression. The overexpression of *AtTAPX* altered the stress sensitivity of plants only under conditions that endorsed selectively the release of a particular ROS and led to a higher resistance to $O_2^{\bullet-}/H_2O_2$ in paraquat-treated wild-type plants.

The same year, Ramel *et al.* (2007) exposed *Arabidopsis thaliana* to atrazine (0 and 10 μ M). Seeds were grown on square Petri dishes containing culture medium (MS medium supplemented with sucrose). After cultivation, plantlets were transferred to fresh medium in the absence or presence of 10 μ M atrazine. Microarray libraries were made. Among these libraries, *AtAPX1* (At1g07890), *AtGSTU20* (At1g78370), *AtGSTF11* (At3g03190) and *AtCAT3* (At1g20620) gene expressions were measured in leaves. *AtAPX1*, *AtGSTU20* and *AtGSTF11* were significantly down-regulated whereas *AtCAT3* showed no variation during exposure to atrazine.

In 2011, Skipsey *et al.* exposed *Arabidopsis thaliana* culture cells to fenclorim (herbicide) during 60 min. *Arabidopsis* Col-0 cultures were grown in the dark in MS medium and used 5 days after subculturing. Chemical treatments were prepared as 100 mM stocks in acetone and added to the medium as a 1:1000 dilution. Control treatments consisted of 0.1% v/v acetone. *AtGSTU19* (At1g78380), *AtGSTU24* (At1g17170), *AtGSTF8* (At2g47730) and *AtGSTL1* (At5g02780) gene expressions were measured by real-time PCR. *AtGSTF8*, *AtGSTU19* and *AtGSTU24* were up-regulated whereas *AtGSTL1* showed no variation.

In 2012, Bulgakov *et al.* exposed *Arabidopsis thaliana* culture cells to paraquat during 1 h. Suspension-cultivated *A. thaliana* cells were grown for 4 d in the dark and treated with paraquat (10 mM) for 1 h under continuous light exposure. *AtCAT1* (At1g20630), *AtAPX1* (At1g07890), *AtAPX2* (At3g09640), *AtAPX3* (At4g35000), *AtCSD1* (At1g08830), *AtCSD2* (At2g28190) and *AtCSD3* (At5g18100) gene expressions were measured by real-time PCR.

AtCAT1, *AtAPX1*, *AtAPX2*, *AtAPX3* and *AtCSD1* were up-regulated whereas *AtCSD2* and *AtCSD3* show no variation.

2.2.4) Exposition to metals and organics

2.2.4.1) Enzyme activity

In 2006, Chiang *et al.* measured CAT, APX and peroxidases (POX) activities in leaves of *Arabidopsis halleri* and *A. thaliana* hydroponic cultures exposed to Cd (50 and 100 μ M) or to paraquat (1 μ M). CAT and POX activities are highly elevated in *A. halleri*. This observation positively correlates with the higher ability of *A. halleri* to detoxify H₂O₂ produced by Cd and paraquat treatments. Higher peroxidases activities seem to contribute to the MTE tolerance in *A. halleri* by alleviating the ROS damage. A similar observation was noted by Cho and Seo (2005) in *A. thaliana* Cd-resistant plants.

2.2.4.2) Gene expression

In 2006, Chiang *et al.* measured *mt2A*, *mt2B*, *mt3*, *apx1*, *apx3*, *gpx*, *gr*, *sod*, *mdar4* and *dhar* gene expression in whole plants of *Arabidopsis halleri* and *A. thaliana* hydroponic cultures exposed to Cd (50 and 100 μ M) or to paraquat (1 μ M). *apx1* and *apx3* were expressed 2.8 and 2.1 times higher, respectively, in *A. halleri* than in *A. thaliana*. One *mdar* gene, *mdar4*, involved in ascorbate cycling, was also expressed 2.1 times higher in *A. halleri* than in *A. thaliana*. In contrast, the expression of glutathione peroxidase cycle-associated genes *gpx* and *gr* was not significantly consistent in three *A. halleri* samples, whereas *sod* and *dhar* were expressed at a slightly lower level in *A. halleri* than in *A. thaliana*.

2.3) Fabaceae

Trifolium repens belongs to Fabaceae family. A few studies concerning enzyme activity and gene expression have been performed with this species which is well-studied in agronomy (Harmony *et al.*, 2001; Sanderson *et al.*, 2005; 2012; Deak *et al.*, 2007; Forster *et al.*, 2013). Thus, an expanded bibliography on the Fabaceae family has been made and is presented in this section. The literature review was carried out on the basis of keyword search in Scopus and PubMed using combinations of the followings: ‘*Trifolium repens** white clover* Fabaceae* enzyme activity* gene expression* xenobiotics* metals* organics* pesticides* aromatic compounds*’ in Topics. Publications which appeared relevant for the review were sorted using titles, abstracts and full texts. Concerning gene expression studies, only those using real-time PCR were selected. This procedure allowed us to select a corpus of 24 references (Table 2B). Data search in molecular databases was carried out first on the basis of keywords in Genbank™ using combinations of the following keywords ‘*Trifolium repens** white clover* Fabaceae* “name of enzyme or protein of interest”* (e.g.: catalase)’ in Topics then by means of a BLAST when few sequences were available for a given candidate.

2.3.1) Exposition to metals

2.3.1.1) Enzyme activity

In 2001, Dixit *et al.* exposed *Pisum sativum* (pea) hydroponic seedlings to Cd-contaminated solutions (4 and 40 μM) during 7 days. APX, CAT, SOD, GR, GST and GPOX activities were measured in leaves and roots. SOD, CAT and GST activities increased whereas GPOX decreased in leaves. In roots, APX and GR activities decreased.

In 2002, Mascher *et al.* grew red clover plants (*Trifolium pratense*) in a greenhouse on a sandy soil amended with different concentrations of arsenate (As; $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (0, 5, 10 and 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ As) or a MTE mixture (5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Cd, 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ Zn and 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ As)

respectively. POX and SOD activities were measured in leaves. Increases in SOD and POX activities are correlated with increasing As content in plants. SOD activities decreased whereas POX activities increased strongly when plants are exposed to soils spiked by MTE mixture. Results indicate that metal exposure, both As and MTE mixture, produce oxidative damage in clover leaves.

In 2008, Zhou *et al.* exposed *Medicago sativa* hydroponics seedlings to Hg-contaminated solutions (0-40 μM) during 7 days. The aim of this study was to achieve a better understanding of the biological mechanisms for Hg-induced oxidative stresses in plants and to develop an appropriate method that can be used to estimate the degree of toxicity in Hg-contaminated soils. NADH oxidase, SOD, CAT, APX, GR and POX activities were assayed in leaves. The total activities of APX, POX and CAT were generally enhanced.

In 2009, the same authors assayed NADH oxidase, SOD, APX, GR and POX activities in *M. sativa* hydroponic cultures exposed to Hg-contaminated solutions (10 μM) during 24 hours (Zhou *et al.*, 2009). Some plants were pretreated with 0.2 mM salicylic acid (SA) for 12 hours before Hg exposure. Pretreatment with 0.2 mM SA increased the activity of NADH oxidase, APX and POX in the roots exposed to Hg. However, SOD activities were slightly decreased in SA + Hg-treated roots when compared to those of Hg treatment alone. These results suggest that exogenous SA may improve the tolerance of the plant to the Hg toxicity.

Still in 2009, Bidar *et al.* sowed *Trifolium repens* seeds on non-contaminated and MTE-contaminated field soils (*in situ* experimentation). Plants were collected 6 month after sowing. SOD activities were measured in roots and leaves. SOD activities in *T. repens* exposed to MTEs was higher than those exposed to non-contaminated soil. However, these activities decreased strongly for high MTE concentrations. An important oxidative stress seems to be present in plants grown in contaminated soils. These results are in agreement with those previously obtained by Bidar *et al.* (2007).

Wang and Song (2009) exposed hydroponic *T. repens* seedlings to Cd-contaminated solutions (0, 400 and 600 μM). CAT, SOD, GPX and APX activities were measured in roots and leaves. In the upper part of the plant, Cd^{2+} exposure led to a significant decrease in SOD, CAT and GPX activities and an increase in APX activities. In contrast, the roots showed an increase in activities of antioxidative enzymes under Cd^{2+} stress. Ca^{2+} application diminished the Cd^{2+} effect on activities of antioxidative enzymes in the upper part, even though it did not significantly affect these enzymes in roots. Possible mechanisms for the action of Ca^{2+} on Cd^{2+} stress were considered to reduce Cd^{2+} accumulation, alleviate lipid peroxidation and promote activities of antioxidative enzymes.

Sobrino-Plata et al. (2009) treated hydroponic *M. sativa* cultures with Cd or Hg at doses of 0, 3, 10 and 30 μM for 7 days. The aim of this study was to examine the alteration of glutathione metabolism in *M. sativa* plants grown in semi-hydroponic system and treated for 1 week with increasing doses of Cd or Hg. GR, APX, POX and SOD activities were assayed in roots and leaves. APX activities increased moderately in roots of Cd-exposed plants. GR activities were enhanced in leaves of alfalfa exposed to Cd and Hg. However, these activities were enhanced in Cd-treated plants but were severely inhibited in roots of plants treated with Hg. GR activities showed a metal-dependent response in roots.

In 2010, Bouazizi *et al.* cultured *Phaseolus vulgaris* seedlings in nutrient solution containing Cu^{2+} at various concentrations (50 and 75 μM) for 3 days. GPOX and CAT activities were measured in primary leaves. GPOX activities were decreased in 50 μM Cu-stressed leaves whereas 75 μM of Cu^{2+} resulted in an increase of enzyme activities. On the contrary, CAT activities were stimulated at 50 μM Cu^{2+} but unaltered at 75 μM .

2.3.1.2) Gene expression

In 2008, Chandran *et al.* exposed *Medicago truncatula* to Al during 12 hours. Plants were grown in control solution culture for 72 h then transferred to nutrient solutions containing either 0 μM (control) or 25 μM Al. The pH of the control and Al treatment solutions was adjusted to 4.5 using 1 N HCl and 1 N KOH, respectively. Root tips (0.5 cm) from 0 μM control and 25 μM Al treated seedlings were harvested after 12 h. Microarray libraries were made. Among these libraries, gene expressions of a peroxidase (TIGR accession number TC103581), a glutathione reductase (TIGR accession number TC107373) and a glutathione transferase (TIGR accession number TC107452) were measured. These effectors were significantly up-regulated.

In 2010, Panda and Matsumoto exposed *Pisum sativum* plants to Al during 48 h. Seedlings (4 d after germination) were treated with AlCl_3 (0, 10 and 50 μM) in an aerated 100 μM CaCl_2 solution, pH 4.75, for up to 24 h at 25°C under a 12-h photoperiod. *CAT*, *cAPX*, *MnSOD*, *FeSOD*, *CuZn-SOD* and *GR* were analyzed by real-time PCR in roots and leaves. In root under 10 μM Al, *GST* was almost same as that of control but in 50 μM Al *GST* increased 5-fold after 24-h suggesting the effect of Al-stress, though the increase fell by 2-fold after 48 h. The root showed 2- and 3-fold increase in *CAT* expression after 24 h and 48 h respectively in 50 μM -Al which was negligible in shoot after 48 h of 50 μM -Al treatment, though after 24 h it showed 2-fold increase indicating the involvement of *CAT* in controlling damage caused by H_2O_2 . In shoot 10 μM -Al showed considerable increase in expression especially after 24 h compared with 50 μM Al. But in roots there was no significant change observed except in 50 μM after 48 h, which showed almost 3-fold increase in its expression. *cAPX* expression was increased in both the Al concentrations in shoot. In root after 48 h the *Cu-Zn SOD* showed decreased expression, whereas after 24 h 50 μM Al showed much high expression. *FeSOD* showed gradual increase in its expression after 24 and 48 h of treatment. In case of *MnSOD*

only 50 μM treatment showed elevated expression of the gene. After 24 h, at 10 and 50 μM Al, *Cu-ZnSOD*, *MnSOD* expression increased whereas at only 10 μM *FeSOD* showed increased expression in shoot. But after 48 h except 10 μM of Al all the other treatments showed low *FeSOD* expression. The increase in these different types of SODs suggests their involvement in defense mechanism under oxidative stress generated in the cell under Al stress.

In 2012, Navascués *et al.* exposed hydroponically *Lotus corniculatus* seedlings to Al contaminated solutions (0, 10 or 20 μM AlCl_3) during 14 days. SODs (*MnSOD*, cytosolic CuZnSOD (*CuZnSODc*), plastidic CuZnSOD (*CuZnSODp*), cytosolic FeSOD (*FeSODc*) and plastidic FeSOD (*FeSODp*)), GPXs (*GPX1*, *GPX2*, *GPX3*, *GPX4*, *GPX5* and *GPX6*), APXs (cytosolic APX (*APXc*), plastidic APX (*APXp*), thylakoidal APX (*APXt*) and stromal APX (*APXs*)), dehydroascorbate reductases (DRs, cytosolic DR (*DRc*) and plastidic DR (*DRp*)), monodehydroascorbate reductases (MRs, peroxisomal MR (*MRpx*) and cytosolic MR (*MRc*)) and GRs (cytosolic GR (*GRc*) and plastidic GR (*GRp*)) gene expressions were quantified by real-time PCR in roots. The addition of 10 or 20 μM Al to the rooting medium increased the mRNA level of *FeSODc* and decreased that of *FeSODp*. Moreover, 20 μM Al down-regulated the expression of *CuZnSODc*, *GPX1*, *GPX4*, *DRc* and *DRp*. Remaining effectors showed no variation.

2.3.2) Exposition to aromatic compounds

To our knowledge, no study about exposure to aromatic compounds was performed in Fabaceae at enzymatic and transcriptomic levels.

2.3.3) Exposition to pesticides

2.3.3.1) Enzyme activity

In 2006, Batish *et al.* grew during 7 days *Phaseolus aureus* seeds in Petri dishes containing a range of 2-Benzoxazolinone (BOA) (0.1, 0.5, 1.0, 2.5 and 5.0 mM). The aim was to determine whether is due to induction of oxidative stress caused by generation of reactive oxygen species (ROS) and the changes in levels of antioxidant enzymes induced in response to BOA. SOD, GR, CAT, APX and GPOX activities were measured in roots and leaves. In response to BOA, there was a significant increase in the activities of scavenging enzymes SOD, APX, GPOX, CAT, and GR in root and leaf tissue of mung bean. At 5 mM BOA, GR activity in roots showed a nearly 22-fold increase over that in control. The present study concludes that BOA induces oxidative stress in mung bean through generation of ROS and upregulation of activities of various scavenging enzymes.

2.3.3.2) Gene expression

To our knowledge, no study about exposure to pesticides was performed in Fabaceae at transcriptomic level.

2.3.4) Exposition to metals and organics

2.3.4.1) Enzyme activity

In 2012, Manier *et al.* exposed in microcosms simultaneously two test species (*T. repens* and *E. fetida*) to a field-collected reference soil spiked with a landfill leachate (metal and organic compound mixture) during 10 weeks. GPOX and APX activities were assayed in roots and leaves and alkaline version of the Comet assay was performed in *T. repens*. An increase in *T. repens* OTM and APX activities in roots were observed in plants exposed to

pure leachate and 50% diluted leachate compared to those exposed to the reference soil. The response observed appears to be dose-dependent and linear in these experimental conditions.

2.3.4.2) Gene expression

To our knowledge, no study about exposure to metals and organics was performed in Fabaceae at transcriptomic level.

3) Implemented strategy

3.1) Selection, cloning and sequencing of target genes

In the literature studies regarding impacts of oxidative stress mostly focused on enzyme activities variations. Experiments using gene expression analysis in order to explore oxidative stress mechanism are less numerous and therefore sequence data are missing in databases. Even if sequence data are lacking in species of interest, it is actually still possible to measure gene expression levels. Indeed, many genes involved in important physiological functions are highly conserved between phyla. Phylogenetic conservation can thus be exploited to clone selected effectors in species of interest. Nucleotidic sequences coding oxidative stress enzymes were consequently cloned in *E. fetida*, *B. oleracea* and *T. repens*.

3.1.1) Cloning and sequencing

In order to clone oxidative stress candidates, consensus-degenerated hybrid oligonucleotide primers (CODEHOPs) were used. Primer design was conducted as described previously (Brulle *et al.*, 2006) (Figure S1, supplemented data). PCR reactions were done with GoTaq[®] Flexi DNA polymerase (Promega, Charbonnières, France) and touchdown PCR cycling conditions were 30 sec at 95°C, 30 sec at 65-55°C with a loss of 1°C per cycle and 1 min at 72°C for top 10 cycles then 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C and 1 min at 72°C for 30 cycles.

Expected size products were resolved on a 1% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide and subsequently cloned into the pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) and transformed in XL-1 Blue competent cells (Stratagene, Waldbronn, Germany). White colonies were grown on LB/ampicillin/IPTG/X-Gal plates, picked randomly and cultured into LB/ampicillin medium. Then, the recombinant clones were purified using Wizard[®] Plus SV Miniprep DNA Purified system kit (Promega). One or two clones were sequenced in both directions by Genoscreen (Pasteur Institute of Lille, France). Sequence analysis was performed using Genbank[™] (NCBI). Techniques used for *E. fetida*, *B. oleracea* and *T. repens* are identical.

3.1.2) RNA extraction and reverse transcription

All expression analysis were conducted on total RNA extracted from cœlomocytes of groups of 15 animals for *E. fetida*, using Tri-Reagent[®] (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, U.S.A.), and from leaves of groups of 3 plants for *B. oleracea* and groups of 10 individuals for *T. repens*, using RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. After a DNase digestion step (DNase I, Qiagen), RNA purity and integrity were conducted as previously described (Brulle *et al.*, 2006). Reverse transcription was performed using Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Illkirch, France) according to manufacturer's instructions. Oligo (dT) primers (18-mer) were used in order to allow the mRNA selection and consequently the coding RNA.

3.2) Gene expression analysis using Real-time PCR

3.2.1) Real-time PCR

Partial characterization of several recombinant clones allowed us to design homologous primers, subsequently used in real-time quantitative PCR using the Primer 3 software (Rozen and Skaletsky, 2000). PCR reactions were performed according to the Light Cycler[®] 480

Manual (Roche Molecular Biochemicals). Mastermix contained (final concentrations): 4 μL of water (DEPC), 2 μL of forward primer (0.3 μM), 2 μL of reverse primer (0.3 μM) and 10 μL of MESA Blue qPCR MasterMix Plus for SYBR[®] Assay (mixture of dNTPs, MeteorTaq DNA polymerase, MgCl_2 (4mM), SYBR Green I, Blue dye and stabilizers; Eurogentec, Seraing, Belgium). An 18 μL MESA Blue Mastermix was filled in each well of 96-well plates and 2 μL of cDNAs was added as PCR template. For each species, cDNAs were made from retrotranscription of 1.5 μg of each RNA sample. Then, for *E. fetida* and *T. repens*, templates were 1/50 diluted whereas for *B. oleracea* cDNAs were 1/20 diluted. The following PCR conditions were used: denaturation step (MeteorTaq activation; 95°C, 5 min), amplification and quantification step repeated 40 times (95°C for 3 sec, annealing temperature for 30 sec, 72°C for 10 sec), melting curve step (60-95°C with a heating rate of 0.1°C per sec and continuous fluorescence measurement) and a cooling step at 40°C.

Analysis of melting curves allowed optimization of annealing temperatures equal to 1°C below the melting temperature (T_m) of primer pairs. Analysis of melting curves allows also verification that only one product has been amplified. For each reaction, the crossing point (CP; defined as the cycle number at which the noise band intersects the fluorescent curve) was determined using the “Fit Point Method” of the Light Cycler[®] 480 Software release 1.2.0.0625 (Roche Diagnostics). For each mRNA, absence of contamination (genomic DNA) was checked using a no-RT control.

Expression levels and amplification efficiencies (E) of each gene, reference (Rg) and target genes (Tg) were determined according to previously described procedures (Brulle *et al.*, 2006). Briefly, for each sample, expression levels of target genes were compared to expression of reference genes, which are constitutively expressed in our experimental conditions. The expression ratio (R) was calculated according to the formula $R = (E_{Tg})^{CP_{Tg}} / (E_{Rg})^{CP_{Rg}}$.

3.2.2) Selection of reference genes

To accurately quantify gene expression, several experimental variations, such as quality and amount of biological material, primer design, RNA extraction and reverse transcription efficiencies should be taken into account (Ginzinger, 2002; Zhu *et al.*, 2012). Therefore, selection of an appropriate normalization strategy is crucial for the acquisition of biologically meaningful data. The use of one or more reference genes is currently the preferred method of normalization (Vandesompele *et al.*, 2009). An ideal reference gene should be expressed at a constant level across various conditions and its expression is assumed to be unaffected by experimental parameters (Thellin *et al.*, 1999; Schmittgen and Zakrajsek, 2000). For example, beta tubulin (*BolC.TUB6*), SAND family protein (*BolC.SAND1*) and ubiquitin (*BolC.UBQ2*) are good reference genes in drought and cold stresses in *B. oleracea* (Brulle *et al.*, submitted). Genes involved in basic metabolism and cell maintenance (e.g. beta actin (β -act), glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (*gapdh*), ribosomal subunits, ubiquitin (*ubq*), etc.) are commonly used as reference genes (Yu *et al.*, 2008; Kouzaki *et al.*, 2009; Tong *et al.*, 2009). However, several reports have demonstrated that there are no universally applicable reference genes with an invariant expression, and that using of unstable reference gene will lead to inappropriate biological data interpretation (Thellin *et al.*, 1999; Czechowski *et al.*, 2005; Artico *et al.*, 2010).

In order to identify suitable reference genes, several algorithms such as BestKeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), NormFinder (Andersen *et al.*, 2004) and geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002) have been developed to validate the most stable reference gene(s) from a panel of potential genes or candidate genes under a given set of experimental conditions (Dheda *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2011c).

BestKeeper software uses directly the CP and E values as input. This software gives a ranking based on repeated pairwise correlation and regression analysis of a given gene with all other

tested candidate reference genes. The CP values have to be transformed into so-called quantity values using PCR efficiencies according to Vandesompele *et al.* (2002) and Hellemans *et al.* (2007) for both geNorm and NormFinder. geNorm software is based on a reference ranking carried out by stepwise elimination of the least stable gene. Expression stability is defined as the average pairwise variation of a given gene with all other candidate reference genes. NormFinder uses linear mixed-effects modeling to calculate reference gene stability values. Moreover, these softwares are considered as the most reliable by real-time PCR community (Wang *et al.*, 2012; Mauriz *et al.*, 2012; Koči *et al.*, 2013; Lopez-Pardo *et al.*, 2013; Brulle *et al.*, submitted). Reference genes (Rg) were determined according to previously described procedures (Brulle *et al.*, submitted).

3.2.3) Gene expression of target genes

In order to analyze gene expression of target genes, their expression levels are compared to those of reference genes, which are constitutively expressed in our experimental conditions. Often, only one reference gene is selected. In this case, the expression ratio (R) is calculated according to the formula $R = (E_{Tg})^{CP_{Tg}} / (E_{Rg})^{CP_{Rg}}$. If two or more reference genes are selected, the expression ratio is calculated according to the formula $R = (E_{Tg})^{CP_{Tg}} / (\text{geometric mean } ((E_{Rg1})^{CP_{Rg1}}; (E_{Rg2})^{CP_{Rg2}}; \text{etc.}))$. These formulas allow calculation of absolute quantification of target gene expressions.

Relative quantification can be also calculated. For a given gene, it fits to ratio between absolute quantification in exposed individuals and absolute quantification in control individuals. In this case, absolute quantification can be defined as gene concentration (C). $C = E^{\text{mean}CP_{\text{cont.}} - \text{mean}CP_{\text{sample}}}$. Relative fold expression (RFE) is calculated according to the formula $RFE = C_{Tg} / C_{Rg}$. If two or more reference genes are selected, the RFE is calculated according to the formula $RFE = C_{Tg} / (\text{geometric mean } (C_{Rg1}; C_{Rg2}; \text{etc.}))$ (Pfaffl *et al.*, 2002).

3.2.4) Statistics

Expression levels were compared by means of analysis of variance followed by Tukey's post-hoc test using Statistica software (version 5.1, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, US). The normality of each distribution was verified by Kolmogorov-Smirnov's tests and variance homogeneity by Levene's tests. An α level of 0.05 was used in all procedures.

3.2.5) Experimental conditions

Experimental plan consisted in dual microcosms made of *E. fetida* and *T. repens* in one side and *E. fetida* and *B. oleracea* on the other side. An urban soil used as reference soil was spiked with CdCl₂ in order to make a range of Cd-spiked soils (0, 2.5, 5, 10 and 20 mg.kg⁻¹ Cd). Each microcosm contains about 500 g of Cd-spiked soils. Uncontaminated overdried powdered cow manure was added at the surface of soils as complementary food for earthworms. Soils were watered and individuals were collected after a 10-day exposure. Earthworm coelomocytes and plant leaves were collected and stored at -80°C until use. Then, RNA extraction, reverse transcription and finally gene expression quantification using real-time PCR were performed. Tables S1, S2 and S3 show candidates which were cloned. Among all the cloned candidates, some were not measurable (probably under the level of quantification although they could be cloned), some were measurable but did not exhibit significant variations and some showed significant variations of their level of expression (Tables S1, S2 and S3). Then, schematics of the oxidative stress systems have been drawn. Figure 1A has been done from literature data (Matés *et al.*, 1999; Kamata and Hirata, 1999; Brulle, 2005) of the oxidative stress in animal cells. Localization of major proteins involved in ROS scavenging presented in figure 1A is supposed to be similar in *E. fetida*. Figure 2A and 3A have been adapted from Mittler *et al.* (2004) who proposed a general oxidative stress scheme in higher plants. Localization of major proteins involved in ROS scavenging

presented in figures 2A and 3A are supposed to be similar in *B. oleracea* and *T. repens* respectively. Relative fold expression (RFE) results measured for each candidate for which gene expression could be quantified by real-time PCR. Candidates in blue were cloned but could not be measured, those in black were measured by real-time PCR but did not show variations in our experimental conditions, those in green were significantly up-regulated and those in red were significantly down-regulated. Normalization was done for each species with 3 reference genes, so concentration geometric mean of the 3 reference genes was used to calculate RFE. Results presented in this review are examples to illustrate our discussion.

4) Results

4.1) *Eisenia fetida*

Figure 1A shows major enzymes involved in oxidative stress in *E. fetida*. Six genes encoding oxidative stress enzymes have been cloned by our group (Brulle *et al.*, 2006). Thus, sequences are available in molecular databases (Genbank™). Enzymes are mainly located in cytosol (five in cytosol (*mt*, *pcs*, *CuZnsod*, *gstp* and *gpx*) and one in peroxisomes (*cat*). Reference genes were determined according to previously described procedures (Brulle *et al.*, submitted). Briefly, actin (β -*act*) and ribosomal protein S13 (*RiboS13*), which were our reference genes before this study, and 7 supplementary genes (*contig1517* (predicted protein), *contig2471* (phosphodiesterase 4B), *contig1525* (26S proteasome non ATPase regulatory subunit 4), *contig4478* (unknown protein), *contig453* (neurocalcin), *contig1959* (SCBP2 protein) and *contig2762* (cytochrome C oxidase subunit III)) which showed the most stable gene expression during stress conditions (metal stress), were selected. These candidates were identified during a previous work of our lab (Brulle *et al.*, 2008b). Then, gene expression of each candidate was quantified by real-time PCR in coelomocytes of earthworms exposed to Cd-spiked soils. Finally, reference genes were selected by using BestKeeper, NormFinder and

geNorm softwares. According to BestKeeper, *contig2471* (1st), *contig1517* (2nd) and *β-act* (3rd) were most stable genes. Then, after NormFinder analysis, *β-act* (1st), *contig1517* (2nd) and *contig2471* (3rd) were most stable genes. Finally, geNorm selected same genes as BestKeeper. Therefore, chosen reference genes are *β-act*, *contig1517* and *contig2471*. All candidates were quantified by real-time PCR. Table S1 (supplemented data) shows primers used to perform real-time PCR. Among these candidates, *Cd-mt* and *pcs* show the most interesting variations in earthworms exposed to Cd (Figure 1B). Indeed, *Cd-mt* is up-regulated (e.g. 24.28 fold in Cd20-exposed earthworms, $p = 1.80 \cdot 10^{-4}$) whereas *pcs* is down-regulated (e.g. 3.45 fold in Cd20-exposed earthworms, $p = 1.82 \cdot 10^{-4}$) whatever Cd concentration. *cat* and *gpx* are down-regulated (3.13 fold, $p = 1.98 \cdot 10^{-4}$ and 2.08 fold, $p = 3.84 \cdot 10^{-2}$ respectively) in earthworms exposed to Cd10-spiked soils whereas *gstp* is up-regulated (1.62 fold, $p = 4.36 \cdot 10^{-3}$) in those exposed to Cd20-spiked soils. *CuZnsod* shows variations but no trend was observable (Figure 1B).

4.2) *Brassica oleracea*

The figure 2A shows major enzymes involved in oxidative stress in *B. oleracea*. Six genes encoding oxidative stress enzymes were available in molecular databases (Genbank™). Eleven additional genes were cloned. Enzymes are located in most cell compartment (eight genes encoding cytosolic metallothionein (*BolC.MT1C*), phi glutathione transferase (*BolC.GSTF2*), tau glutathione transferase (*BolC.GSTU19* and *BolC.GSTU5*), zeta glutathione transferase (*BolC.GSTZ1*), ascorbate peroxidase (*BolC.APX1*), phytochelatin synthase (*BolC.PCSI*) and glutathione reductase (*BolC.GR1*), one gene encoding a cell wall peroxidase (*BolC.PRXCB*), one gene encoding a mitochondrial manganese superoxide dismutase (*BolC.MSD1*), two genes encoding peroxisomal catalase (*BolC.CAT2*) and theta glutathione transferase (*BolC.GSTT1*) and five genes encoding chloroplastic copper/zinc superoxide

dismutase (*BolC.CSD2*), glutathione peroxidase (*BolC.GPX7*), iron superoxide dismutase (*BolC.FSD3*), glutathione reductase (*BolC.GR2*) and thylakoidal bound ascorbate peroxidase (*BolC.tAPX*). Among these 17 candidates, 13 were technically measurable and 5 (*BolC.MT1C*, *BolC.GSTU19*, *BolC.GSTF2*, *BolC.GSTZ1* and *BolC.PRXCB*) showed significant variation of their level of expression using real-time PCR. Beta tubulin (*BolC.TUB6*), SAND family protein (*BolC.SAND1*) and ubiquitin (*BolC.UBQ2*) were chosen as reference genes according to Brulle *et al.* (submitted). Table S2 (supplemented data) shows primers used to perform real-time PCR. Among these candidates, *BolC.MT1C* shows the most interesting variations in cabbages exposed to Cd (Figure 2B). *BolC.MT1C* is down-regulated in cabbage exposed to Cd2.5-, Cd5- and Cd10-spiked soils (2.12 fold, $p = 1.03 \cdot 10^{-3}$, 2.08 fold, $p = 1.31 \cdot 10^{-3}$ and 3.03 fold, $p = 2.24 \cdot 10^{-4}$ respectively) whereas it is up-regulated in those exposed to Cd20-spiked soils (1.94 fold, $p = 1.80 \cdot 10^{-4}$). *BolC.GSTF2* is up-regulated in plants exposed to Cd2.5-spiked soils (3.81 fold, $p = 1.80 \cdot 10^{-4}$) and down-regulated in plants exposed to Cd5-spiked soils (2.56 fold, $p = 1.80 \cdot 10^{-4}$). *BolC.GSTZ1* is down-regulated in plants exposed to Cd5-spiked soils (2.33 fold, $p = 3.42 \cdot 10^{-4}$) and *BolC.PRXCB* is up-regulated in plants exposed to Cd10-spiked soils (2.03 fold, $p = 1.84 \cdot 10^{-4}$). *BolC.GSTU19* shows variations but no trend was observable (Figure 2B).

4.3) *Trifolium repens*

Figure 3A shows major enzymes involved in oxidative stress in *T. repens*. Only one gene (*TrMT1B*) encoding an enzyme potentially involved in oxidative stress was already available in molecular databases (Genbank™). Ten additional genes were cloned. Six genes encoding cytosolic peroxidase (*TrPRX22*), metallothionein (*TrMT1B*), ascorbate peroxidase (*TrAPX1*), glutathione transferase (*TrGSTU19*), phytochelatin synthase (*TrPCS1*) and glutathione reductase (*TrGRI*), one gene encoding a mitochondrial manganese superoxide dismutase

(*TrMSD1*), one gene encoding a peroxisomal catalase (*TrCAT5*) and three genes encoding chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase (*TrCSD2*), glutathione peroxidase (*TrGPX7*) and glutathione reductase (*TrGR2*) were available. 4 of them (*TrMT1B*, *TrCAT5*, *TrAPX1* and *TrGPX7*) were quantified by real-time PCR. Reference genes were determined according to previously described procedures (Brulle *et al.*, submitted). Briefly, reference genes used in most of gene expression studies in plants were selected. 7 genes were selected: *TrEF1a1* (elongation factor 1 alpha), *TrTBP2* (TATA box binding protein), *TrACT* (actin), *TrSAND1* (SAND family protein), *TrRiboS18* (ribosomal protein S18), *TrTUB* (beta tubulin) and *TrGAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). Then, gene expression of each candidate was quantified by real-time PCR in leaves of plants exposed to Cd-spiked soils, cold stress (8 h) and drought stress (8 h). Finally, reference genes were selected by using BestKeeper, NormFinder and geNorm softwares. According to BestKeeper, *TrEF1a1* (1st), *TrTBP2* (2nd) and *TrSAND1* (3rd) were most stable genes. Then, after NormFinder analysis, *TrTBP2* (1st), *TrEF1a1* (2nd) and *TrTUB* (3rd) were most stable genes. Finally, according to geNorm, *TrSAND1* (1st), *TrTBP2* (2nd) and *TrEF1a1* (3rd) were most stable genes. Therefore, *TrEF1a1*, *TrTBP2* and *TrSAND1* were chosen as reference genes. Table S3 (supplemented data) shows primers used to perform real-time PCR. *TrMT1B*, *TrCAT5* and *TrAPX1* are up-regulated in plants exposed to Cd20-spiked soils (1.95 fold, $p = 1.97 \cdot 10^{-4}$; 1.75 fold, $p = 3.36 \cdot 10^{-3}$ and 1.56 fold, $p = 1.93 \cdot 10^{-4}$ respectively). *TrGPX7* and *TrCAT5* are down-regulated in plants exposed to Cd10- (2.33 fold, $p = 2.52 \cdot 10^{-4}$) and Cd2.5-spiked soils (4 fold, $p = 3.67 \cdot 10^{-3}$) respectively (Figure 3B).

5) Discussion

In our bibliography survey, 117 studies about oxidative stress in three model organisms exposed either to metal trace elements, aromatic compounds or pesticides were collected.

Most studies (70.4%) focused on levels of activity of oxidative stress defense enzymes as biomarkers of exposure to assess effects of stress induced by contaminants.

As observed from those papers, most biochemical techniques allow measurement of total enzyme activity of a given protein family but do not allow detection of each isoform of this family. For instance, by using enzyme activity analysis, three classes of SODs are well-studied: Cu/ZnSOD, MnSOD and FeSOD. The sensitivity of Cu/ZnSOD to cyanide is used as a diagnostic tool to distinguish Cu/ZnSOD from FeSOD and MnSOD that are unaffected by cyanide. FeSOD is irreversibly inactivated by H₂O₂, whereas MnSOD is resistant to both inhibitors (Martinez *et al.*, 2001; Drążkiewicz *et al.*, 2007). More than 59% of studies assessing levels of activity of defense enzyme as biomarker used at most three protein classes. Usually, a focus is made on a few proteins. Keeping in mind that more than 34 enzymes devoted to oxidative stress defense exist in normal cells, this make difficult interpretations about the whole oxidative stress mechanisms taking place in cells, especially during exposure to xenobiotics. Comparison between experiments used in all studies referenced in this review is a challenge because xenobiotics, doses, matrix, species and times of exposure are very different from a study to another. Nevertheless, as observed from literature, xenobiotic exposures lead to oxidative stress in most organisms and some effectors could allow assessment of such stress (e.g. expression level of *Cd-mt* in *E. fetida*). Moreover, some studies performed measurement on short-term exposed samples. For example, Antunes *et al.* (2008) studied CAT and GPX activities in *E. andrei* exposed to metallic trace elements during 48 hours. Their findings on biomarker data are difficult to explain. However, authors may justify the overall lack of responsiveness due to the fact that the antioxidant defense mechanism depends upon the expression of genes encoding antioxidative enzymes. Since these agents are proteins, it is absolutely necessary to undergo genetic expression at the nucleus. Indeed, metals may induce oxidative toxic damage, causing an increased expression of genes

encoding oxidative stress enzymes like CAT or GPX and damaging cellular lipids, which may not occur after short periods of exposure. In such cases, gene expression quantification using real-time PCR is more than an alternative method to enzyme activity measurements.

The aim of this study is to target at least one candidate per protein family in order to better understand how anti-oxidative mechanism works. By means of molecular biology techniques, we were able to clone missing targets. This work brings new molecular data which will be useful for us and others to explore oxidative stress mechanisms at transcriptional level in three promising models. However, cloning of some effectors may be an issue especially due to the lack of sequences available in databases. For instance, glutathione transferases show relatively low-conserved areas when alignments were performed, consequently it was very difficult to design good quality degenerated primers for cloning. This could be explained by the fact that glutathione transferase family is a diverse family of proteins that drive wide-ranging reactions. However, plants GSTs are easily categorized and well-conserved. The major problem comes from ancestral genetic multiplications driven to many independent genes which are very similar between each other. Sometimes, numerous conserved areas can be found in protein sequence alignments but cloning was still difficult. This is the case for gene encoding FeSOD in *T. repens*. Indeed, we were not able to clone this gene despite obvious observation of relatively conserved areas in protein sequences (data not shown). Absence of cloning might be due to the lack of expression in the studied conditions. According to Ferreira *et al.* (2002), which measured SODs (Cu/ZnSODs, FeSODs and MnSODs) activities, FeSODs activities are not often detected in plants.

As soon as cloning was completed, quantifying expression level of genes encoding antioxidative enzymes using real-time PCR is conceivable. However, cloning does not ensure quantification of expression level of a given target. Indeed, some genes could be very weakly expressed and in this case, gene expression is under the quantification limit of the

thermocycler (e.g.: *TrPCS1*, *TrCSD2*, *TrGR1* in *T. repens* and *BolC.CSD2*, *BolC.GSTT1*, *BolC.GPX7* in *B. oleracea*). On the contrary, although quantified, gene expression level of some target genes may not display statistically significant variations in our experimental, making those gene not relevant for further analysis as biomarkers of exposure (e.g.: *BolC.PCS1*, *BolC.MSD1*, *BolC.FSD3*, *BolC.APX1*, *BolC.tAPX*, *BolC.CAT2* in *B. oleracea*). Quantification of gene expressions using real-time PCR, which is much more specific than an enzyme activity measures, allows quantification of expression of a given enzyme as soon as its nucleotidic sequence is well known. On the contrary, most enzyme activities assessment enable measurement of total enzyme activity of a given protein family, which is less accurate. For example, in *A. thaliana*, three Cu/ZnSOD genes (*ATCSD1*, *ATCSD2* and *ATCSD3*), three FeSOD genes (*ATFSD1*, *ATFSD2* and *ATFSD3*) and two MnSOD genes (*ATMSD1* and *ATMSD2*) have been reported (Kliebenstein *et al.*, 1999; Pan and Chung, 2002). Moreover, molecular analysis (biomarkers of exposure) are the first level of integration of environmental stressor and they are supposed to respond to stressors earlier than biochemical markers (biomarkers / indicators) (Brulle *et al.*, 2011).

Some authors analyzed effectors at those two levels of organization in order to explore oxidative stress in organisms exposed to xenobiotics. For example, Remans *et al.* (2012) grew hydroponically *A. thaliana* seedlings and exposed plants to Zn-contaminated solutions (0, 100, 250 and 500 μ M) during 24 hours. SOD activities and gene expression of *csd1*, *csd2*, *fsd1*, *fsd2* and *fsd3* in *A. thaliana* leaves were measured. SOD activities increased whereas gene expression of *csd1*, *csd2*, *fsd1*, *fsd1* and *fsd3* decreased in leaves. These results support the existence of Zn-specific signal transduction pathways influencing antioxidative responses.

Combination of biochemical and molecular techniques allowed authors to improve understanding of oxidative stress mechanism. For example, if gene expression of a target gene is up-regulated (or down-regulated) and its corresponding enzyme activity is increased (or

decreased), one could conclude that candidate is regulated at transcriptional level. On the contrary, if gene expression of a target gene is up-regulated (or down-regulated) and its corresponding enzyme activity is decreased (or increased), we could conclude that candidate has a post-transcriptional regulation.

6) Conclusion

In this review, an inventory of studies using enzyme activities and/or gene expression as tools to investigate oxidative stress has been done. The aim was to highlight a complementary method to the biochemical techniques enabling measurement of total enzyme activities. Thus, *E. fetida*, *B. oleracea* and *T. repens* were exposed to Cd-spiked soils during 10 days. This experiment allowed (1) to bring new available molecular data, (2) to focus on specific enzymatic isoforms and (3) to explore responses of major antioxidative enzymes at the transcriptional level in 3 different species when exposed to a metallic stress. Gene expression quantification using real-time PCR as diagnostic tool allow to follow a given isoform of a protein family making oxidative stress analysis more accurate and specific. This work has allowed cloning and sequencing of most studied antioxidative enzymes which were previously absent from molecular databases for our model species. Furthermore, it is now possible to assess oxidative stress response at the transcriptional lower level, one of the first level of integration of xenobiotics exposure, enabling identification and analysis of early biomarkers candidates. This kind of analysis is fully complementary to the post-transcriptional biochemical level. The simultaneous use of molecular and biochemical techniques should enhance the understanding of oxidative stress mechanism. Nevertheless, responses to oxidative stress may be different between species for the same protein family (e.g. metallothioneins). Thus, it is important to keep in mind that model species should be used in a

complementary manner in order to better understand the effects of xenobiotics on exposed organisms and to measure a wider range of biological effects (i.e. biomarkers).

Acknowledgments

The present study was supported by a grant from ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) and Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Fabien B. was supported by a doctoral fellowship from ADEME and RégionNord/Pas-de-Calais.

References

- Agarwal, S., 2007. Increased antioxidant activity in *Cassia* seedlings under UV-B radiation. *Biologia Plantarum* 51, 157-160.
- Ahammed, G.J., Wang, M.M., Zhou, Y.H., Xia, X.J., Mao, W.H., Shi, K., Yu, J.Q., 2012. The growth, photosynthesis and antioxidant defense responses of five vegetable crops to phenanthrene stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 132-139.
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., Ørntoft, T.F., 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research* 64, 5245-5250.
- Anderson, R.S., Patel, K.M., Roesijadi, G., 1999. Oyster metallothionein as an oxyradical scavenger: Implications for hemocyte defense responses. *Developmental and Comparative Immunology* 23, 443-449.
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Nunes, B., Pereira, R., Gonçalves, F., 2008. In situ bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 620-631.
- Aravind, P., Prasad, M.N.V., 2003. Zinc alleviates cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* L.: a free floating freshwater macrophyte. *Plant Physiology and Biochemistry* 41, 391-397.
- Arnaud, C., Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Soler, P., Ribera, D., 2000. Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 67-73.
- 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, 622-632.
- Artico, S., Nardeli, S.M., Brilhante, O., Grossi-de-Sa, M.F., Alves-Ferreira, M., 2010. Identification and evaluation of new reference genes in *Gossypium hirsutum* for accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data. *BMC Plant Biology* 10.
- Arzate-Cárdenas, M.A., Martínez-Jerónimo, F., 2012. Energy reserve modification in different age groups of *Daphnia schoedleri* (Anomopoda: Daphniidae) exposed to hexavalent chromium. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 34, 106-116.
- Avsian-Kretchmer, O., Gueta-Dahan, Y., Lev-Yadun, S., Gollop, R., Ben-Hayyim, G., 2004. The salt-stress signal transduction pathway that activates the gpx1 promoter is mediated by intracellular H₂O₂, different from the pathway induced by extracellular H₂O₂. *Plant Physiology* 135, 1685-1696.
- Ayele, M., Haas, B.J., Kumar, N., Wu, H., Xiao, Y., Van Aken, S., Utterback, T.R., Wortman, J.R., White, O.R., Town, C.D., 2005. Whole genome shotgun sequencing of *Brassica*

oleracea and its application to gene discovery and annotation in *Arabidopsis*. *Genome Research* 15, 487-495.

Balestrasse, K.B., Gardey, L., Gallego, S.M., Tomaro, M.L., 2001. Response of antioxidant defence system in soybean nodules and roots subjected to cadmium stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 28, 497-504.

Batish, D.R., Singh, H.P., Setia, N., Kaur, S., Kohli, R.K., 2006. 2-Benzoxazolinone (BOA) induced oxidative stress, lipid peroxidation and changes in some antioxidant enzyme activities in mung bean (*Phaseolus aureus*). *Plant Physiology and Biochemistry* 44, 819-827.

Bernard, F., Brulle, F., Douay, F., Lemièrre, S., Demuynck, S., Vandebulcke, F., 2010. Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in *Eisenia fetida*, using an "exposure/depuration" experimental scheme with field soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1034-1045.

Berthelot, Y., Valton, E., Auroy, A., Trottier, B., Robidoux, P.Y., 2008. Integration of toxicological and chemical tools to assess the bioavailability of metals and energetic compounds in contaminated soils. *Chemosphere* 74, 166-177.

Bhuiyan, M.S.U., Min, S.R., Jeong, W.J., Sultana, S., Choi, K.S., Lee, Y., Liu, J.R., 2011. Overexpression of *AtATM3* in *Brassica juncea* confers enhanced heavy metal tolerance and accumulation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 107, 69-77.

Bidar, G., Garçon, G., Pruvot, C., Dewaele, D., Cazier, F., Douay, F., Shirali, P., 2007. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environmental Pollution* 147, 546-553.

Bidar, G., Pruvot, C., Garçon, G., Verdin, A., Shirali, P., Douay, F., 2009. Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 42-53.

Bigorgne, E., Foucaud, L., Lapied, E., Labille, J., Botta, C., Sirguey, C., Falla, J., Rose, J., Joner, E.J., Rodius, F., Nahmani, J., 2011. Ecotoxicological assessment of TiO₂ byproducts on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 159, 2698-2705.

Bigorgne, E., Foucaud, L., Caillet, C., Giambérini, L., Nahmani, J., Thomas, F., Rodius, F., 2012. Cellular and molecular responses of *E. fetida* coelomocytes exposed to TiO₂ nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* 14.

Bolwell, G.P., Wojtaszek, P., 1997. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence - A broad perspective. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51, 347-366.

Boojar, M.M.A., Goodarzi, F., 2008. Comparative evaluation of oxidative stress status and manganese availability in plants growing on manganese mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 692-699.

- Bouazizi, H., Jouili, H., Geitmann, A., Ferjani, E., 2010. Cupric stress induces oxidative damage marked by accumulation of H₂O₂ and changes to chloroplast ultrastructure in primary leaves of beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Biologica Hungarica* 61, 191-203.
- Brulle, F., 2005. Evaluation des risques engendrés par la présence de métaux polluants: identification de biomarqueurs potentiels chez des invertébrés. Master degree report, University of Lille 1.
- Brulle, F., Mitta, G., Cocquerelle, C., 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., Mitta, G., Leroux, R., Lemièrre, S., Leprêtre, A., Vandebulcke, F., 2007. The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism? *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 144, 334-341.
- Brulle, F., Cocquerelle, C., Mitta, G., Castric, V., Douay, F., Leprêtre, A., Vandebulcke, F., 2008a. Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 1441-1453.
- Brulle, F., Cocquerelle, C., Wamalah, A.N., Morgan, A.J., Kille, P., Leprêtre, A., Vandebulcke, F., 2008b. cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 47-55.
- Brulle, F., Lemièrre, S., Waterlot, C., Douay, F., Vandebulcke, F., 2011. Gene expression analysis of 4 biomarker candidates in *Eisenia fetida* exposed to an environmental metallic trace elements gradient: A microcosm study. *Science of the Total Environment* 409, 5470-5482.
- Brulle, F., Bernard, F., Vandebulcke, F., Cuny, D., Dumez, S., submitted. How to identify suitable real-time PCR reference genes in a dedicated species: Example in leaves of *Brassica oleracea*.
- Brunetti, P., Zanella, L., Proia, A., De Paolis, A., Falasca, G., Altamura, M.M., Sanità di Toppi, L., Costantino, P., Cardarelli, M., 2011. Cadmium tolerance and phytochelatin content of *Arabidopsis* seedlings over-expressing the phytochelatin synthase gene *AtPCS1*. *Journal of Experimental Botany* 62, 5509-5519.
- Bulgakov, V.P., Gorpenchenko, T.Y., Veremeichik, G.N., Shkryl, Y.N., Tchernoded, G.K., Bulgakov, D.V., Aminin, D.L., Zhuravlev, Y.N., 2012. The rolB gene suppresses reactive oxygen species in transformed plant cells through the sustained activation of antioxidant defense. *Plant Physiology* 158, 1371-1381.
- Chandran, D., Sharopova, N., Ivashuta, S., Gantt, J.S., Vandebosch, K.A., Samac, D.A., 2008. Transcriptome profiling identified novel genes associated with aluminum toxicity, resistance and tolerance in *Medicago truncatula*. *Planta* 228, 151-166.

- Chang-Quan, W., Rui-Chang, L., 2008. Enhancement of superoxide dismutase activity in the leaves of white clover (*Trifolium repens* L.) in response to polyethylene glycol-induced water stress. *Acta Physiologiae Plantarum* 30, 841-847.
- Chen, C., Xue, S., Zhou, Q., Xie, X., 2011a. Multilevel ecotoxicity assessment of polycyclic musk in the earthworm *Eisenia fetida* using traditional and molecular endpoints. *Ecotoxicology* 20, 1949-1958.
- Chen, C., Zhou, Q., Liu, S., Xiu, Z., 2011b. Acute toxicity, biochemical and gene expression responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to polycyclic musks. *Chemosphere* 83, 1147-1154.
- Chen, C., Zhou, Q.X., 2012. Lipid peroxidation and gene expression of antioxidant enzymes in response to polycyclic musks in earthworm *Eisenia fetida*, Bali Island, pp. 245-251.
- Chen, L., Guo, Y., Yang, L., Wang, Q., 2008. Synergistic defensive mechanism of phytochelatin and antioxidative enzymes in *Brassica chinensis* L. against Cd stress. *Chinese Science Bulletin* 53, 1503-1511.
- Chen, L., Zhong, H., Kuang, J., Li, J., Lu, W., Chen, J., 2011c. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta* 234, 377-390.
- Chiang, H.C., Lo, J.C., Yeh, K.C., 2006. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: A genomic survey with cDNA microarray. *Environmental Science and Technology* 40, 6792-6798.
- Cho, U.H., Seo, N.H., 2005. Oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Science* 168, 113-120.
- Christensen, O., 1988. The direct effects of earthworms on nitrogen turnover in cultivated soils. *Ecological Bulletins - Swedish Natural Science Research Council* 39, 41-44.
- Colacevich, A., Sierra, M.J., Borghini, F., Millán, R., Sanchez-Hernández, J.C., 2011. Oxidative stress in earthworms short- and long-term exposed to highly Hg-contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials* 194, 135-143.
- Corpas, F.J., Palma, J.M., Del Río, L.A., 1993. Evidence for the presence of proteolytic activity in peroxisomes. *European Journal of Cell Biology* 61, 81-85.
- Cortet, J., Gomot-De Vaufleury, A., Poinot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D., 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology* 35, 115-134.
- Cuypers, A., Karen, S., Jos, R., Kelly, O., Els, K., Tony, R., Nele, H., Nathalie, V., Suzy, V.S., Frank, V.B., Yves, G., Jan, C., Jaco, V., 2011. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Journal of Plant Physiology* 168, 309-316.

- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., Scheible, W.R., 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 139, 5-17.
- Deak, A., Hall, M.H., Sanderson, M.A., Archibald, D.D., 2007. Production and nutritive value of grazed simple and complex forage mixtures. *Agronomy Journal* 99, 814-821.
- Del Río, L.A., Sandalio, L.M., Corpas, F.J., Palma, J.M., Barroso, J.B., 2006. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling. *Plant Physiology* 141, 330-335.
- Dhedra, K., Huggett, J.F., Bustin, S.A., Johnson, M.A., Rook, G., Zumla, A., 2004. Validation of housekeeping genes for normalizing RNA expression in real-time PCR. *BioTechniques* 37, 112-119.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52, 1101-1109.
- Dixon, D.P., Skipsey, M., Edwards, R., 2010. Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry* 71, 338-350.
- Doke, N., 1983. Generation of superoxide anion by potato tuber protoplasts during the hypersensitive response to hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressors of hypersensitivity. *Physiological Plant Pathology* 23, 359-367.
- Doke, N., Ohashi, Y., 1988. Involvement of an O₂ - generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32, 163-175.
- Dong, L., Gao, J., Xie, X., Zhou, Q., 2012. DNA damage and biochemical toxicity of antibiotics in soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 89, 44-51.
- Dorling, S.J., Leung, S., Anderson, C.W.N., Albert, N.W., McManus, M.T., 2011. Changes in 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) oxidase expression and enzyme activity in response to excess manganese in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Physiology and Biochemistry* 49, 1013-1019.
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., Krupa, Z., 2003a. Response of the ascorbate-glutathione cycle to excess copper in *Arabidopsis thaliana* (L.). *Plant Science* 164, 195-202.
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., Wanke, M., Świeżewska, E., 2003b. The activity of antioxidant enzymes in *Arabidopsis thaliana* exposed to colchicine and H₂O₂. *Cellular and Molecular Biology Letters* 8, 777-781.
- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., Krupa, Z., 2004. Copper-induced oxidative stress and antioxidant defence in *Arabidopsis thaliana*. *BioMetals* 17, 379-387.

- Drażkiewicz, M., Skórzyńska-Polit, E., Krupa, Z., 2007. The redox state and activity of superoxide dismutase classes in *Arabidopsis thaliana* under cadmium or copper stress. *Chemosphere* 67, 188-193.
- Edwards, C.A., Lofty, J.R., 1977. *Biology of Earthworms*. Chapman and Hall, New York (1977) p. 333
- Edwards, C.A., 1988. Breakdown of animal, vegetable and industrial organic wastes by earthworm. C.A. Edwards, E.F. Neuhauser (Eds.), *Earthworms in Waste and Environmental Management*, SPB, The Hague (1988), pp. 21–31.
- Edwards, C.A., Bohlen, P.J., 1996. *Biology and ecology of earthworms*. Third edition. *Biology and ecology of earthworms*. Third edition.
- Edwards, C.A., 1998. The Use of Earthworms in the Breakdown and Management of Organic Wastes. In Edwards, C.A. (Ed.). *Earthworm Ecology* ; CRC Press, Boca Raton, FL, USA, pp: 327-354.
- Ellison, N.W., White, D.W.R., 1996. Isolation of two cDNA clones encoding metallothionein-like proteins from *Trifolium repens* L. *Plant Physiology*. 112, 446-446.
- Eyidogan, F., Öz, M.T., 2007. Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 29, 485-493.
- Faheed, F.A., 2008. The effect of aluminium on oxidative stress-related enzyme activity in two clover species. *Turkish Journal of Botany* 32, 345-352.
- Forster, J.W., Panter, S., Mouradov, A., Mason, J., Spangenberg, G.C., 2013. Transgenic technologies for enhanced molecular breeding of white clover (*Trifolium repens* L.). *Crop and Pasture Science* 64, 26-38.
- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* 17, 1866-1875.
- Gaete, H., Hidalgo, M.E., Neaman, A., Ávila, G., 2010. Assessment of copper toxicity in soils using biomarkers of oxidative stress in *Eisenia foetida*. Evaluación de la toxicidad de cobre en suelos a través de biomarcadores de estrés oxidativo en *Eisenia foetida* 33, 566-570.
- Gill, S.S., Tuteja, N., 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 909-930.
- Ginzinger, D.G., 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream. *Experimental Hematology* 30, 503-512.
- Gomes, T., Pereira, C.G., Cardoso, C., Pinheiro, J.P., Cancio, I., Bebianno, M.J., 2012. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology* 118-119, 72-79.

- Goupil, P., Souguir, D., Ferjani, E., Faure, O., Hitmi, A., Ledoigt, G., 2009. Expression of stress-related genes in tomato plants exposed to arsenic and chromium in nutrient solution. *Journal of Plant Physiology* 166, 1446-1452.
- Gupta, S.K., Sundararaman, V., 1991. Correlation between burrowing capability and AChE activity in the earthworm, *Pheretima posthuma*, on exposure to carbaryl. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 46, 859-865.
- Hackenberger, B.K., Velki, M., Stepić, S., Hackenberger, D.K., 2012. The effect of formalin on acetylcholinesterase and catalase activities, and on the concentration of oximes, in the earthworm species *Eisenia andrei*. *European Journal of Soil Biology* 50, 137-143.
- Hajiboland, R., Amjad, L., 2007. Does antioxidant capacity of leaves play a role in growth response to selenium at different sulfur nutritional status? *Plant, Soil and Environment* 53, 207-215.
- Harmoney, K.R., Moore, K.J., Brummer, E.C., Lee Burras, C., George, J.R., 2001. Spatial legume composition and diversity across seeded landscapes. *Agronomy Journal* 93, 992-1000.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M., 2012. Exogenous selenium pretreatment protects rapeseed seedlings from cadmium-induced oxidative stress by upregulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Biological Trace Element Research* 149, 248-261.
- Hellemans, J., Mortier, G., De Paepe, A., Speleman, F., Vandesompele, J., 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biology* 8.
- Hernández, J.A., Almansa, M.S., Del Río, L., Sevilla, F., 1993. Effect of salinity on metalloenzymes of oxygen metabolism in two leguminous plants. *Journal of Plant Nutrition* 16, 2539-2554.
- Hsu, Y.T., Kao, C.H., 2004. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regulation* 42, 227-238.
- Höckner, M., Stefanon, K., Schuler, D., Fantur, R., de Vauflery, A., Dallinger, R., 2009. Coping with Cadmium Exposure in Various Ways: The two helioid snails *Helix pomatia* and *Cantareus aspersus* share the metal transcription factor-2, but differ in promoter organization and transcription of their Cd-metallothionein genes. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 311, 776-787.
- Hønsi, T.G., Hoel, L., Stenersen, J.V., 1999. Non-inducibility of antioxidant enzymes in the earthworms *Eisenia veneta* and *E. fetida* after exposure to heavy metals and paraquat. *Pedobiologia* 43, 652-657.
- Iannelli, M.A., Pietrini, F., Fiore, L., Petrilli, L., Massacci, A., 2002. Antioxidant response to cadmium in *Phragmites australis* plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40, 977-982.

- John, R., Ahmad, P., Gadgil, K., Sharma, S., 2009. Cadmium and lead-induced changes in lipid peroxidation, antioxidative enzymes and metal accumulation in *Brassica juncea* L. at three different growth stages. *Archives of Agronomy and Soil Science* 55, 395-405.
- Kamata, H., Hirata, H., 1999. Redox regulation of cellular signalling. *Cellular Signalling* 11, 1-14.
- Kautenburger, R., 2006. Genetic structure among earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) from different sampling sites in western Germany based on random amplified polymorphic DNA. *Pedobiologia* 50, 257-266.
- Khan, N.A., Singh, S., Nazar, R., 2007. Activities of Antioxidative Enzymes, Sulphur Assimilation, Photosynthetic Activity and Growth of Wheat (*Triticum aestivum*) Cultivars Differing in Yield Potential Under Cadmium Stress. *Journal of Agronomy and Crop Science* 193, 435-444.
- Kliebenstein, D.J., Dietrich, R.A., Martin, A.C., Last, R.L., Dangl, J.L., 1999. *LSD1* regulates salicylic acid induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12, 1022-1026.
- Kouzaki, H., O'Grady, S.M., Lawrence, C.B., Kita, H., 2009. Proteases induce production of thymic stromal lymphopoietin by airway epithelial cells through protease-activated receptor-2. *Journal of Immunology* 183, 1427-1434.
- Koči, J., Šimo, L., Park, Y., 2013. Validation of internal reference genes for real-time quantitative polymerase chain reaction studies in the tick, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 50, 79-84.
- Kumari, M., Taylor, G.J., Deyholos, M.K., 2008. Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 279, 339-357.
- Kusznierewicz, B., Baczek-Kwinta, R., Bartoszek, A., Piekarska, A., Huk, A., Manikowska, A., Antonkiewicz, J., Namieśnik, J., Konieczka, P., 2012. The dose-dependent influence of zinc and cadmium contamination of soil on their uptake and glucosinolate content in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 2482-2489.
- Labrot, F., Ribera, D., Saint Denis, M., Narbonne, J.F., 1996. In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: Lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1, 21-28.
- Laloi, C., Stachowiak, M., Pers-Kamczyc, E., Warzych, E., Murgia, I., Apel, K., 2007. Cross-talk between singlet oxygen- and hydrogen peroxide-dependent signaling of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 672-677.
- Łaszczycza, P., Augustyniak, M., Babczyńska, A., Bednarska, K., Kafel, A., Migula, P., Wilczek, G., Witas, I., 2004. Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environment International* 30, 901-910.

Lavelle, P., Spain, A.V. (2001). Soil Ecology, Dordrecht, Netherlands, Kluwer Academic Publishers.

Leisinger, U., Rüfenacht, K., Fischer, B., Pesaro, M., Spengler, A., Zehnder, A.J.B., Eggen, R.I.L., 2001. The glutathione peroxidase homologous gene from *Chlamydomonas reinhardtii* is transcriptionally up-regulated by singlet oxygen. *Plant Molecular Biology* 46, 395-408.

Lemiere, S., Cossu-Leguille, C., Charissou, A.M., Vasseur, P., 2005. DNA damage (comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Biomarkers* 10, 41-57.

Li, D., Hockaday, W.C., Masiello, C.A., Alvarez, P.J.J., 2011a. Earthworm avoidance of biochar can be mitigated by wetting. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 1732-1737.

Li, L.Z., Zhou, D.M., Peijnenburg, W.J.G.M., van Gestel, C.A.M., Jin, S.Y., Wang, Y.J., Wang, P., 2011b. Toxicity of zinc oxide nanoparticles in the earthworm, *Eisenia fetida* and subcellular fractionation of Zn. *Environment International* 37, 1098-1104.

Li, W.J., Feng, H., Fan, J.H., Zhang, R.Q., Zhao, N.M., Liu, J.Y., 2000. Molecular cloning and expression of a phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa*. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression* 1493, 225-230.

Li, X.Y., Luo, Y.R., Yun, M.X., Wang, J., Wang, J.J., 2010. Effects of 1-methyl-3-octylimidazolium bromide on the anti-oxidant system of earthworm. *Chemosphere* 78, 853-858.

Liang, S.H., Chen, S.C., Chen, C.Y., Kao, C.M., Yang, J.I., Shieh, B.S., Chen, J.H., Chen, C.C., 2011. Cadmium-induced earthworm metallothionein-2 is associated with metal accumulation and counteracts oxidative stress. *Pedobiologia* 54, 333-340.

Lin, A.J., Zhang, X.Y., Chen, M.M., Cao, Q., 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Sciences*. 19, 596-602.

Lin, D., Zhou, Q., Xie, X., Liu, Y., 2010. Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere* 81, 1328-1333.

Lin, D., Xie, X., Zhou, Q., Liu, Y., 2012a. Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests. *Environmental Toxicology* 27, 385-392.

Lin, D., Zhou, Q., Xu, Y., Chen, C., Li, Y., 2012b. Physiological and molecular responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to soil chlortetracycline contamination. *Environmental Pollution* 171, 46-51.

Liu, S., Zhou, Q., Wang, Y., 2011. Ecotoxicological responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to soil contaminated with HHCB. *Chemosphere* 83, 1080-1086.

- Liu, S., Zhou, Q., Chen, C., 2012. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in earthworm *Eisenia fetida* exposed to 1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta- γ -2-benzopyran. *Environmental Toxicology* 27, 472-479.
- Liu, Y., Zhou, Q., Xie, X., Lin, D., Dong, L., 2010. Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene. *Ecotoxicology* 19, 1551-1559.
- Lopez-Pardo, R., Ruiz de Galarreta, J.I., Ritter, E., 2013. Selection of housekeeping genes for qRT-PCR analysis in potato tubers under cold stress. *Molecular Breeding* 31, 39-45.
- Lushchak, V.I., 2011. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquatic Toxicology* 101, 13-30.
- Maksymiec, W., Krupa, Z., 2006. The effects of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* 57, 187-194.
- Manier, N., Deram, A., Broos, K., Denayer, F.O., Wan Haluwyn, C., 2009. White clover modulation index in heavy metal contaminated soils- A potential bioindicator. *Journal of Environmental Quality* 38, 685-692.
- Manier, N., Brulle, F., Le Curieux, F., Vandebulcke, F., Deram, A., 2012. Biomarker measurements in *Trifolium repens* and *Eisenia fetida* to assess the toxicity of soil contaminated with landfill leachate: A microcosm study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80, 339-348.
- Martinez, C.A., Loureiro, M.E., Oliva, M.A., Maestri, M., 2001. Differential responses of superoxide dismutase in freezing resistant *Solanum curtilobum* and freezing sensitive *Solanum tuberosum* subjected to oxidative and water stress. *Plant Science* 160, 505-515.
- Martí, M.C., Camejo, D., Fernández-García, N., Rellán-Álvarez, R., Marques, S., Sevilla, F., Jiménez, A., 2009. Effect of oil refinery sludges on the growth and antioxidant system of alfalfa plants. *Journal of Hazardous Materials* 171, 879-885.
- Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., Bergmann, H., 2002. Arsenate toxicity: Effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science* 163, 961-969.
- Matés, J.M., Pérez-Gómez, C., De Castro, I.N., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32, 595-603.
- Mauriz, O., Maneiro, V., Pérez-Parallé, M.L., Sánchez, J.L., Pazos, A.J., 2012. Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies on the gonad of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. *Aquaculture* 370-371, 158-165.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F., 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science* 9, 490-498.

- Mobin, M., Khan, N.A., 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* 164, 601-610.
- Mohamed, A.A., Castagna, A., Ranieri, A., Sanità di Toppi, L., 2012. Cadmium tolerance in *Brassica juncea* roots and shoots is affected by antioxidant status and phytochelatin biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry* 57, 15-22.
- Mohan, B.S., Hosetti, B.B., 1997. Potential phytotoxicity of lead and cadmium to *Lemna minor* grown in sewage stabilization ponds. *Environmental Pollution* 98, 233-238.
- Montalbini, P., 1992. Ureides and enzymes of ureide synthesis in wheat seeds and leaves and effect of allopurinol on *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* infection. *Plant Science* 87, 225-231.
- Moons, A., 2003. *Osgtu3* and *osgtu4*, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS Letters* 553, 427-432.
- Moudouma, C., Gloaguen, V., Riou, C., Forestier, L., Saladin, G., 2012. High concentration of cadmium induces *AtPCS2* gene expression in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ecotype Wassilewskija seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 1083-1091.
- Murgia, I., Tarantino, D., Vannini, C., Bracale, M., Carravieri, S., Soave, C., 2004. *Arabidopsis thaliana* plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to Paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death. *The Plant Journal* 38, 940-953.
- Nakamori, T., Fujimori, A., Kinoshita, K., Ban-nai, T., Kubota, Y., Yoshida, S., 2010. mRNA expression of a cadmium-responsive gene is a sensitive biomarker of cadmium exposure in the soil collembolan *Folsomia candida*. *Environmental Pollution* 158, 1689-1695.
- Navascués, J., Pérez-Rontomé, C., Sánchez, D.H., Staudinger, C., Wienkoop, S., Rellán Álvarez, R., Becana, M., 2012. Oxidative stress is a consequence, not a cause, of aluminum toxicity in the forage legume *Lotus corniculatus*. *New Phytologist* 193, 625-636.
- Navrot, N., Rouhier, N., Gelhaye, E., Jacquot, J.P., 2007. Reactive oxygen species generation and antioxidant systems in plant mitochondria. *Physiologia Plantarum* 129, 185-195.
- Noriega, G., Balestrasse, K., Batlle, A., Tomaro, M., 2007. Cadmium induced oxidative stress in soybean plants also by the accumulation of δ -aminolevulinic acid. *BioMetals* 20, 841-851.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 1984a. OECD guideline for testing chemicals. Section 2: effects on biotic systems, Method, 207, Earthworm, acute toxicity tests, Paris, France, 207 pp.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 1984b. Terrestrial plants, growth test. Guidelines for Testing of Chemicals, OECD, N# 208, Paris.
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2007. OECD Annual Report 2007. OECD Publishing, 131 pp.

- Opdenakker, K., Remans, T., Keunen, E., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2012. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAPKinase transcript levels. *Environmental and Experimental Botany* 83, 53-61.
- Pan, S.-M., Chung, M.-H., 2002. The character of manganese superoxide dismutases in *Arabidopsis*. Submitted (SEP-2002) to the EMBL/GenBank/DDBJ databases.
- Pan, Y., Wu, L.J., Yu, Z.L., 2006. Effect of salt and drought stress on antioxidant enzymes activities and SOD isoenzymes of liquorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch). *Plant Growth Regulation* 49, 157-165.
- Panda, S.K., Matsumoto, H., 2010. Changes in antioxidant gene expression and induction of oxidative stress in pea (*Pisum sativum* L.) under Al stress. *BioMetals* 23, 753-762.
- Pandey, V., Dixit, V., Shyam, R., 2005. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. *Pusa Jaikisan*) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere* 61, 40-47.
- Paoletti, M.G., 1999. The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 74, 137-155.
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research* 30.
- Pfaffl, M.W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T.P., 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper - Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters* 26, 509-515.
- Phang, I.C., Leung, D.W.M., Taylor, H.H., Burritt, D.J., 2011. The protective effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment on *Arabidopsis thaliana* seedlings exposed to toxic level of Pb is not linked to avoidance of Pb uptake. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 1310-1315.
- Pinto, A.P., Alves, A.S., Candeias, A.J., Cardoso, A.I., de Varennes, A., Martins, L.L., Mourato, M.P., Gonçalves, M.L.S., Mota, A.M., 2009. Cadmium accumulation and antioxidative defences in *Brassica juncea* L. Czern, *Nicotiana tabacum* L. and *Solanum nigrum* L. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 89, 661-676.
- Pirooznia, M., Gong, P., Guan, X., Inouye, L.S., Yang, K., Perkins, E.J., Deng, Y., 2007. Cloning, analysis and functional annotation of expressed sequence tags from the Earthworm *Eisenia fetida*. *BMC Bioinformatics*. 8.
- Posmyk, M.M., Kontek, R., Janas, K.M., 2009. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 596-602.
- Puckett, E.E., Serapiglia, M.J., DeLeon, A.M., Long, S., Minocha, R., Smart, L.B., 2012. Differential expression of genes encoding phosphate transporters contributes to arsenic

tolerance and accumulation in shrub willow (*Salix spp.*). *Environmental and Experimental Botany* 75, 248-257.

Radetski, C.M., Cotelle, S., Féraud, J.F., 2000. Classical and biochemical endpoints in the evaluation of phytotoxic effects caused by the herbicide trichloroacetate. *Environmental and Experimental Botany* 44, 221-229.

Ramel, F., Sulmon, C., Cabello-Hurtado, F., Taconnat, L., Martin-Magniette, M.L., Renou, J.P., El Amrani, A., Couée, I., Gouesbet, G., 2007. Genome-wide interacting effects of sucrose and herbicide-mediated stress in *Arabidopsis thaliana*: Novel insights into atrazine toxicity and sucrose-induced tolerance. *BMC Genomics* 8.

Remans, T., Opdenakker, K., Guisez, Y., Carleer, R., Schat, H., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2012. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature. *Environmental and Experimental Botany* 84, 61-71.

Ribera, D., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Saint-Denis, M., 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1123-1130.

Rodrigues Ferreira, R., Francisco Fornazier, R., Pierre Vitória, A., Lea, P.J., Antunes Azevedo, R., 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. *Journal of Plant Nutrition* 25, 327-342.

Rodríguez-Serrano, M., Romero-Puertas, M.C., Zabalza, A.N.A., Corpas, F.J., Gómez, M., Del Río, L.A., Sandalio, L.M., 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant, Cell and Environment* 29, 1532-1544.

Russo, M., Sgherri, C., Izzo, R., Navari-Izzo, F., 2008. *Brassica napus* subjected to copper excess: Phospholipases C and D and glutathione system in signalling. *Environmental and Experimental Botany* 62, 238-246.

Römbke, J., Jänsch, S., Didden, W., 2005. The use of earthworms in ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62, 249-265.

Rozen, S., Skaletsky, H., 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. and Misener, S. (eds.), *Bioinformatics Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 365–386.

Rzepka, M.A., 2007. Mécanismes d'accumulation et de toxicité des composés organiques volatils chez les végétaux supérieurs. PhD degree report, University of Lille 2.

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., Narbonne, J.F., Arnaud, C., Ribera, D., 2001. Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: effects of lead acetate. *Soil Biology and Biochemistry* 33, 395-404.

- Sanchez-Hernández, J.C., 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment, pp. 85-126.
- Sanderson, M.A., Soder, K.J., Muller, L.D., Klement, K.D., Skinner, R.H., Goslee, S.C., 2005. Forage mixture productivity and botanical composition in pastures grazed by dairy cattle. *Agronomy Journal* 97, 1465-1471.
- Sanderson, M.A., Brink, G., Ruth, L., Stout, R., 2012. Grass-legume mixtures suppress weeds during establishment better than monocultures. *Agronomy Journal* 104, 36-42.
- Sawbridge, T., Ong, E.K., Binnion, C., Emmerling, M., Meath, K., Nunan, K., O'Neill, M., O'Toole, F., Simmonds, J., Wearne, K., Winkworth, A., Spangenberg, G., 2003. Generation and analysis of expressed sequence tags in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Science* 165, 1077-1087.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., 2000. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: Validation by real-time, quantitative RT-PCR. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 46, 69-81.
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., Treilhou, M., 2008. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere* 71, 1832-1839.
- Seeber, J., Seeber, G.U.H., Kössler, W., Langel, R., Scheu, S., Meyer, E., 2005. Abundance and trophic structure of macro-decomposers on alpine pastureland (Central Alps, Tyrol): Effects of abandonment of pasturing. *Pedobiologia* 49, 221-228.
- Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., Van Belleghem, F., Horemans, N., Schat, H., Vangronsveld, J., 2007. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: Glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum* 129, 519-528.
- Seth, C.S., Kumar Chaturvedi, P., Misra, V., 2008. The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 76-85.
- Shahandeh, H., Hossner, L.R., 2002. Role of soil properties in phytoaccumulation of uranium. *Water, Air, and Soil Pollution* 141, 165-180.
- Shiyab, S., Chen, J., Han, F.X., Monts, D.L., Matta, F.B., Gu, M., Su, Y., Masad, M.A., 2009. Mercury-induced oxidative stress in Indian mustard (*Brassica juncea* L.). *Environmental Toxicology* 24, 462-471.
- Singh, H.P., Kaur, G., Batish, D.R., Kohli, R.K., 2011. Lead (Pb)-inhibited radicle emergence in *Brassica campestris* involves alterations in starch-metabolizing enzymes. *Biological Trace Element Research* 144, 1295-1301.
- Singh, J., Pillai, K. S., 1973. The world beneath us *Science Reporter* (July) (1973), pp. 318–321.

- Singh, S., Khan, N.A., Nazar, R., Anjum, N.A., 2008. Photosynthetic traits and activities of antioxidant enzymes in blackgram (*Vigna mungo* L. Hepper) under cadmium stress. *American Journal of Plant Physiology* 3, 25-32.
- Singh, S., Singh, S., Ramachandran, V., Eapen, S., 2010. Copper tolerance and response of antioxidative enzymes in axenically grown *Brassica juncea* (L.) plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1975-1981.
- Sinha, S., Sinam, G., Mishra, R.K., Mallick, S., 2010. Metal accumulation, growth, antioxidants and oil yield of *Brassica juncea* L. exposed to different metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1352-1361.
- Skipsey, M., Knight, K.M., Brazier-Hicks, M., Dixon, D.P., Steel, P.G., Edwards, R., 2011. Xenobiotic responsiveness of *Arabidopsis thaliana* to a chemical series derived from a herbicide safener. *Journal of Biological Chemistry* 286, 32268-32276.
- Skórzyńska-Polit, E., Drążkiewicz, M., Krupa, Z., 2004. The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 47, 71-78.
- Smeets, K., Opdenakker, K., Remans, T., Van Sanden, S., Van Belleghem, F., Semane, B., Horemans, N., Guisez, Y., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2009. Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. *Journal of Plant Physiology* 166, 1982-1992.
- Smeets, K., Ruytinx, J., Semane, B., Van Belleghem, F., Remans, T., Van Sanden, S., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2008. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* 63, 1-8.
- Sobrino-Plata, J., Ortega-Villasante, C., Laura Flores-Cáceres, M., Escobar, C., Del Campo, F.F., Hernández, L.E., 2009. Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere* 77, 946-954.
- 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 foetida*) induced by atrazine. *Soil Biology and Biochemistry* 41, 905-909.
- 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., Stürzenbaum, S.R., Svendsen, C., Hankard, P.K., Morgan, A.J., Weeks, J.M., Kille, P., 2004. Toxicological, cellular and gene expression responses in earthworms exposed to copper and cadmium. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 138, 11-21.
- Stenersen, J., 1979. Action of pesticides on earthworms. Part I: The toxicity of cholinesterase inhibiting insecticides to earthworms as evaluated by laboratory tests. *Pesticide Science* 10, 66-74.

- Stenersen, J., Brekke, E., Engelstad, F., 1992. Earthworms for toxicity testing; species differences in response towards cholinesterase inhibiting insecticides. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 1761-1764.
- Stürzenbaum, S.R., Georgiev, O., Morgan, A.J., Kille, P., 2004. Cadmium detoxification in earthworms: From genes to cells. *Environmental Science and Technology* 38, 6283-6289.
- Suzuki, N., Mittler, R., 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* 126, 45-51.
- Szöllősi, R., Varga, I.S., Erdei, L., Mihalik, E., 2009. Cadmium-induced oxidative stress and antioxidative mechanisms in germinating Indian mustard (*Brassica juncea* L.) seeds. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 1337-1342.
- Teisseire, H., Couderchet, M., Vernet, G., 1998. Toxic responses and catalase activity of *Lemna minor* L. exposed to folpet, copper, and their combination. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 40, 194-200.
- Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A., Heinen, E., 1999. Housekeeping genes as internal standards: Use and limits. *Journal of Biotechnology* 75, 291-295.
- Tong, Z., Gao, Z., Wang, F., Zhou, J., Zhang, Z., 2009. Selection of reliable reference genes for gene expression studies in peach using real-time PCR. *BMC Molecular Biology* 10.
- Tsyusko, O.V., Hardas, S.S., Shoults-Wilson, W.A., Starnes, C.P., Joice, G., Butterfield, D.A., Unrine, J.M., 2012. Short-term molecular-level effects of silver nanoparticle exposure on the earthworm, *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution* 171, 249-255.
- Unrine, J.M., Tsyusko, O.V., Hunyadi, S.E., Judy, J.D., Bertsch, P.M., 2010. Effects of particle size on chemical speciation and bioavailability of copper to earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to copper nanoparticles. *Journal of Environmental Quality* 39, 1942-1953.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F., 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3.
- Vandesompele, J., Kubista, M., Pfaffl, M.W., 2009. Reference Gene Validation Software for Improved Normalization. In *Real-time PCR: current technology and applications*. Volume 47. Edited by Logan J, Edwards K, Saunders N. Norfolk, UK: Caister Academic Press; 2009::64.
- Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Opdenakker, K., Remans, T., Smeets, K., Martinez Bello, D., Van Hees, M., Wannijn, J., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2009. Induction of oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana* following uranium exposure. *Radioprotection* 44, 191-196.
- Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Horemans, N., Wannijn, J., Bujanic, A., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2010a. Study of oxidative stress related responses induced in *Arabidopsis thaliana* following mixed exposure to uranium and cadmium. *Plant Physiology and Biochemistry* 48, 879-886.

- Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Horemans, N., Wannijn, J., Van Hees, M., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2010b. The combined effect of uranium and gamma radiation on biological responses and oxidative stress induced in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Environmental Radioactivity* 101, 923-930.
- Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Horemans, N., Remans, T., Opdenakker, K., Smeets, K., Bello, D.M., Wannijn, J., Van Hees, M., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2011a. Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Part I: Responses in the roots. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 630-637.
- Vanhoudt, N., Cuypers, A., Horemans, N., Remans, T., Opdenakker, K., Smeets, K., Bello, D.M., Havaux, M., Wannijn, J., Van Hees, M., Vangronsveld, J., Vandenhove, H., 2011b. Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Part II: Responses in the leaves and general conclusions. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 638-645.
- VDI, Verein Deutscher Ingenieure, 2000. Biologische Messverfahren zur Ermittlung und Beurteilung der Wirkung von Luftverunreinigungen auf Pflanzen (Bioindikation). Verfahren der standardisierten Exposition von Grünkohl. – Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Standardised exposure of green cabbage. VDI-Guideline 3957 Part 3.
- Verma, K., Shekhawat, G.S., Sharma, A., Mehta, S.K., Sharma, V., 2008. Cadmium induced oxidative stress and changes in soluble and ionically bound cell wall peroxidase activities in roots of seedling and 3-4 leaf stage plants of *Brassica juncea* (L.) czern. *Plant Cell Reports* 27, 1261-1269.
- Ville, P., Roch, P., Cooper, E.L., Narbonne, J.F., 1997. Immuno-modulator effects of carbaryl and 2,4 D in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 32, 291-297.
- Wang, C.Q., Zhang, Y.F., Zhang, Y.B., 2008. Scavenger enzyme activities in subcellular fractions of white clover (*Trifolium repens* L.) under PEG-induced water stress. *Journal of Plant Growth Regulation* 27, 387-393.
- Wang, C.Q., Song, H., 2009. Calcium protects *Trifolium repens* L. seedlings against cadmium stress. *Plant Cell Reports* 28, 1341-1349.
- Wang, T., Liang, Z.A., Sandford, A.J., Xiong, X.Y., Yang, Y.Y., Ji, Y.L., He, J.Q., 2012. Selection of Suitable Housekeeping Genes for Real-Time Quantitative PCR in CD4+ Lymphocytes from Asthmatics with or without Depression. *PLoS ONE* 7.
- Weisman, D., Alkio, M., Colón-Carmona, A., 2010. Transcriptional responses to polycyclic aromatic hydrocarbon-induced stress in *Arabidopsis thaliana* reveal the involvement of hormone and defense signaling pathways. *BMC Plant Biology* 10.
- Xie, X., Wu, Y., Zhu, M., Zhang, Y.K., Wang, X., 2011. Hydroxyl radical generation and oxidative stress in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to decabromodiphenyl ether (BDE-209). *Ecotoxicology* 20, 993-999.

- Xiong, W., Bai, L., Muhammad, R.U.H., Zou, M., Sun, Y., 2012. Molecular cloning, characterization of copper/zinc superoxide dismutase and expression analysis of stress-responsive genes from *Eisenia fetida* against dietary zinc oxide. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 155, 416-422.
- Xue, Y., Gu, X., Wang, X., Sun, C., Xu, X., Sun, J., Zhang, B., 2009. The hydroxyl radical generation and oxidative stress for the earthworm *Eisenia fetida* exposed to tetrabromobisphenol A. *Ecotoxicology* 18, 693-699.
- Yang, Y., Han, C., Liu, Q., Lin, B., Wang, J., 2008. Effect of drought and low light on growth and enzymatic antioxidant system of *Picea asperata* seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 30, 433-440.
- Yu, Q., Hou, S., Feltus, F.A., Jones, M.R., Murray, J.E., Veatch, O., Lemke, C., Saw, J.H., Moore, R.C., Thimmapuram, J., Liu, L., Moore, P.H., Alam, M., Jiang, J., Paterson, A.H., Ming, R., 2008. Low X/Y divergence in four pairs of papaya sex-linked genes. *Plant Journal* 53, 124-132.
- Zaimoglu, Z., Koksall, N., Basci, N., Kesici, M., Gulen, H., Budak, F., 2011. Antioxidative enzyme activities in *Brassica juncea* L. and *Brassica oleracea* L. plants under chromium stress. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 9, 676-679.
- Zhang, Q., Zhu, L., Wang, J., Xie, H., Han, Y., Yang, J., 2012. Oxidative stress and lipid peroxidation in the earthworm *Eisenia fetida* induced by low doses of fomesafen. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-8.
- Zhang, W., Song, Y., Liu, M., Sun, T., 2009a. Effects of Benzo (a) pyrene on cytochrome P450 and antioxidant enzymes in earthworms. *Liaoning Gongcheng Jishu Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban)/Journal of Liaoning Technical University (Natural Science Edition)* 28, 846-848.
- Zhang, X., Lu, Y., Shi, Y., Chen, C., Yang, Z., Li, Y., Feng, Y., 2009b. Antioxidant and metabolic responses induced by cadmium and pyrene in the earthworm *Eisenia fetida* in two different systems: Contact and soil tests. *Chemistry and Ecology* 25, 205-215.
- Zheng, G., Lv, H.P., Gao, S., Wang, S.R., 2010. Effects of cadmium on growth and antioxidant responses in *Glycyrrhiza uralensis* seedlings. *Plant, Soil and Environment* 56, 508-515.
- Zhou, Z.S., Huang, S.Q., Guo, K., Mehta, S.K., Zhang, P.C., Yang, Z.M., 2007. Metabolic adaptations to mercury-induced oxidative stress in roots of *Medicago sativa* L. *Journal of Inorganic Biochemistry* 101, 1-9.
- Zhou, Z.S., Wang, S.J., Yang, Z.M., 2008. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Chemosphere* 70, 1500-1509.
- Zhou, Z.S., Guo, K., Elbaz, A.A., Yang, Z.M., 2009. Salicylic acid alleviates mercury toxicity by preventing oxidative stress in roots of *Medicago sativa*. *Environmental and Experimental Botany* 65, 27-34.

Zhu, X., Li, X., Chen, W., Chen, J., Lu, W., Chen, L., Fu, D., 2012. Evaluation of New Reference Genes in Papaya for Accurate Transcript Normalization under Different Experimental Conditions. PLoS ONE 7.

Figures and tables

Figure 1: A) Localization of major proteins involved in ROS scavenging in *E. fetida*. B) Relative fold expression and *p*-values in *E. fetida* exposed to each Cd-spiked soils during 10 days.

Abbreviations: $O_2^{\cdot-}$: superoxide radical, H_2O_2 : hydrogen peroxide, $\bullet OH$: hydroxyl radical, 1O_2 : singlet oxygen, H_2O : water, O_2 : dioxygen, **MnSOD**: manganese superoxide dismutase, **CAT**: catalase, **GPX**: glutathione peroxidase, **DHA**: dehydroascorbate, **ASC**: ascorbate, **GLR**: glutaredoxin, **GSH**: reduced glutathione, **GSSG**: oxidized glutathione, **GR**: glutathione reductase, **NADP(H)**: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, **IM**: inner membrane, **IMS**: IM space, **CuZnSOD**: copper/zinc superoxide dismutase, **G6PD**: glucose-6-phosphate dehydrogenase, **POX**: peroxidase, **FR**: Fenton reaction, **GSTP**: pi glutathione transferase, **PC**: phytochelatin, **PCS**: PC synthase, **Cd-MT**: cadmium-metallothionein.

Figure 2: A) Localization of major proteins involved in ROS scavenging in *B. oleracea* (adapted from Mittler *et al.*, 2004). B) Relative fold expression and *p*-values in *B. oleracea* exposed to each Cd-spiked soils during 10 days.

Abbreviations: **PSI**: photosystem I, **PSII**: photosystem II, **AOX**: amine oxidase, **NADP(H)**: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, **FD**: ferredoxin, **FNR**: FD NADP reductase, **ASC**: ascorbate, **DHA**: dehydroascorbate, **DHAR**: DHA reductase, **MDA**: monodehydroascorbate, **MDAR**: MDA reductase, **CSD2**: copper/zinc superoxide dismutase 2, **MSD1**: manganese superoxide dismutase 1, **FSD3**: iron superoxide dismutase 3, **tAPX**: thylakoidal bound ascorbate peroxidase, **s-APX**: stromal ascorbate peroxidase, **APX1**: cytosolic ascorbate peroxidase, **PrxR**: peroxiredoxin, **Trx**: thioredoxin, **GLR**: glutaredoxin, H_2O : water, O_2 : dioxygen, $O_2^{\cdot-}$: superoxide radical, H_2O_2 : hydrogen peroxide, e^- : electron, **GSH**: reduced glutathione, **GSSG**: oxidized glutathione, **GR1**: cytosolic glutathione reductase, **GR2**: chloroplastic glutathione reductase, **GPX7**: glutathione peroxidase 7, **GST**: glutathione transferase, **GSTF2**: phi 2 GST, **GSTU19**: tau 19 GST, **GSTU5**: tau 5 GST, **GSTT1**: theta 1 GST, **GSTZ1**: zeta 1 GST, **PRXCB**: peroxidase CB, **CAT2**: catalase 2, **IM**: inner membrane, **IMS**: IM space, **MT1C**: metallothionein 1C, **PC**: phytochelatin, **PCS1**: PC synthase 1.

Figure 3: A) Localization of major proteins involved in ROS scavenging in *T. repens* (adpted from Mittler *et al.*, 2004). B) Relative fold expression and *p*-values in *T. repens* exposed to each Cd-spiked soils during 10 days.

Abbreviations: **PSI**: photosystem I, **PSII**: photosystem II, **AOX**: amine oxidase, **NADP(H)**: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, **FD**: ferredoxin, **FNR**: FD NADP reductase, **ASC**: ascorbate, **DHA**: dehydroascorbate, **DHAR**: DHA reductase, **MDA**: monodehydroascorbate, **MDAR**: MDA reductase, **CSD2**: copper/zinc superoxide dismutase 2, **MSD1**: manganese superoxide dismutase 1, **FeSOD**: iron superoxide dismutase, **t-APX**: thylakoidal bound ascorbate peroxidase, **s-APX**: stromal ascorbate peroxidase, **APX1**: cytosolic ascorbate peroxidase, **PrxR**: peroxiredoxin, **Trx**: thioredoxin, **GLR**: glutaredoxin, H_2O : water, O_2 : dioxygen, $O_2^{\cdot-}$: superoxide radical, H_2O_2 : hydrogen peroxide, e^- : electron, **GSH**: reduced glutathione, **GSSG**: oxidized glutathione, **GR1**: cytosolic glutathione reductase, **GR2**: chloroplastic glutathione reductase, **GPX7**: glutathione peroxidase 7, **GSTU19**: tau 19 glutathione transferase, **PRX22**: peroxidase 22, **CAT5**: catalase 5, **IM**: inner

membrane, **IMS**: IM space, **MT1B**: metallothionein 1B, **PC**: phytochelatin, **PCS1**: PC synthase 1.

Table 1: Studies concerning enzyme activities and gene expression measures of candidates involved in oxidative stress in Annelida Oligochaeta exposed to organic and/or metallic pollutants.

Table 2: Studies concerning enzyme activities and gene expression measures of candidates involved in oxidative stress (A) in Brassicaceae and (B) in Fabaceae exposed to organic and/or metallic pollutants.

Supplemented data

Figure S1: A: ClustalW multiple sequence alignment of *TrCAT5* (boxed sequence) with catalases in Fabaceae. B: ClustalW multiple sequence alignment of *BolC.FSD3* (boxed sequence) with iron superoxide dismutases in Brassicaceae.

Table S1: Primer sequences used in *Eisenia fetida* to perform real-time PCR

Legend: ATGC = sequences available in databases / **ATGC** = sequence cloned / ATGC = gene expression quantified / < Q.L. = under quantification limit.

Abbreviations: *contig2471* = phosphodiesterase 4B, *contig1517* = predicted protein, *β -act* = Beta actin, *cat* = Catalase, *gpx* = Glutathione peroxidase, *gstp* = Pi glutathione transferase, *Cd-mt* = Cadmium metallothionein, *pcs* = Phytochelatin synthase, *Cu/Zn-sod* = Copper/Zinc superoxide dismutase.

Table S2: Primer sequences used in *Brassica oleracea* to perform real-time PCR

Legend: ATGC = sequences available in databases / **ATGC** = sequence cloned / ATGC = gene expression quantified / < Q.L. = under quantification limit.

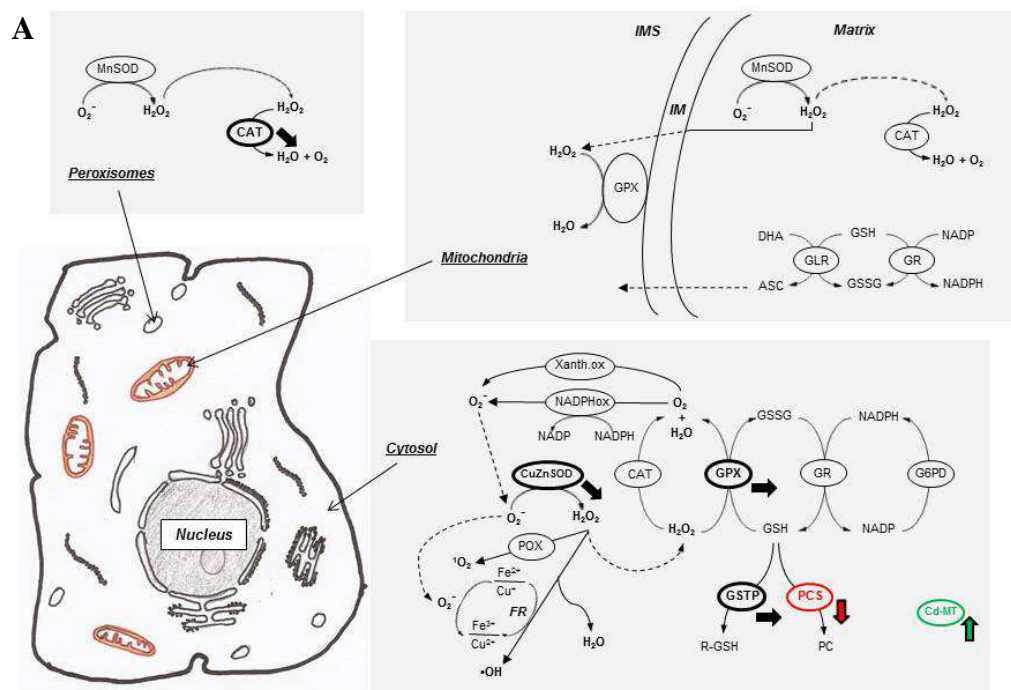
Abbreviations: *BolC.TUB6* = Beta 6 tubulin, *BolC.SAND1* = SAND family protein 1, *BolC.UBQ2* = Ubiquitin 2, *BolC.PCS1* = Phytochelatin synthase 1, *BolC.FSD3* = Iron superoxide dismutase 3, *BolC.MSD1* = Manganese superoxide dismutase 1, *BolC.CSD2* = Copper/Zinc superoxide dismutase 2, *BolC.GSTF2* = Phi 2 glutathione transferase, *BolC.GSTU19* = Tau 19 glutathione transferase a, *BolC.GSTU5* = Tau 5 glutathione transferase b, *BolC.GSTT1* = Theta 1 glutathione transferase, *BolC.GSTZ1* = Zeta 1 glutathione transferase, *BolC.PRXCB* = Peroxidase CB, *BolC.GR2* = Chloroplastic glutathione reductase, *BolC.GRI* = Cytosolic glutathione reductase, *BolC.tAPX* = Thylakoidal bound ascorbate peroxidase, *BolC.APX1* = Ascorbate peroxidase 1, *BolC.CAT2* = Catalase 2, *BolC.GPX7* = Glutathione peroxidase 7, *BolC.MT1C* = Metallothionein 1C.

Table S3: Primer sequences used in *Trifolium repens* to perform real-time PCR

Legend: ATGC = sequences available in databases / **ATGC** = sequence cloned / ATGC = gene expression quantified / < Q.L. = under quantification limit.

Abbreviations: *TrEF1a1* = Elongation Factor 1 alpha 1, *TrTBP2* = TATA box binding protein 2, *TrSAND1* = SAND family protein 1, *TrAPX1* = Ascorbate peroxidase 1, *TrCAT5* = Catalase 5, *TrGPX7* = Glutathione peroxidase 7, *TrPCS1* = Phytochelatin synthase 1, *TrCSD2* = Copper/Zinc superoxide dismutase 2, *TrMSD1* = Manganese superoxide dismutase 1, *TrGSTU19* = Glutathione transferase tau 19, *TrGR2* = Chloroplastic glutathione reductase, *TrGRI* = Cytosolic glutathione reductase, *TrPRX22* = Peroxidase 22, *TrMT1B* = Metallothionein 1B.

Figure 1: A) Localization of major proteins involved in ROS scavenging in *E. fetida*. B) Relative fold expression and *p*-values in *E. fetida* exposed to each Cd-spiked soils during 10 days.



B

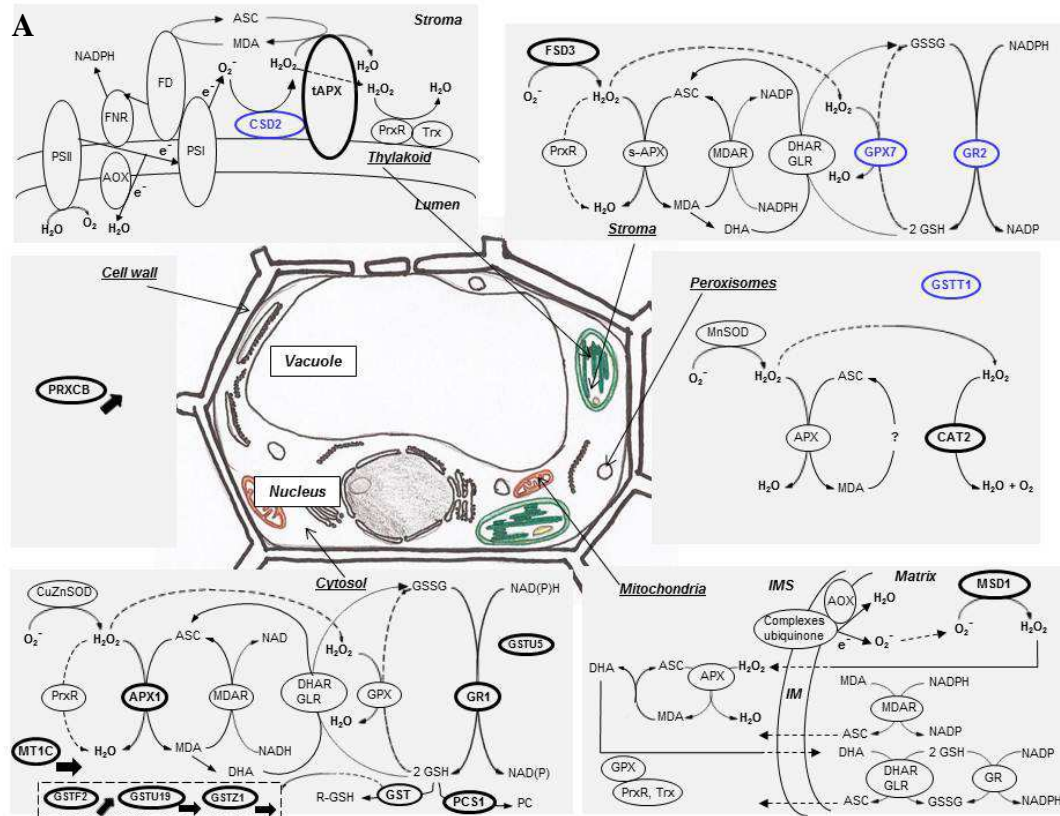
[Cd], mg.kg ⁻¹	Ref	2.5	5	10	20
<i>Cd-mt</i>	1.00	↑ 2.02 2.95 10 ⁻²	↑ 5.06 8.96 10 ⁻³	↑ 7.40 2.62 10 ⁻³	↑ 24.28 1.80 10 ⁻⁴
<i>pcs</i>	1.00	↓ 0.42 1.82 10 ⁻⁴	↓ 0.18 1.82 10 ⁻⁴	↓ 0.23 1.82 10 ⁻⁴	↓ 0.29 1.82 10 ⁻⁴
<i>cat</i>	1.00	↔ 0.51 ns	↔ 0.59 ns	↓ 0.32 1.98 10 ⁻⁴	↔ 1.07 ns
<i>CuZnsod</i>	1.00	↔ 0.53 ns	↔ 0.62 ns	↔ 0.52 ns	↔ 1.33 ns
<i>gstp</i>	1.00	↔ 0.61 ns	↔ 0.84 ns	↔ 0.63 ns	↑ 1.62 4.36 10 ⁻³
<i>gpx</i>	1.00	↔ 0.88 ns	↔ 0.80 ns	↓ 0.48 3.84 10 ⁻²	↔ 1.30 ns

↑ up-regulated
 ↗ slightly up-regulated
 ↔ close to control
 ↘ slightly down-regulated
 ↓ down-regulated

Abbreviations: O₂⁻: superoxide radical, H₂O₂: hydrogen peroxide, •OH: hydroxyl radical, ¹O₂: singlet oxygen, H₂O: water, O₂: dioxygen, MnSOD: manganese superoxide dismutase, CAT: catalase, GPX: glutathione peroxidase, DHA: dehydroascorbate, ASC: ascorbate, GLR: glutaredoxin, GSH: reduced glutathione, GSSG: oxidized glutathione, GR: glutathione

reductase, **NADP(H)**: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, **IM**: inner membrane, **IMS**: IM space, **CuZnSOD**: copper/zinc superoxide dismutase, **G6PD**: glucose-6-phosphate dehydrogenase, **POX**: peroxidase, **FR**: Fenton reaction, **GSTP**: pi glutathione transferase, **PC**: phytochelatin, **PCS**: PC synthase, **Cd-MT**: cadmium-metallothionein.

Figure 2: A) Localization of major proteins involved in ROS scavenging in *B. oleracea* (adapted from Mittler *et al.*, 2004). B) Relative fold expression and *p*-values in *B. oleracea* exposed to each Cd-spiked soils during 10 days.



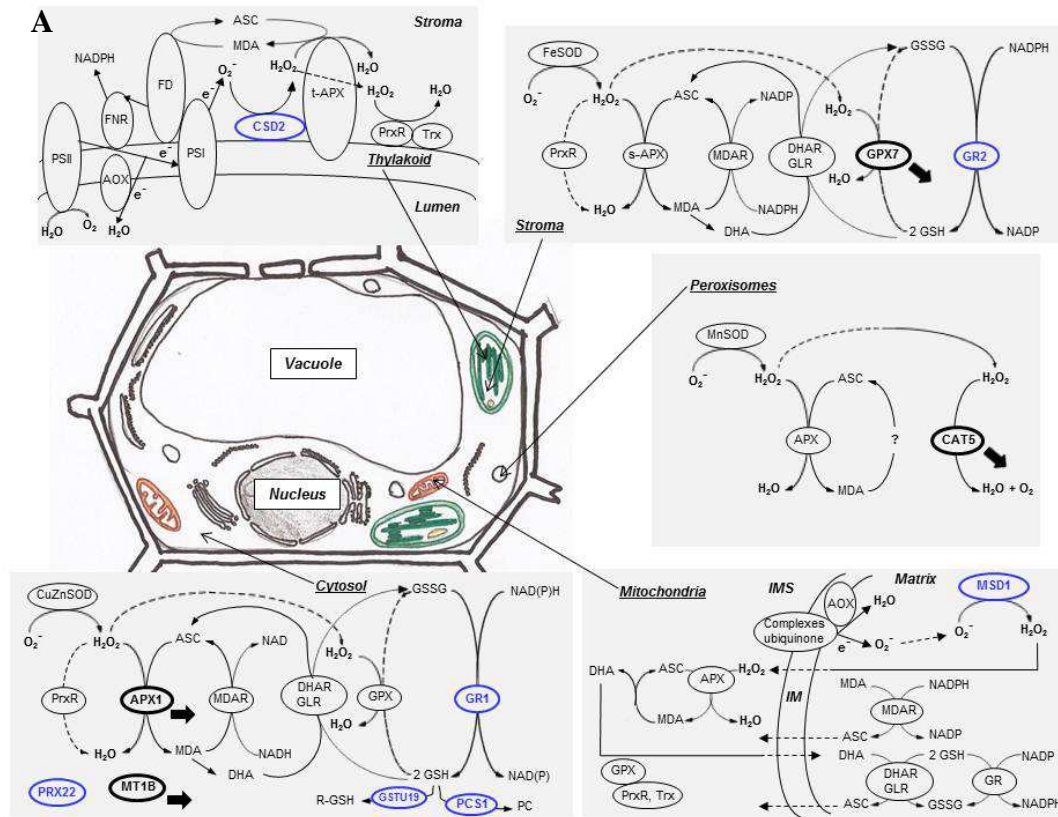
B	[Cd], mg.kg ⁻¹	Ref	2.5	5	10	20
<i>BolC.MT1C</i>	1.00	↓ 0.47 1.03 10 ⁻³	↓ 0.48 1.31 10 ⁻³	↓ 0.33 2.24 10 ⁻⁴	↑ 1.94 1.80 10 ⁻⁴	
<i>BolC.GSTF2</i>	1.00	↑ 3.81 1.80 10 ⁻⁴	↓ 0.39 1.80 10 ⁻⁴	⇒ 0.83 ns	⇒ 1.18 ns	
<i>BolC.GSTU19</i>	1.00	↗ 1.20 ns	↘ 0.61 ns	⇒ 0.99 ns	↗ 1.28 ns	
<i>BolC.GSTZ1</i>	1.00	↗ 1.38 ns	↓ 0.43 3.42 10 ⁻⁴	↗ 1.38 ns	↘ 0.68 ns	
<i>BolC.PRXCB</i>	1.00	⇒ 0.98 ns	↘ 0.65 ns	↑ 2.03 1.84 10 ⁻⁴	↗ 1.50 ns	

↑ up-regulated
↗ slightly up-regulated
⇒ close to control
↘ slightly down-regulated
↓ down-regulated
ns non measurable in real-time PCR

Abbreviations: PSI: photosystem I, PSII: photosystem II, AOX: amine oxidase, NADP(H): nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, FD: ferredoxin, FNR: FD NADP reductase, ASC: ascorbate, DHA: dehydroascorbate, DHAR: DHA reductase, MDA: monodehydroascorbate, MDAR: MDA reductase, CSD2: copper/zinc superoxide dismutase 2, MSD1: manganese superoxide dismutase 1, FSD3: iron superoxide dismutase 3, tAPX:

thylakoidal bound ascorbate peroxidase, **s-APX**: stromal ascorbate peroxidase, **APX1**: cytosolic ascorbate peroxidase, **PrxR**: peroxiredoxin, **Trx**: thioredoxin, **GLR**: glutaredoxin, **H₂O**: water, **O₂**: dioxygen, **O₂⁻**: superoxide radical, **H₂O₂**: hydrogen peroxide, **e⁻**: electron, **GSH**: reduced glutathione, **GSSG**: oxidized glutathione, **GR1**: cytosolic glutathione reductase, **GR2**: chloroplastic glutathione reductase, **GPX7**: glutathione peroxidase 7, **GST**: glutathione transferase, **GSTF2**: phi 2 GST, **GSTU19**: tau 19 GST, **GSTU5**: tau 5 GST, **GSTT1**: theta 1 GST, **GSTZ1**: zeta 1 GST, **PRXCB**: peroxidase CB, **CAT2**: catalase 2, **IM**: inner membrane, **IMS**: IM space, **MT1C**: metallothionein 1C, **PC**: phytochelatin, **PCS1**: PC synthase 1.

Figure 3: A) Localization of major proteins involved in ROS scavenging in *T. repens* (adapted from Mittler *et al.*, 2004). B) Relative fold expression and *p*-values in *T. repens* exposed to each Cd-spiked soils during 10 days.



B

[Cd], mg.kg ⁻¹	Ref	2.5	5	10	20
<i>TrMT1B</i>	1.00	↔ 0.76 <i>ns</i>	↔ 0.69 <i>ns</i>	↔ 0.78 <i>ns</i>	↑ 1.95 <i>1.97 10⁻⁴</i>
<i>TrCAT5</i>	1.00	↓ 0.25 <i>3.67 10⁻³</i>	↔ 0.54 <i>ns</i>	↔ 0.59 <i>ns</i>	↑ 1.75 <i>3.36 10⁻³</i>
<i>TrAPX1</i>	1.00	↔ 0.54 <i>ns</i>	↔ 0.68 <i>ns</i>	↔ 0.60 <i>ns</i>	↑ 1.56 <i>1.93 10⁻⁴</i>
<i>TrGPX7</i>	1.00	↔ 0.53 <i>ns</i>	↔ 0.60 <i>ns</i>	↓ 0.43 <i>2.52 10⁻⁴</i>	↔ 1.11 <i>ns</i>

↑ up-regulated
 ↗ slightly up-regulated
 ↔ close to control
 ↘ slightly down-regulated
 ↓ down-regulated
 non measurable in real-time PCR

Abbreviations: PSI: photosystem I, PSII: photosystem II, AOX: amine oxidase, NADP(H): nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, FD: ferredoxin, FNR: FD NADP reductase, ASC: ascorbate, DHA: dehydroascorbate, DHAR: DHA reductase, MDA: monodehydroascorbate, MDAR: MDA reductase, CSD2: copper/zinc superoxide dismutase 2, MSD1: manganese superoxide dismutase 1, FeSOD: iron superoxide dismutase, t-APX: thylakoidal bound ascorbate peroxidase, s-APX: stromal ascorbate peroxidase, APX1:

cytosolic ascorbate peroxidase, **PrxR**: peroxiredoxin, **Trx**: thioredoxin, **GLR**: glutaredoxin, **H₂O**: water, **O₂**: dioxygen, **O₂^{•-}**: superoxide radical, **H₂O₂**: hydrogen peroxide, **e⁻**: electron, **GSH**: reduced glutathione, **GSSG**: oxidized glutathione, **GR1**: cytosolic glutathione reductase, **GR2**: chloroplastic glutathione reductase, **GPX7**: glutathione peroxidase 7, **GSTU19**: tau 19 glutathione transferase, **PRX22**: peroxidase 22, **CAT5**: catalase 5, **IM**: inner membrane, **IMS**: IM space, **MT1B**: metallothionein 1B, **PC**: phytochelatin, **PCS1**: PC synthase 1.

Table 1: Studies concerning enzyme activities and gene expression measures of candidates involved in oxidative stress in Annelida Oligochaeta exposed to organic and/or metallic pollutants.

Species	Oxidative stress indicator	Type of test	Stressor	Reference
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, GPX	Enzyme activity	Pb, U	Labrot <i>et al.</i> , 1996
<i>Eisenia andrei</i>	CAT, GPX, NAD(P)H reductases	Enzyme activity	Pb	Saint-Denis <i>et al.</i> , 2001
<i>Lumbricus terrestris</i> , <i>Aporrectodea caliginosa</i> , <i>Eisenia fetida</i>	SOD, CAT, GR, GPX, GST	Enzyme activity	Cd, Pb, Zn	Łaszczycza <i>et al.</i> , 2004
<i>Eisenia fetida</i>	MT, CAT, SOD	Gene expression	Cd	Brulle <i>et al.</i> , 2006
<i>Eisenia fetida</i>	MT, CAT, SOD	Gene expression	Cd, Cu	Brulle <i>et al.</i> , 2007
<i>Eisenia andrei</i>	CAT, GPX	Enzyme activity	MTEs	Antunes <i>et al.</i> , 2008
<i>Eisenia fetida</i>	MT, PCS	Gene expression	Cd	Brulle <i>et al.</i> , 2008a
<i>Eisenia fetida</i> , <i>Lumbricus rubellus</i>	MT, PCS	Gene expression	Cd, Pb, Zn	Bernard <i>et al.</i> , 2010
<i>Eisenia fetida</i>	SOD, CAT	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Cu	Gaete <i>et al.</i> , 2010
<i>Eisenia fetida</i>	MT, CAT, SOD	Gene expression	Cu NPs	Unrine <i>et al.</i> , 2010
<i>Eisenia fetida</i>	MT, SOD	Gene expression	TiO ₂ NPs	Bigorgne <i>et al.</i> , 2011
<i>Eisenia fetida</i>	MT, PCS	Gene expression	MTEs	Brulle <i>et al.</i> , 2011
<i>Lumbricus terrestris</i>	GST, GR, GPX	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Hg	Colacevich <i>et al.</i> , 2011
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, GPX	Enzyme activity	ZnO NPs	Li L.Z. <i>et al.</i> , 2011
<i>Metaphire posthuma</i> , <i>Polypheretima elongata</i> , <i>Pontoscolex corethrurus</i>	MT-2	Gene expression, Comet assay	Cd	Liang <i>et al.</i> , 2011
<i>Eisenia fetida</i>	MT, CAT, GST, SOD	Gene expression	TiO ₂ NPs	Bigorgne <i>et al.</i> , 2012
<i>Eisenia fetida</i>	MT, CAT, GST, SOD	Gene expression, Enzyme activity	Ag NPs	Tsyusko <i>et al.</i> , 2012
<i>Eisenia fetida</i>	MT, CAT, SOD	Gene expression	ZnO	Xiong <i>et al.</i> , 2012
<i>Eisenia andrei</i>	CAT, GST	Enzyme activity, Lipid peroxidation	B(a)P	Saint-Denis <i>et al.</i> , 1999
<i>Eisenia andrei</i>	CAT, GPX, NAD(P)H reductases	Enzyme activity	1-chloro-2,4-dinitrobenzene	Arnaud <i>et al.</i> , 2000
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, GST	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Tetrabromobisphenol A	Xue <i>et al.</i> , 2009
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, POD	Enzyme activity	B(a)P	Zhang W. <i>et al.</i> , 2009
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, POD	Enzyme activity, Lipid peroxidation	HHCB	Liu S. <i>et al.</i> , 2010
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, POD	Enzyme activity, Comet assay	Toluene, Ethylbenzene, Xylene	Liu Y. <i>et al.</i> , 2010
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD	Gene expression, Lipid peroxidation	AHTN, HHCB	Chen <i>et al.</i> , 2011a
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD	Gene expression	AHTN, HHCB	Chen <i>et al.</i> , 2011b
<i>Eisenia fetida</i>	SOD	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Biochar	Li D. <i>et al.</i> , 2011
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, POD	Enzyme activity, Lipid peroxidation	HHCB	Liu S. <i>et al.</i> , 2011

Table 1 (continued)

Species	Oxidative stress indicator	Type of test	Stressor	Reference
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, GST	Enzyme activity, Lipid peroxidation	BDE-209	Xie <i>et al.</i> , 2011
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD	Gene expression, Lipid peroxidation	AHTN, HHCB	Chen and Zhou, 2012
<i>Eisenia andrei</i>	CAT, GR, GST	Enzyme activity	Carbaryl	Ribera <i>et al.</i> , 2001
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	CAT, GST	Enzyme activity	Pesticides	Schreck <i>et al.</i> , 2008
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, POD	Enzyme activity, Comet assay	Atrazine	Song <i>et al.</i> , 2009
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD	Enzyme activity, Lipid peroxidation, Comet assay	Triclosan	Lin <i>et al.</i> , 2010a
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, GST	Enzyme activity, Lipid peroxidation, Comet assay	Triclosan	Lin <i>et al.</i> , 2010b
<i>Eisenia fetida</i>	SOD, CAT	Enzyme activity, Comet assay	Chlortetracycline, tetracycline	Dong <i>et al.</i> , 2012
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, GST	Enzyme activity, Lipid peroxidation, Comet assay	Chlortetracycline	Lin <i>et al.</i> , 2012
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD, POD	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Fomesafen	Zhang Q. <i>et al.</i> , 2012
<i>Eisenia veneta</i> , <i>Eisenia fetida</i>	CAT, SOD	Enzyme activity	Paraquat, MTEs	Hønsi <i>et al.</i> , 1999
<i>Eisenia andrei</i>	CAT, SOD, GST	Enzyme activity, NRRT assay	HMX, MTEs	Berthelot <i>et al.</i> , 2008
<i>Lumbricus rubellus</i>	MT, GST	Gene expression	Cd, Fluoranthene, Atrazine	Owen <i>et al.</i> , 2008
<i>Eisenia fetida</i>	CAT, GST	Enzyme activity	Pyrene, Cd	Zhang X. <i>et al.</i> , 2009
<i>Eisenia fetida</i>	MT, PCS	Gene expression	Landfill leachate	Manier <i>et al.</i> , 2012

Table 2: Studies concerning enzyme activities and gene expression measures of candidates involved in oxidative stress (A) in Brassicaceae and (B) in Fabaceae exposed to organic and/or metallic pollutants.

Species	Oxidative stress indicator	Type of test	Stressor	Reference
(2A) Brassicaceae				
<i>Arabidopsis thaliana</i>	APX, GR, DHAR, MDHAR	Enzyme activity	Cu	Drażkiewicz <i>et al.</i> , 2003a
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOD, CAT, POX	Enzyme activity	Cu	Drażkiewicz <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT, POX, SOD, APX, MDHAR, DHAR, GR	Enzyme activity	Cd	Skórzyńska -Polit <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT, SOD, APX, GR, GPOX	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Cd	Cho and Seo, 2005
<i>Brassica juncea</i>	SOD, APX, CAT, GR, GST	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Cr	Pandey <i>et al.</i> , 2005
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOD, CAT, APX	Enzyme activity	Cd, Cu	Maksymiek and Krupa, 2006
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOD (Cu/ZnSOD, FeSOD, MnSOD)	Enzyme activity	Cd, Cu	Drażkiewicz <i>et al.</i> , 2007
<i>Brassica oleracea</i> , <i>Medicago sativa</i>	CAT, APX, POD, SOD, GR	Enzyme activity	Se	Hajiboland and Amjad, 2007
<i>Brassica juncea</i>	CAT, SOD, APX, GR	Enzyme activity	Cd	Mobin and Khan, 2007
<i>Arabidopsis thaliana</i>	APX, GR, CAT, SOD, GPX, PCS	Enzyme activity, Gene expression	Cd	Semane <i>et al.</i> , 2007
<i>Brassica chinensis</i>	SOD, CAT, APX, POD	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Cd	Chen <i>et al.</i> , 2008
<i>Arabidopsis thaliana</i>	APX, GR, SOD, AOX, GLR, PrxR, MDAR, Trx, POX, GST	Gene expression	Al	Kumari <i>et al.</i> , 2008
<i>Brassica napus</i>	GR	Enzyme activity	Cu	Russo <i>et al.</i> , 2008
<i>Brassica juncea</i>	GR	Enzyme activity	Cd	Seth <i>et al.</i> , 2008
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GPOX, APX, SOD, GR, CAT, DHAR, GPX	Enzyme activity, Gene expression	Cd	Smeets <i>et al.</i> , 2008
<i>Brassica juncea</i>	POX	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Cd	Verma <i>et al.</i> , 2008
<i>Brassica juncea</i>	CAT, SOD, APX, GR	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Pb, Cd	John <i>et al.</i> , 2009
<i>Brassica juncea</i>	CAT, APX, GPOX, SOD	Enzyme activity	Cd	Pinto <i>et al.</i> , 2009
<i>Brassica oleracea</i>	SOD, CAT, POX, APX, GPX, GR	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Cu	Posmyk <i>et al.</i> , 2009
<i>Brassica juncea</i>	CAT, SOD, POD	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Hg	Shiyab <i>et al.</i> , 2009
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GPOX, APX, SOD, GR, CAT	Enzyme activity, Gene expression	Cd, Cu	Smeets <i>et al.</i> , 2009
<i>Brassica juncea</i>	GST	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Pb	Szőllősi <i>et al.</i> , 2009
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT, SOD	Gene expression	U	Vanhoudt <i>et al.</i> , 2009
<i>Brassica juncea</i>	SOD, CAT, APX, GPOX	Enzyme activity	Cu	Singh <i>et al.</i> , 2010
<i>Brassica juncea</i>	SOD, APX, GPOX	Enzyme activity	Cu, Cr, As	Sinha <i>et al.</i> , 2010
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT, SOD	Gene expression, Lipid peroxidation	U, γ radiations	Vanhoudt <i>et al.</i> , 2010a
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT, SOD, APX, GR	Gene expression, Lipid peroxidation	U, Cd	Vanhoudt <i>et al.</i> , 2010b

Table 2 (continued)

Species	Oxidative stress indicator	Type of test	Stressor	Reference
<i>Brassica juncea</i>	CAT, PCS	Gene expression	Cd, Pb	Bhuiyan <i>et al.</i> , 2011
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PCS	Gene expression	Cd	Brunetti <i>et al.</i> , 2011
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOD, CAT, APX, GR	Enzyme activity, Gene expression	Cd, Cu	Cuypers <i>et al.</i> , 2011
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOD, CAT, GR, GPX, POD	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Pb	Phang <i>et al.</i> , 2011
<i>Brassica campestris</i>	POX	Enzyme activity	Pb	Singh <i>et al.</i> , 2011
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT, SOD, APX, GR	Gene expression	U	Vanhoudt <i>et al.</i> , 2011a
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT, SOD, APX, GR	Gene expression	U	Vanhoudt <i>et al.</i> , 2011b
<i>Brassica oleracea</i> , <i>Brassica juncea</i>	CAT, APX, GR	Enzyme activity	Cr	Zaimoglu <i>et al.</i> , 2011
<i>Brassica napus</i>	APX, MDHAR, DHAR, GR, GST, GPX, CAT	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Cd, Se	Hasanuzzaman <i>et al.</i> , 2012
<i>Brassica juncea</i>	POD, CAT	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Cd	Mohamed <i>et al.</i> , 2012
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PCS	Gene expression	Cd	Moudouma <i>et al.</i> , 2012
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT, APX, SOD	Gene expression, Lipid peroxidation	Cd, Cu	Opdenakker <i>et al.</i> , 2012
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOD, CAT, APX, GPX, GR, PCS	Enzyme activity, Gene expression	Zn	Remans <i>et al.</i> , 2012
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GST, CAT, APX	Gene expression	Phenanthrene	Weisman <i>et al.</i> , 2010
<i>Brassica campestris</i> , <i>Brassica rapa</i>	CAT, SOD, GPOX, GR, APX	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Phenanthrene	Ahammed <i>et al.</i> , 2012
<i>Brassica campestris</i>	SOD, POX, CAT, GR	Enzyme activity	Trichloroacetate	Radetski <i>et al.</i> , 2000
<i>Arabidopsis thaliana</i>	SOD, CAT, POX, APX	Enzyme activity	Colchicine, H ₂ O ₂	Drażkiewicz <i>et al.</i> , 2003b
<i>Arabidopsis thaliana</i>	APX	Enzyme activity	Paraquat	Murgia <i>et al.</i> , 2004
<i>Arabidopsis thaliana</i>	APX	Gene expression	Paraquat	Laloi <i>et al.</i> , 2007
<i>Arabidopsis thaliana</i>	APX, CAT, GST	Gene expression	Atrazine	Ramel <i>et al.</i> , 2007
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GST	Gene expression	Fenclorim	Skipsey <i>et al.</i> , 2011
<i>Arabidopsis thaliana</i>	APX, CAT, SOD	Gene expression	Paraquat	Bulgakov <i>et al.</i> , 2012
<i>Arabidopsis halleri</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	CAT, APX, POX, MT	Enzyme activity, Gene expression	Cd, Paraquat	Chiang <i>et al.</i> , 2006
(2B) Fabaceae				
<i>Glycine max</i>	APX, DHAR, GR	Enzyme activity	Cd	Balestrasse <i>et al.</i> , 2001
<i>Pisum sativum</i>	CAT, APX, SOD, GR, GST, GPOX	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Cd	Dixit <i>et al.</i> , 2001
<i>Trifolium pratense</i>	POD, SOD	Enzyme activity	Arsenate	Mascher <i>et al.</i> , 2002
<i>Pisum sativum</i>	SOD, GR, CAT, GPOX	Enzyme activity	Cd	Rodriguez-Serrano <i>et al.</i> , 2006

Table 2 (continued)

Species	Oxidative stress indicator	Type of test	Stressor	Reference
<i>Trifolium repens</i> , <i>Lolium perenne</i>	SOD	Enzyme activity, Lipid peroxidation	MTEs	Bidar <i>et al.</i> , 2007
<i>Vicia faba</i>	SOD, POD, CAT	Enzyme activity, Comet assay	Cd	Lin <i>et al.</i> , 2007
<i>Glycine max</i>	SOD, GPOX	Enzyme activity	Cd	Noriega <i>et al.</i> , 2007
<i>Medicago sativa</i>	GPOX, SOD, GR, APX	Enzyme activity	Hg	Zhou <i>et al.</i> , 2007
<i>Alhagi camelthorn</i>	CAT, GPX, SOD	Enzyme activity	Mn	Boojar and Goodarzi, 2008
<i>Medicago truncatula</i>	GPX, GR, GST	Gene expression	Al	Chandran <i>et al.</i> , 2008
<i>Trifolium alexandrinum</i> , <i>Medicago sativa</i>	CAT, APX, POD	Enzyme activity	Al	Faheed, 2008
<i>Medicago sativa</i>	NADH oxydase, SOD, CAT, APX, GR, GPOX	Enzyme activity	Hg	Zhou <i>et al.</i> , 2008
<i>Trifolium repens</i> , <i>Lolium perenne</i>	SOD	Enzyme activity, Lipid peroxidation, ELISA	MTEs	Bidar <i>et al.</i> , 2009
<i>Medicago sativa</i>	GR, APX, POX, SOD	Enzyme activity	Hg, Cd	Sobrino-Plata <i>et al.</i> , 2009
<i>Trifolium repens</i>	CAT, SOD, GPX, APX	Enzyme activity, Lipid peroxidation	Cd	Wang and Song, 2009
<i>Medicago sativa</i>	NADH oxydase, SOD, APX, GR, POX	Enzyme activity	Hg	Zhou <i>et al.</i> , 2009
<i>Phaseolus vulgaris</i>	GPOX, CAT	Enzyme activity	Cu	Bouazizi <i>et al.</i> , 2010
<i>Pisum sativum</i>	CAT, APX, SOD, GR	Gene expression	Al	Panda and Matsumoto, 2010
<i>Glycyrrhiza uralensis</i>	SOD, POD, CAT	Enzyme activity	Cd	Zheng <i>et al.</i> , 2010
<i>Trifolium repens</i>	POX, NADH peroxidase	Enzyme activity	Mn	Dorling <i>et al.</i> , 2011
<i>Lotus corniculatus</i>	SOD, GPX, APX, DHAR, MDHAR, GR	Gene expression	Al	Navascués <i>et al.</i> , 2012
<i>Phaseolus aureus</i>	SOD, GR, CAT, APX, GPOX	Enzyme activity	2-Benzoxazolinone	Batish <i>et al.</i> , 2006
<i>Medicago sativa</i>	POX, APX, MDHAR, DHAR, GR, SOD	Enzyme activity	Oil refinery sludges	Marti <i>et al.</i> , 2009
<i>Trifolium repens</i>	APX, GPOX	Enzyme activity, Comet assay	Landfill leachate	Manier <i>et al.</i> , 2012

Figure S1: A: ClustalW multiple sequence alignment of *TrCAT5* (boxed sequence) with catalases in Fabaceae.
 B: ClustalW multiple sequence alignment of *BoIc.FSD3* (boxed sequence) with iron superoxide dismutases in Brassicaceae.



Table S1: Primer sequences used in *Eisenia fetida* to perform real-time PCR

Gene	Amplicon size (pb)	Efficiency	Forward	Reverse	Accession number	References
<i>contig2471</i>	376	1.99	<u>ACTACATTGTTTCAGCCG</u>	<u>GGCCATTTGGCAACTC</u>	GenBank: KF682228	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>contig1517</i>	403	1.97	<u>TAACAGGTCTAGCTGGTTG</u>	<u>CCGCGTTAGAGATCACT</u>	GenBank: KF682227	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>β act</i>	148	2.00	<u>GTACGATGAGTCCGGG</u>	<u>GCATGTGTGTGGTGTCTC</u>	GenBank: DQ286722	Brulle <i>et al.</i> , 2006
<i>cat</i>	266	2.00	<u>CGGAGAAGCTGTGTACT</u>	<u>GTCCCACTGGAATCAGAG</u>	GenBank: DQ286713	Brulle <i>et al.</i> , 2006
<i>gpx</i>	285	1.99	<u>GAGGTACAACGGAGTTGG</u>	<u>TGAGACGTTTGTCTGGT</u>	GenBank: EH672188	Pirooznia <i>et al.</i> , 2007
<i>gstp</i>	462	1.99	<u>GGATAAATATGTTGGCGAGC</u>	<u>GTCACGTGTTCATGGTTG</u>	GenBank: HQ693699	Brulle <i>et al.</i> , 2006
<i>Cd-mt</i>	421	1.99	<u>GATGCGAAGAAACGTGT</u>	<u>GTTACGCAGTATCCTCAGA</u>	GenBank: DQ286714	Brulle <i>et al.</i> , 2006
<i>pcs</i>	223	1.91	<u>TCATGGTCTGAACACG</u>	<u>CACAAGCTGCCGAAACTC</u>	GenBank: EF433776	Brulle <i>et al.</i> , 2008a
<i>Cu/Zn-sod</i>	198	2.00	<u>GGCGATAACACAAATGGT</u>	<u>CGTGCGTCCAATGATTGAA</u>	GenBank: DQ286712	Brulle <i>et al.</i> , 2006

Abbreviations: *contig2471* = phosphodiesterase 4B, *contig1517* = predicted protein, *β-act* = Beta actin, *cat* = Catalase, *gpx* = Glutathione peroxidase, *gstp* = Pi glutathione transferase, *Cd-mt* = Cadmium metallothionein, *pcs* = Phytochelatin synthase, *Cu/Zn-sod* = Copper/Zinc superoxide dismutase.

Table S2: Primer sequences used in *Brassica oleracea* to perform real-time PCR

Gene	Amplicon size (pb)	Efficiency	Forward	Reverse	Accession number	References
<i>BolC.TUB6.a</i>	345	1.92	<u>GGAATGGATACCGAACCAACG</u>	<u>CAACGCTAGTCTCAGCAGCA</u>	GenBank: KF218597	Brulle <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.SAND1.a</i>	297	1.93	<u>GCGCGTCTGGTGTATTGTT</u>	<u>CAATGCGAATCCTGCAATC</u>	GenBank: KF218596	Brulle <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.UBQ2.a</i>	359	1.97	<u>ATATTCGTGAAGACGCTG</u>	<u>CTCAACTGGTTGCTGTG</u>	GenBank: KF218593	Brulle <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.PCS1.a</i>	246	1.92	<u>TCCATGGCTTCCCAAAGA</u>	<u>GGCTTCCCGCACTAATCA</u>	GenBank: JQ321585	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.FSD3.a</i>	174	1.88	<u>AACGCTGCGCAGGTCTAT</u>	<u>GACCCAGCCAGAACCAAA</u>	GenBank: JQ321586	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.MSD1.a</i>	140	1.86	<u>TGCAGATCCATCACCAGAAG</u>	<u>TCCGCCGTTGAACTTGAT</u>	GenBank: JQ321587	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.CSD2.a</i>	157	< Q.L.	<u>CATCGGCGTTGGCAGTA</u>	<u>GGCCTGCATGGTTTTAC</u>	GenBank: JQ321588	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.GSTF2.a</i>	254	2.10	<u>AACCGCAGGAATGTGGTG</u>	<u>ACCTGGCCCACTATGCAA</u>	GenBank: JQ321590	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.GSTU19.a</i>	262	1.90	<u>TTCCGGTTCTCATCCACAA</u>	<u>TCTCCAAGCTCGGTTTCAA</u>	GenBank: JQ321591	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.GSTU5.a</i>	299	1.93	<u>GGCGACCAAATCCAAAAA</u>	<u>TCCACAATGGCAAAACCA</u>	GenBank: JQ321592	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.GSTT1.a</i>	232	< Q.L.	<u>ATCTTGGCGAAGCGTCAG</u>	<u>CACCAGGGCGTAAATTGG</u>	GenBank: JQ321593	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.GSTZ1.a</i>	187	2.10	<u>CCAGTTGCGTGTTTTCCA</u>	<u>TCAATTCGAGGCAGCAA</u>	GenBank: JQ321594	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.PRxcb.a</i>	182	1.96	<u>TCAGTCGAGTTGGCAGGAG</u>	<u>CCGAGAGAGCAACGAGAT</u>	GenBank: JQ321595	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.GR2.a</i>	181	< Q.L.	<u>TCATCCGGCAGAAAAAGG</u>	<u>TGCGAAAACCCATCAACA</u>	GenBank: JQ321589	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.GR1.a</i>	123	2.05	<u>AGCGATTGTTGGCGAATG</u>	<u>AAATGTGCTTGGCGGTGT</u>	GenBank: AB125639	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.tAPX.a</i>	227	2.07	<u>GCAAACGCTGGTCTCGTT</u>	<u>TGATCCGCTGGTGAAGGT</u>	GenBank: AB125634	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.APX1.a</i>	257	1.98	<u>TGGTGGTCCATTCGGAAC</u>	<u>CGCAGCCCTTTGTAGCAT</u>	GenBank: AB078599	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.CAT2.a</i>	236	1.89	<u>CGTTGGGCGTATGGTGTT</u>	<u>TGAAGCCCTCATGGTGGT</u>	GenBank: GQ500124	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.GPX7.a</i>	220	< Q.L.	<u>CGGATATCAAGCGTTTCG</u>	<u>TGTAAAGGCGGGGTCGT</u>	GenBank: AY493200	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>BolC.MTIC.a</i>	100	2.00	<u>GTGGTTCCGGTTGCAAAT</u>	<u>TCCCCACAGCTACAGTTTGA</u>	GenBank: AF458412	Bernard <i>et al.</i> , submitted

Legend: ATGC = sequences available in databases / ATGC = sequence cloned / ATGC = gene expression quantified / < Q.L. = under quantification limit.

Abbreviations: *BolC.TUB6* = Beta 6 tubulin, *BolC.SAND1* = SAND family protein 1, *BolC.UBQ2* = Ubiquitin 2, *BolC.PCS1* = Phytochelatin synthase 1, *BolC.FSD3* = Iron superoxide dismutase 3, *BolC.MSD1* = Manganese superoxide dismutase 1, *BolC.CSD2* = Copper/Zinc superoxide dismutase 2, *BolC.GSTF2* = Phi 2 glutathione transferase, *BolC.GSTU19* = Tau 19 glutathione transferase a, *BolC.GSTU5* = Tau 5 glutathione transferase b, *BolC.GSTT1* = Theta 1 glutathione transferase, *BolC.GSTZ1* = Zeta 1 glutathione transferase, *BolC.PRxcb* = Peroxidase CB, *BolC.GR2* = Chloroplastic glutathione reductase, *BolC.GR1* = Cytosolic glutathione reductase, *BolC.tAPX* = Thylakoidal bound ascorbate peroxidase, *BolC.APX1* = Ascorbate peroxidase 1, *BolC.CAT2* = Catalase 2, *BolC.GPX7* = Glutathione peroxidase 7, *BolC.MTIC* = Metallothionein 1C.

Table S3: Primer sequences used in *Trifolium repens* to perform real-time PCR

Gene	Amplicon size (pb)	Efficiency	Forward	Reverse	Accession number	References
<i>TrEF1a1</i>	147	1.97	<u>TGGAAATTCGAGACCACCA</u>	<u>ACCAGCTTCAAAACCACCA</u>	GenBank: KC710340	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrTBP2</i>	231	1.99	<u>ATCCCAAGCGTTTGTCTG</u>	<u>GCCGTATGGGGAATTGA</u>	GenBank: KC710341	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrSAND1</i>	103	2.07	<u>TGAAAACGGGGGTGATTCT</u>	<u>TTCCGTGGAGCTAATGCAG</u>	GenBank: KC710342	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrAPX1</i>	459	1.97	<u>CAGAGGTTTCATCGCT</u>	<u>TCGAATCCAGAACGCT</u>	GenBank: JQ321599	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrCAT5</i>	445	1.90	<u>AACACGTACTCCCTGAT</u>	<u>GTCTGTGCCTCTGTGA</u>	GenBank: JQ321596	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrGPX7</i>	241	1.97	<u>AGATCACCAAAAAAGCCT</u>	<u>ACTACACGGAACCTCTCG</u>	GenBank: JQ321604	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrPCSI</i>	438	< Q.L.	<u>GTCAGTGGAAATCCAATGT</u>	<u>AACTCAATCTGAACCTGC</u>	GenBank: JQ321605	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrCSD2</i>	397	< Q.L.	<u>TACCACCAGCATTGCC</u>	<u>GGTACTTCCACCGTTG</u>	GenBank: JQ321597	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrMSD1</i>	438	< Q.L.	<u>GCGTACTTCCAGTTGATG</u>	<u>TGCTGTGCGGTAAAGCC</u>	GenBank: JQ321598	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrGSTU19</i>	378	< Q.L.	<u>GTTGCGGATGAGGATCAG</u>	<u>CCCAACTCTTGCTCCA</u>	GenBank: JQ321600	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrGR2</i>	388	< Q.L.	<u>TGCTCTTCGGTTAGACCA</u>	<u>AAGAATCACCTGAAGCC</u>	GenBank: JQ321603	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrGRI</i>	318	< Q.L.	<u>AACGTGGACTTCAACTG</u>	<u>GCCTGCTCCAAGAATC</u>	GenBank: JQ321602	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrPRX22</i>	461	< Q.L.	<u>GTTAAGAGTTGGATCAGGAC</u>	<u>GCTTTGTTCAAGGATGTG</u>	GenBank: JQ321606	Bernard <i>et al.</i> , submitted
<i>TrMT1B</i>	106	1.93	<u>ATGTCGAAGCCGAAACCA</u>	<u>TTGCAGCCACTGTCCTCA</u>	GenBank: Z26493	Ellison and White, 1996

Legend: ATGC = sequences available in databases / ATGC = sequence cloned / ATGC = gene expression quantified / < Q.L. = under quantification limit.

Abbreviations: *TrEF1a1* = Elongation Factor 1 alpha 1, *TrTBP2* = TATA box binding protein 2, *TrSAND1* = SAND family protein 1, *TrAPX1* = Ascorbate peroxidase 1, *TrCAT5* = Catalase 5, *TrGPX7* = Glutathione peroxidase 7, *TrPCSI* = Phytochelatin synthase 1, *TrCSD2* = Copper/Zinc superoxide dismutase 2, *TrMSD1* = Manganese superoxide dismutase 1, *TrGSTU19* = Glutathione transferase tau 19, *TrGR2* = Chloroplastic glutathione reductase, *TrGRI* = Cytosolic glutathione reductase, *TrPRX22* = Peroxidase 22, *TrMT1B* = Metallothionein 1B.

I.2) Test des comètes

I.2.1) Le test des comètes

Ostling et Johanson (1984) ont été les premiers à quantifier les dommages à l'ADN dans les cellules en utilisant une technique d'électrophorèse sur micro-gel connu sous le nom de «test des comètes» («Comet assay» ou «Single Cell Gel Electrophoresis, SGCE»). Cependant, ils ont utilisé ce test dans des conditions neutres qui permettrait ainsi de détecter uniquement les cassures double brin de l'ADN. Plus tard, le test a été adapté en conditions alcalines par Singh *et al.* (1988), ce qui a mené à l'obtention d'une version plus sensible du test des comètes. Cette version alcaline permet de mettre en évidence aussi bien les cassures double-brin que les cassures simple-brin ainsi que les sites alcali-labiles qui correspondent à de nettes cassures des brins au sein de l'ADN suite à l'élimination d'un site abasique lors du processus de réparation. Depuis sa création, certaines étapes de ce test ont été adaptées (lyse des cellules, électrophorèse) afin de rendre le test plus approprié à l'évaluation des différents types de lésions dans les différents types cellulaires (Collins, 2004; Speit & Hartmann, 2005). Le test des comètes est simple, rapide, visuel et sensible, largement utilisé pour évaluer les dommages à l'ADN ainsi que leur réparation d'un point de vue quantitatif et qualitatif dans des populations cellulaires individuelles (Olive & Banath, 2006). Certaines lésions comme les pontages avec l'ADN (ex: les dimères de thymidine) et les dommages oxydatifs à l'ADN peuvent aussi être évaluées en utilisant des anticorps spécifiques au type de lésion ou des enzymes spécifiques à la réparation de l'ADN lors du test des comètes. Ce test est largement reconnu comme étant un outils de grande valeur dans les études fondamentales sur les dommages et réparations de l'ADN (Speit & Hartmann, 2005), les tests de génotoxicité (Moller, 2005) et la biosurveillance chez l'Homme (Kassie *et al.*, 2000; Moller, 2006a).

Comparé aux autres tests de génotoxicité, tels que le celui des aberrations chromosomiques, celui des échanges des chromatides sœurs, celui de l'élution alcaline et celui du micronoyau. Les avantages du test des comètes sont sa sensibilité pour détecter les

faibles niveaux de dommages à l'ADN (une cassure tous les 10^{10} Da d'ADN; Gedik *et al.*, 1992), le besoin d'un faible nombre de cellules (~10000) par échantillon, la flexibilité d'utiliser aussi bien des cellules proliférantes que des cellules non proliférantes, un faible coût, une facilité d'application et un temps raisonnable pour achever une étude. Il peut être réalisé sur des cellules en première ligne, au site de contact avec les substances mutagéniques/carcinogéniques (ex: cellules muqueuses du nez et de la bouche). Les données générées au niveau cellulaire permettent des analyses statistiques robustes.

Une des limitations du test des comètes est que les effets aneugènes qui peuvent être un mécanisme possible de la cancérogénécité (COM, 2000) ainsi que les mécanismes épigénétiques des dommages à l'ADN tels que les effets sur le contrôle du cycle cellulaire ne sont pas détectés. D'autres inconvénients peuvent être mentionnés tels que les échantillons contenant des petites cellules (mènent à un biais au sein de l'échantillon), la variabilité technique et l'interprétation des résultats. Cependant, les avantages étant beaucoup plus nombreux que les inconvénients, ce test est donc largement utilisé dans des domaines allant de l'épidémiologie moléculaire à la toxicologie génétique.

I.2.2) Test des comètes chez les Annélides

Pour évaluer la toxicité de produits chimiques, les modèles animaux ont longtemps été utilisés. Le test des comètes a été globalement utilisé pour l'évaluation des dommages à l'ADN chez divers modèles animaux tels que des protozoaires (Lah *et al.*, 2004), des cnidaires (Mitchelmore & Hyatt, 2004), des mollusques bivalves (Pruski & Dixon, 2002; Klobucar *et al.*, 2003; Labienec & Gabryelak, 2006), des annélides oligochètes (Verschaeve *et al.*, 1993; Di Marzio *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2013), des insectes (Siddique *et al.*, 2005), des poissons (Akcha *et al.*, 2003; Winter *et al.*, 2004; Cavas & Könen, 2007), des amphibiens (Clements *et al.*, 1997; Feng *et al.* 2004; Mouchet *et al.*, 2006), des oiseaux (Pastor *et al.*,

2001; Baos *et al.*, 2006), des mammifères (Valverde *et al.*, 2002; Bajpayee *et al.*, 2006) dont l'Homme (Chen *et al.*, 2006; Piperakis *et al.*, 2006; Bakare *et al.*, 2007).

De nombreuses études ont été réalisées aussi bien chez les invertébrés aquatiques (marins et d'eau douce) que les invertébrés terrestres. L'évaluation de la génotoxicité chez les invertébrés marins et d'eau douce en utilisant le test des comètes a été passée en revue (Cotelle & Féraud, 1999; Lee & Steinert, 2003; Mitchelmore & Chipman, 1998a). Les cellules de l'hémolymph, les embryons, les branchies, les glandes digestives et les coelomocytes de moules (*Mytilus edulis*, Rank *et al.*, 2005), la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*), la palourde (*Mya arenaria*) et les annélides polychètes (*Nereis virens*) ont été utilisés pour les études de génotoxicité environnementale en utilisant le test des comètes. Les dommages à l'ADN ont également été évalués chez les vers de terre (Salagovic *et al.*, 1996; Rajaguru *et al.*, 2003) et les drosophiles (Bilbao *et al.*, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2004). Le test des comètes a été utilisé pour évaluer la mesure des dommages à l'ADN lors d'expositions sur des sites pollués en comparaison de sites références dans l'environnement. En laboratoire, il a été largement utilisé pour explorer l'effet des polluants et décortiquer les mécanismes des dommages à l'ADN (Mitchelmore & Hyatt, 2004).

Le test des comètes appliqué aux vers de terre (Annélides Oligochètes) est un outil précieux pour la surveillance et la détection des composés génotoxiques dans les écosystèmes terrestres (Salagovic *et al.*, 1996; Zang *et al.*, 2000; **Tableau 1**). Comme les vers se nourrissent du sol dans lequel ils sont en contact étroit, ils sont de bons indicateurs du potentiel génotoxique des contaminants présents dans le sol et peuvent donc être utilisés comme espèces test. Verschaeve *et al.* (1993) ont démontré une relation dose-réponse avec la mesure des dommages à l'ADN dans les coelomocytes d'*Eisenia fetida* exposés à différents contaminants comme étant une indication de la pollution du sol.

Tableau 1: Etudes utilisant le test des Comètes pour l'évaluation des dommages à l'ADN chez les Annélides exposés à des xénobiotiques.

Espèces	Xénobiotique	Cellule étudiée	Dommages à l'ADN	Référence
<i>Eisenia fetida</i>	Sols traités avec produits chimiques	Cœlomocytes	+	Verschaeve et al., 1993
<i>Eisenia fetida</i>	Sols pollués	Cœlomocytes	+	Verschaeve et al., 1995
<i>Eisenia fetida</i>	Sols issus de fours de cokerie	Cœlomocytes	+	Salagovic et al., 1996
<i>Eisenia fetida</i>	Cd, phénol, pentachlorophénol, trifluraline	Cœlomocytes	+	Bierkens et al., 1998
<i>Eisenia fetida</i>	Imidacloprid, RH-5849	Cellules du sperme	+	Zang et al., 2000
<i>Eisenia fetida</i>	Parathion	Cœlomocytes	+	Bustos-Obregon & Goicochea, 2002
<i>Eisenia fetida</i>	Sédiments de rivières polluées	Cœlomocytes	+	Rajaguru et al., 2003
<i>Eisenia fetida</i>	NiCl ₂	Cœlomocytes	+	Reinecke & Reinecke, 2004
<i>Eisenia fetida</i>	Mitomycine C, sols arrosés par eaux d'épurations	Cœlomocytes	+	Chen & Wang, 2005
<i>Eisenia fetida</i>	HAPs, Cd	Eleocytes	+	Di Marzio et al., 2005
<i>Aporrectodea longa</i>	B[a]P, lindane	Cellules intestinales	+	Martin et al., 2005
<i>Eisenia fetida</i>	Olaquinox, acide arsannique, oxytetracycline	Cœlomocytes	+	Qu et al., 2005
<i>Eisenia fetida</i>	Acétochlore	Cœlomocytes	+	Xiao et al., 2006a
<i>Eisenia fetida</i>	Sols issus de zones contaminées par industries	Cœlomocytes	+	Xiao et al., 2006b
<i>Eisenia andrei</i>	Cd, phenanthrène	Cœlomocytes	+	Zhu et al., 2006
<i>Eisenia andrei</i>	Chlorpyrifos (CPF), glyphosate (GLY)	Cœlomocytes	+ CPF - GLY	Casabé et al., 2007
<i>Eisenia fetida</i>	Sols naturels contaminés par métaux	Eléocytes	+	Di Marzio et al., 2007
<i>Amyntas diffringens</i> <i>Aporrectodea caliginosa</i> <i>Dendrodrilus rubidus</i> <i>Eisenia fetida</i> <i>Microchaetus benhami</i>	CdSO ₄	Cœlomocytes	+	Fourie et al., 2007
<i>Eisenia fetida</i>	Eaux d'épuration	Cœlomocytes	+	Qiao et al., 2007
<i>Eisenia fetida</i>	Acide arsannique	Cœlomocytes	+	Xu et al., 2007
<i>Eisenia fetida</i>	Sols arrosés par eaux d'épurations	Cœlomocytes	+	Yu et al., 2007
<i>Eisenia fetida</i>	Cr(VI)	Cœlomocytes	+	Manerikar et al., 2008a
<i>Eisenia fetida</i>	Lixiviats	Cœlomocytes	+	Manerikar et al., 2008b
<i>Eisenia fetida</i>	Sols issus d'un site contaminé par une cokerie	Cœlomocytes	+	Bonnard et al., 2009
<i>Eisenia fetida</i>	Pentachlorophénol, pyrène	Cœlomocytes	+	Cui et al., 2009
<i>Eisenia fetida</i>	Cd, Pb	Cœlomocytes	+	Li et al., 2009
<i>Eisenia fetida</i>	Endosulfan	Cœlomocytes	+	Liu et al., 2009
<i>Eisenia andrei</i>	Chlopyrifos	Cœlomocytes	+	Piola et al., 2009
<i>Eisenia fetida</i>	Colorant textile	Cœlomocytes	+	Sathya et al., 2009
<i>Eisenia fetida</i>	Atrazine	Cœlomocytes	+	Song et al., 2009
<i>Eisenia fetida</i>	Ni, Cr(III), Cr(VI)	Cœlomocytes	+	Bigorgne et al., 2010
<i>Eisenia fetida</i>	Sols issus d'un site contaminé par une cokerie	Cœlomocytes	+	Bonnard et al., 2010

Tableau 1 (suite et fin)

Espèces	Xénobiotique	Cellule étudiée	Dommages à l'ADN	Référence
<i>Lumbricus castaneus</i> <i>Dendrodrilus rubidus</i>	As	Cœlomocytes	+	Button et al., 2010
<i>Eisenia fetida</i>	Sol issu d'une zone industrielle	Cœlomocytes	+	Espinosa-Reyes et al., 2010
<i>Eisenia andrei</i>	HAPs	Cœlomocytes	+	Gandolfi et al., 2010
<i>Eisenia fetida</i>	Uranium	Cœlomocytes	+	Giovanetti et al., 2010
<i>Eisenia fetida</i>	Nanoparticules de TiO ₂ et ZnO	Cœlomocytes	+	Hu et al., 2010
<i>Eisenia fetida</i>	Triclosan	Cœlomocytes	+	Lin et al., 2010
<i>Eisenia fetida</i>	Toluène, xylène, éthylbenzène	Cœlomocytes	+	Liu et al., 2010
<i>Eisenia fetida</i>	Déchets radioactifs provenant d'une exploitation d'U	Cœlomocytes	+	Lourenço et al., 2010
<i>Eisenia fetida</i>	CdSO ₄	Cœlomocytes	+	Voua Otomo & Reinecke, 2010
<i>Eisenia fetida</i>	TNT	Cœlomocytes	+	Fuchs et al., 2011
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Cu, Cd, pentachlorophénol	Cœlomocytes	+	Klobucar et al., 2011
<i>Metaphire posthuma</i>	Cd	Cœlomocytes	+	Liang et al., 2011
<i>Eisenia fetida</i>	Sols issus d'une mine d'U	Cœlomocytes	+	Lourenço et al., 2011
<i>Pheretima peguana</i>	Cd, Pb	Cœlomocytes	+	Muangphra et al., 2011a
<i>Pheretima peguana</i>	Solution contenant de l'azadirachtine	Cœlomocytes	+	Muangphra et al., 2011b
<i>Eisenia andrei</i>	B[a]P, TCDD	Cœlomocytes	+	Sforzini et al., 2011
<i>Eisenia fetida</i>	Tétracycline, chlortétracycline	Cœlomocytes	+	Dong et al., 2012
<i>Eisenia fetida</i>	Pyrène	Cœlomocytes	+	Khan et al., 2012
<i>Eisenia fetida</i>	Triclosan	Cœlomocytes	+	Lin et al., 2012a
<i>Eisenia fetida</i>	Chlortétracycline	Cœlomocytes	+	Lin et al., 2012b
<i>Eisenia andrei</i>	Sols issus d'une mine d'U	Cœlomocytes	+	Lourenço et al., 2012
<i>Dichogaster curgensis</i>	Cendres de charbon	Cœlomocytes	+	Markad et al., 2012
<i>Pheretima peguana</i>	Glyphosate, paraquat	Cœlomocytes	+	Muangphra et al., 2012
<i>Eisenia andrei</i>	Dioxine	Cœlomocytes	+	Sforzini et al., 2012
<i>Eisenia fetida</i>	Atrazine, Cd	Cœlomocytes	+	Wang et al., 2012
<i>Eisenia fetida</i>	Cd, Pb	Cœlomocytes	+	Wu et al., 2012
<i>Eisenia fetida</i>	Cu ²⁺	Cœlomocytes	+	Xu et al., 2012
<i>Aporrectodea caliginosa</i>	Nanoparticules d'Ag	Cœlomocytes	+	Zhan, 2012
<i>Eisenia fetida</i>	Phénanthrène	Cœlomocytes	+	Khan et al., 2013
<i>Eisenia andrei</i>	Glyphosate	Cœlomocytes	+	Piola et al., 2013
<i>Eisenia andrei</i>	HAPs	Cœlomocytes	+	Vernile et al., 2013
<i>Eisenia fetida</i>	Sols contaminés par des ETMs	Cœlomocytes	+	Zheng et al., 2013

Abbreviations: HAPs = Hydrocarbures aromatiques polycycliques, B[a]P = Benzo(a)pyrène, TCDD = 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-para-dioxine, ETMs = Eléments Traces Métalliques.

Les cœlomocytes d'*E. fetida* ont montré des dommages à l'ADN croissants lorsque les vers ont été exposés à des sols provenant de sites de cokerie (Salagovic *et al.*, 1996) ou de zones industrialisées contaminées (Xiao *et al.*, 2006) et même de sédiments provenant de rivières polluées (Rajaguru *et al.*, 2003). Le parathion (insecticide) provoque des cassures des brins d'ADN lors de chaque temps et chaque dose d'exposition chez les cellules de sperme d'*E.*

fetida (Bustos-Obregon & Goicochea, 2002), tandis que des relations dose-effet sont révélées par deux pesticides, Imidacloprid et RH-5849, chez cette espèce (Zang *et al.*, 2000). Ces deux études montrent donc que des pesticides peuvent avoir des effets notables sur des espèces non cibles. Les expositions *in vitro* de cultures primaires de coelomocytes au chlorure de nickel aussi bien chez des animaux entiers exposés dans des sols OCDE contaminés ou bien chez des animaux exposés dans de la bouse de vache contaminée par des solutions contenant le chlorure de nickel montrent des cassures des brins d'ADN dues à l'exposition à des métaux lourds (Reinecke & Reinecke, 2004). Les éléocytes, une sous-population de coelomocytes, montrent des dommages à l'ADN croissants aussi bien dans des conditions *in vitro* que dans des conditions *in vivo* et peuvent être utilisés comme biomarqueurs sensibles de génotoxicité chez les vers de terre (Di Marzio *et al.*, 2005). Les cellules intestinales d'*Aporrectodea longa* exposée à des sols artificiellement contaminés par du B[a]P et/ou du lindane montrent une grande sensibilité face aux contaminants (Martin *et al.*, 2005).

Fourié *et al.* (2007) ont utilisé 5 espèces de vers (*Amyntas diffringens*, *Aporrectodea caliginosa*, *Dendrodriulus rubidus*, *Eisenia fetida* et *Microchaetus benhami*) pour étudier la génotoxicité, de concentrations subléthales de sulfate de cadmium. Des dommages à l'ADN significatifs ont été détectés chez *E. fetida*, *D. rubidus* et *A. caliginosa*. L'étude a montré des différences dans la sensibilité des espèces présentes dans un environnement et son influence sur l'évaluation du risque génotoxique.

En 2012, Wu *et al.* ont exposé *E. fetida* à des sols contaminés par des solutions contenant du Cd (0-10 mg.kg⁻¹) et/ou du Pb (5-500 mg.kg⁻¹). La version alcaline du test des comètes a été appliquée sur les coelomocytes. Les deux métaux entraînent des dommages à l'ADN importants, le Cd étant plus nocif que le Pb. Lors des mélanges de Cd et Pb, la combinaison des faibles concentrations de Cd et de Pb entraîne des dommages à l'ADN plus importants que la combinaison des fortes concentrations de métaux. Ainsi, les dommages à l'ADN sont

importants chez les organismes exposés au Cd puis chez ceux exposés aux mélanges Cd/Pb et chez ceux exposés au Pb.

I.2.3) Test des comètes chez les végétaux supérieurs

L'utilisation des plantes dans les tests biologiques est une aide afin de détecter des contaminations génotoxiques dans l'environnement (Maluszynska & Juchimiuk, 2005). Les systèmes végétaux peuvent fournir des informations à propos d'une large gamme de dommages génétiques comprenant les mutations et les aberrations chromosomiques. Les cellules mitotiques des racines ont été utilisées pour détecter la clastogénicité potentielle de polluants, plus particulièrement pour la surveillance *in situ* des contaminants de l'eau. Ainsi, les racines de *Vicia faba* et *Allium cepa* ont longtemps été utilisées pour l'évaluation des aberrations chromosomiques (Grant, 1999) et des micronoyaux (Ma *et al.*, 1995). Lors des 10 dernières années, le test des comètes a été largement appliqué aux plantes (feuilles et racines) pour détecter les dommages à l'ADN suite à une exposition à des produits chimiques et à des métaux lourds présents dans les sols pollués (**Tableau 2**).

Tableau 2: Etudes utilisant le test des Comètes pour l'évaluation des dommages à l'ADN chez les végétaux supérieurs exposés à des xénobiotiques.

Espèces	Xénobiotique	Cellule étudiée	Dommages à l'ADN	Référence
<i>Vicia faba</i>	CdCl ₂ , K ₂ Cr ₂ O ₇ , CrCl ₃	Cellules racinaires	+	Koppen & Verschaeve, 1996
<i>Vicia faba</i>	MNU, MMS	Cellules du méristème racinaire	+	Gichner & Plewa, 1998
<i>Impatiens balsamina</i>	Cr ⁶⁺	Tige, feuilles et racines	+	Poli <i>et al.</i> , 1999
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Genotoxines	Plantules	+	Menke <i>et al.</i> , 2001
<i>Impatiens balsamina</i>	Fenarimol	Feuilles	+	Poli <i>et al.</i> , 2003
<i>Nicotiana tabacum</i>	Cd	Feuilles et racines	+ racines - feuilles	Gichner <i>et al.</i> , 2004
<i>Lupinus luteus</i>	Pb ²⁺	Racines	+	Rucińska <i>et al.</i> , 2004
<i>Glycine max</i>	Cd ²⁺	Cellules de l'hypocotyle	+	Sobkowiak & Deckert, 2004
<i>Vicia faba</i>	Cd, Imidacloprid	Racines	+	Lin <i>et al.</i> , 2005a
<i>Allium cepa</i>	Cd, Atrazine	Racines	+	Lin <i>et al.</i> , 2005b
<i>Nicotiana tabacum</i> , <i>Solanum tuberosum</i>	Cd, Cu, Pb & Zn	Noyaux des feuilles	+	Gichner <i>et al.</i> , 2006
<i>Sinapsis alba</i> <i>Triticum aestivum</i> <i>Paseolus vulgaris</i>	Phénanthrène, anthracène, fluorène	Feuilles, racines	+	Paskova <i>et al.</i> , 2006

Tableau 2 (suite et fin)

Espèces	Xénobiotique	Cellule étudiée	Dommages à l'ADN	Référence
<i>Bacopa monnieri</i>	Cd	Noyaux des feuilles et des racines	+	Vajpayee et al. 2006
<i>Phaseolus vulgaris</i>	U	Cellules racinaires et foliaires	-	Vandenhove et al., 2006
<i>Nicotiana tabacum</i>	PCBs	Noyaux des feuilles	+	Gichner al. 2007
<i>Vicia faba</i>	CdCl ₂	Cellules foliaires	+	Lin et al., 2007
<i>Allium cepa</i>	AlCl ₃	Racines	+	Achary et al., 2008
<i>Solanum tuberosum</i>	Cd	Feuilles, racines	+	Gichner al. 2008a
<i>Nicotiana tabacum</i>	Pb ²⁺	Feuilles, racines	+	Gichner al. 2008b
<i>Trifolium repens</i>	Cd	Feuilles	+	Manier, 2008
<i>Allium cepa</i>	²²⁶ Ra	Racines	+	Saghirzadeh et al., 2008
<i>Trifolium repens</i>	Endosulfan	Cellules foliaires	+	Liu et al. 2009
<i>Allium cepa</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	Nanoparticules de TiO ₂	Feuilles, racines	+	Ghosh et al., 2010
<i>Trifolium repens</i>	Lixiviats	Cellules foliaires	+	Bhat et al., 2011
<i>Vicia faba</i>	Pb(NO ₃) ₂	Cellules racinaires	+	Pourrut et al. 2011
<i>Pisum sativum</i>	K ₂ Cr ₂ O ₇	Cellules racinaires et foliaires	+	Rodríguez et al., 2011
<i>Vicia faba</i>	Arsenate	Cellules du méristème racinaire	+	Sturchio et al., 2011
<i>Allium cepa</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	Nanoparticules d'Ag	Feuilles, racines	+	Ghosh et al., 2012
<i>Trifolium repens</i>	Lixiviats de déchets industriels et banals	Cellules foliaires	+	Manier et al. 2012

Abbreviations: MNU = N-méthyl-N-nitrosourée, MMS = Méthyl méthanesulfonate, PCBs = Polychlorobiphényles.

V. faba a largement été utilisées pour la surveillance des dommages à l'ADN grâce au test des comètes. Les cassures des brins et les sites abasiques au niveau des noyaux méristématiques des racines de *V. faba* ont été étudiés lors des versions neutres et alcalines du test des comètes (Angelis *et al.*, 2000; Menke *et al.*, 2000). L'électrophorèse en conditions alcalines est plus sensible lors d'expositions à de faibles doses de polluants tandis que l'électrophorèse en conditions neutres permet de produire une courbe «dose-réponse» optimale au sein d'une plus grande gamme de doses de polluants. Gichner & Plewa (1998) ont développé une méthode sensible pour l'isolement des noyaux des tissus foliaires chez *Nicotiana tabacum*. La méthode a résulté en des valeurs faibles et constantes de «tail moment» avec une haute résolution pour les contrôles négatifs et donc pouvaient être incluses pour une surveillance environnementale *in situ*.

En 2006, Gichner *et al.* ont observé une augmentation faible mais significative des dommages à l'ADN chez les plants hétérozygotes de tabac (*N. tabacum*) et de pomme de terre

(*Solanum tuberosum*) cultivés sur des sols contaminés par des métaux lourds. Ces plants présentant des dommages à l'ADN montraient d'autres atteintes sévères (inhibition de la croissance, distorsion des feuilles), ce qui a été associé avec de la fragmentation nécrotique ou apoptotique de l'ADN. Aucun dommage à l'ADN n'a été observé dans les cellules racinaires ou foliaires de *Phaseolus vulgaris* traité avec différentes concentrations d'uranium (Vandenhove *et al.*, 2006). La plante ornementale *Impatiens balsamina* a été utilisée comme modèle afin de comprendre les effets génotoxiques du Cr⁶⁺ et des particules aériennes (Poli *et al.*, 1999). Le Cr⁶⁺ a entraîné une augmentation des cassures des brins dans les différentes parties de la plante (tige, feuilles et racines). Par conséquent, cette plante pourrait être utilisée dans des études de biosurveillance environnementale concernant la pollution atmosphérique ainsi que la contamination par des métaux lourds.

Afin d'avoir une meilleure représentativité des résultats, l'exposition des plantes à des polluants doit aussi être effectuée au niveau du sol car des synergies avec d'autres contaminants présents dans le sol sont envisageables. De même, la biodisponibilité d'un contaminant dépend de son affinité avec le sol. Vajpayee *et al.* (2006) a utilisé *Bacopa monnieri*, une plante vivant dans les zones humides, comme modèle pour l'évaluation de la génotoxicité du Cd en utilisant le test des comètes. L'exposition *in vivo* au Cd (0,01-500 µM) pendant 2, 4 et 18 h a montré des augmentations dose- et temps-dépendantes des dommages à l'ADN dans les noyaux issus des feuilles et des racines, avec les noyaux racinaires montrant des dommages plus importants que ceux des feuilles. Lors de l'exposition *in vitro* des noyaux issus des feuilles de *B. monnieri* au Cd (0,001-200 µM) montre une augmentation significative des dommages à l'ADN.

En 2009, Liu *et al.* ont évalué les dommages à l'ADN au niveau des feuilles de plants de *Trifolium repens* exposés pendant 28 jours à des sols OCDE contaminés par de l'endosulfan (0-10 mg.kg⁻¹) grâce à la version alcaline du test des comètes. Les dommages à l'ADN

augmentent significativement chez les plantes exposées à l'endosulfan comparé au témoin. En 2011, Bhat *et al.* ont évalué les dommages à l'ADN au niveau des feuilles de plants de *T. repens* exposés pendant 1 mois à des sols contaminés par des lixiviats (mélange de contaminants organiques et métalliques) grâce à la version alcaline du test des comètes. Les dommages à l'ADN augmentent significativement en fonction de la concentration en métaux présent dans les lixiviats. En 2012, Manier *et al.* ont exposé des plants de *T. repens* à un sol naturel de référence artificiellement contaminé par un lixiviat de déchets industriels (0%, 25%, 50% et 100%) pendant 10 semaines. La version alcaline du test des comètes (Singh *et al.*, 1988; Gichner *et al.*, 2004) a été utilisée afin de déterminer les potentiels dommages à l'ADN observés au niveau des noyaux issus des feuilles. Des dommages à l'ADN significatifs sont observés pour les plantes exposées aux lixiviats pur et dilué à 50% ($p < 0,05$).

Ces études ont montré que les dommages à l'ADN mesurés chez des plantes en utilisant le test des comètes est un bon outil pour évaluer la génotoxicité des milieux pollués. Ainsi, une surveillance et une sélection *in situ* peuvent être accomplies. Des végétaux supérieurs peuvent être utilisés comme un test complémentaire de détection au premier niveau de dommages génétiques suite à une exposition à des xénobiotiques et/ou des matrices contaminées.

I.3) Modèles d'étude

I.3.1) *Eisenia fetida*

Le ver du fumier *Eisenia fetida* (Savigny 1826) appartient à l'embranchement des Annelides, sous-classe des Oligochètes, ordre des Haplotaxida, sous-ordre Lumbricina, famille des Lumbricidae, genre *Eisenia* et espèce *fetida*.

Ce ver présente un tégument avec un ensemble de bandes rouges foncées en alternance avec des aires intersegmentaires jaunes moins pigmentées (**Figure 1**). *E. fetida* mesure de 50 à 120 mm de long, 3 à 5 mm de large pour une masse comprise entre 200 et 500 mg à l'âge adulte. Cet animal possède un régime alimentaire de type détritivore, se nourrissant

principalement de bouse de vache ou de crottin de cheval dans un habitat de type épigé, *i.e.* vivant à la surface du sol et en particulier dans la litière. La durée de vie de ce ver est de l'ordre de 1 à 2 ans. Au laboratoire, ces vers sont élevés dans de grands bacs contenant un milieu d'élevage composé de 50% de tourbe blonde et de 50% de bouse de vache. Le pH est ajusté à $6,5 \pm 0,5$ à l'aide de carbonate de calcium. La température ambiante est maintenue à $20 \pm 2^\circ\text{C}$ et le taux d'humidité à 60% par ajout régulier d'eau distillée.



Figure 1: Photographie de l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida*. (Brulle F., 2008)

Eisenia fetida est une espèce recommandée par l'OCDE en tant qu'organisme test depuis de nombreuses années (OCDE, 1984) et à fait l'objet de plus de 1300 publications scientifiques depuis 1973. Il a été démontré que cette espèce pouvait bioaccumuler les ETMs (Grelle & Descamps, 1998; Conder & Lanno, 2000; Lock & Janssen, 2001; Conder *et al.*, 2002). Comparés à d'autres groupes taxonomiques, les lombriciens peuvent bioaccumuler de très fortes teneurs en métaux, supérieures à celles trouvées dans les sols contaminés ou non contaminés, ceci a été vérifié pour le Cd (Neuhauser *et al.*, 1995; Grelle & Descamps, 1998; Heikens *et al.*, 2001). Il a également été démontré que la quantité de métaux présents dans le corps d'individus de l'espèce *E. fetida* augmentait parallèlement à l'augmentation de la concentration en métaux du substrat (Reinecke *et al.*, 1999; Scaps *et al.*, 2002). De plus, les effets des ETMs sur les principaux traits d'histoire de vie de cette espèce sont bien

caractérisés. En effet, l'exposition à des concentrations sub-létales de métaux (représentatives des concentrations présentes dans un sol naturel fortement contaminé) engendre des effets sur les principaux traits d'histoire de vie tels que la survie, la reproduction et/ou la croissance. De très nombreuses études ont montré l'existence d'une plus forte mortalité, d'une maturité sexuelle retardée, d'une réduction de la production de cocons de pontes et d'une croissance ralentie (Spurgeon & Hopkin, 1996; Fischer & Molnar, 1997; Helling *et al.*, 2000; Nahmani *et al.*, 2007). Cependant, bien qu'étant considérée comme une espèce modèle en écotoxicologie, *E. fetida* a fait l'objet de très peu d'études au niveau moléculaire (71 au total). En effet, jusqu'en septembre 2013, seulement 221 séquences nucléotidiques et 174 séquences protéiques étaient déclarées dans les banques de données (GenBank™), ce qui est très peu compte tenu de son statut d'espèce recommandée par l'OCDE.

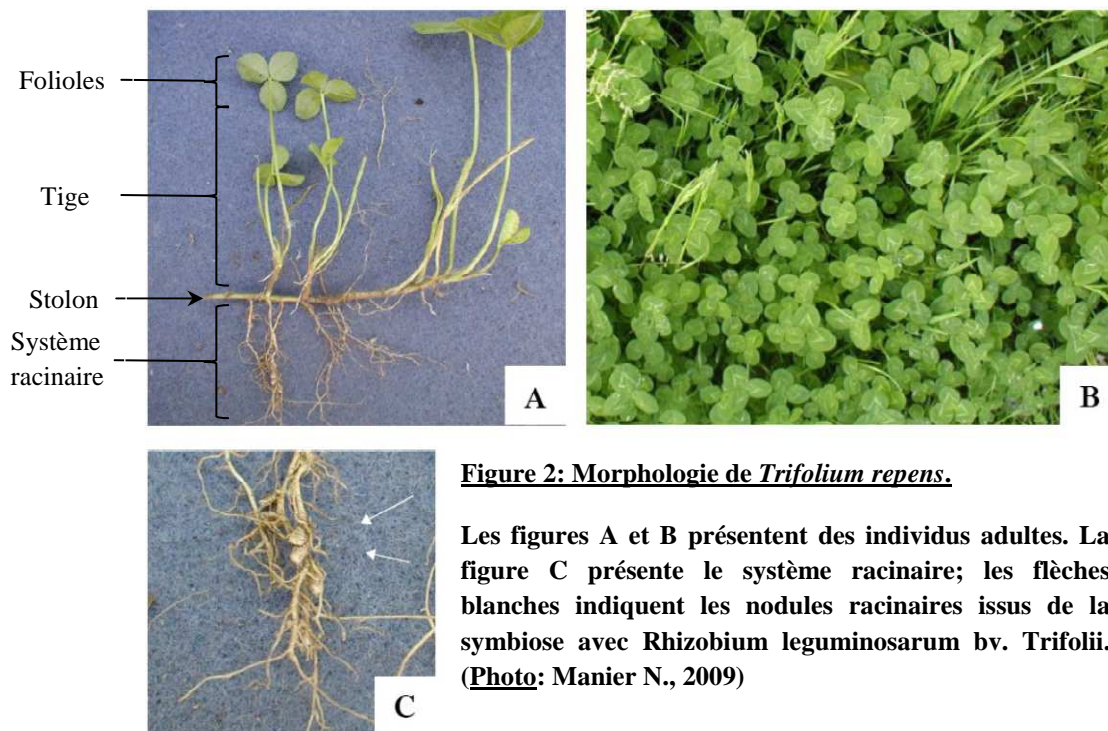
1.3.2) *Trifolium repens*

Trifolium repens est l'une des Fabaceae du genre *Trifolium* les plus importantes sur le plan agronomique. Il existe un très grand nombre de cultivars (variétés) ayant chacun ses propres traits d'adaptation (Voisey *et al.*, 1994).

Sur le plan génétique, *T. repens* est une espèce allotétraploïde obligatoire, possédant un nombre de $2n = 4x = 32$ chromosomes, et pouvant avoir une forte hétérogénéité génétique (Williams, 1987; Ansari *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2003). L'héritage chromosomique issu du croisement de différents génomes se trouve être disomique, *i.e.* comportement des paires de chromosomes pendant la méiose similaire aux paires non homologues de chromosomes chez les diploïdes (Voisey *et al.*, 1994). La forte hétérogénéité d'un point de vue génétique, à la fois au sein des populations et entre les populations, permet à *T. repens* de s'adapter facilement à des micro-environnements compétitifs, et explique pourquoi les croisements naturels entre *T. repens* et d'autres espèces du genre *Trifolium* sont très limités et par conséquent n'engendrent pas la formation d'hybrides (Voisey *et al.*, 1994).

D'un point de vue morphologique, *T. repens* est une espèce très variable, presque glabre, tapissante, se propageant par tiges rampantes ou stolons, radicales aux noeuds (Lane *et al.*, 2000). Le stolon a une dimension pouvant aller de 10 à 40 cm. Les feuilles sont alternes, à folioles ovales à elliptiques, finement dentées, vert vif, avec souvent une marque centrale en V, de couleur plus pâle ou plus sombre (**Figure 2, A et B**). Les fleurs sont papilionacées, blanches ou roses, rarement rouges, et odorantes. Elles possèdent des dimensions pouvant aller de 7 à 10 mm de long, et sont disposées en têtes denses et sphériques, portées sur de longs et minces pédoncules. La fleur est pendante après la floraison et brunâtre. Le fruit est une gousse linéaire, saillante et bosselée non stipitée, possédant 3 à 4 graines. Les graines ont en général une couleur jaune à brun et ont une forme ovoïde à ellipsoïde. La hernie racinaire au niveau du hile atteint la base de la semence, lui conférant ainsi une forme générale de coeur. Les dimensions classiques de la graine sont 0,9-1,2 x 1,1-1,5 mm. Elle est lisse et brillante.

Comme pour la majorité des Fabacées, les racines de *T. repens* ont la capacité de former une association symbiotique avec une bactérie du genre *Rhizobium* qui lui est spécifique: *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*. Cette association symbiotique est à l'origine de la formation d'un organe spécifique, le nodule (**Figure 2, C**), permettant au végétal de fixer l'azote atmosphérique sous forme N₂. Elle contribue fortement à la fertilisation des sols et peut apporter de 100 à 200 kg d'azote par hectare (Ledgard *et al.*, 2001).



T. repens est originaire des régions méditerranéennes de l'Europe et s'est répandu à travers le reste l'Europe et l'est de l'Asie avec la migration de certaines espèces animales. La culture de *T. repens* est apparue il y a 400 ans aux Pays-Bas et a migré avec les colonisations vers différents continents dans lesquels il est maintenant naturalisé (Lane *et al.*, 1997). Son aire de répartition est vaste et s'étend aujourd'hui de la zone sub-arctique jusqu'au bassin méditerranéen et dans les régions sub-tropicales (Frame & Newbould, 1986; Williams, 1987). Il s'agit d'une espèce sauvage commune et ubiquiste. Elle se retrouve ainsi sur un grand nombre de sites pouvant avoir des faciès pédologiques très variés. Elle est fréquemment retrouvée en colonies étendues, dans les prairies, champs, bords de chemins, haies et autres zones herbeuses, et jusqu'à 2750 m d'altitude.

Le trèfle blanc peut être semé sur des sols fraîchement préparés dans une profondeur optimale de 10 à 12 mm. Il se cultive de préférence dans des sols moyennement à fortement fertiles, contenant de bonnes teneurs en phosphore et potassium et ayant un pH supérieur à 4,5 (Frame, 2003).

La variété végétale utilisée au cours de nos travaux est *Trifolium repens* bv. *Haifa* (Australie), provenant du commerce. Toutes les expérimentations ont été menées avec le même stock de graines, homogènes en taille et stockées en chambre froide à 4°C dans un conditionnement opaque, afin de conserver leur pouvoir germinatif.

SECONDE PARTIE

RESULTATS

Une exposition chronique à des éléments traces métalliques tels que le Cd et le Pb peut engendrer l'apparition d'un stress oxydatif chez les organismes exposés. Le niveau d'organisation atteint en premier par ce genre de stress est le niveau moléculaire. Ainsi, une étude des principales enzymes impliquées dans le stress oxydatif est proposée au niveau moléculaire chez les deux espèces sélectionnées, *E. fetida* et *T. repens*. Dans un premier temps, une synthèse bibliographique des travaux portant sur les mesures d'activités de ces enzymes ainsi que sur les analyses des variations des niveaux d'expression de gènes codant les protéines impliquées dans le stress oxydatif chez des espèces voisines a été réalisée (**Publication 1**). Cette synthèse a eu pour but de faire un bilan des observations recueillies jusqu'à présent et de permettre la mise en place d'une stratégie permettant d'explorer les faces cachées de ce phénomène.

Puis, des études portant sur la quantification grâce à la PCR en temps réel des niveaux d'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif ont été conduites. Afin d'obtenir des résultats robustes, une mise au point des gènes de référence pour la quantification des niveaux d'expression génique a d'abord été réalisée chez *B. oleracea*, espèce pour laquelle de nombreuses données séquences sont disponibles (Ayele *et al.*, 2005). Grâce à cette étude, le même travail a également pu être réalisé chez *T. repens* et *E. fetida* permettant ainsi d'étudier le niveau d'expression des principaux gènes impliqués dans le stress oxydatif. En effet, le stress oxydatif peut causer des dommages à l'ADN. Une évaluation des dommages à l'ADN à l'aide du test des comètes a aussi été réalisée chez nos deux espèces «test». L'application des mêmes outils chez *T. repens* et *E. fetida* permet aussi de voir si les deux espèces présentent ou non des réponses similaires par rapport à un stress métallique. L'ensemble des résultats permettra de dire si l'utilisation de différentes espèces appartenant à des niveaux trophiques différents permet d'apprécier plus efficacement la dangerosité de contaminants métalliques.

II.1) Identification de gènes de référence appropriés afin d'obtenir une quantification robuste des niveaux d'expression de gènes chez une espèce donnée.

Depuis une dizaine d'années, la PCR en temps réel (qPCR) est devenue une méthode populaire et puissante pour analyser les expressions des gènes. C'est une technique de biologie moléculaire basée sur la fluorescence qui permet de détecter et de quantifier de très faibles quantités de transcrits de gènes cibles dans une large gamme de disciplines scientifiques telles que la médecine, la microbiologie, la génétique et l'écologie (Jensen 2012; Klein 2002; Pfaffl 2010).

Afin de normaliser les résultats obtenus en qPCR, l'utilisation de gènes de référence comme contrôle interne pour la quantification relative est la plus utilisée. En effet, un ensemble de recommandations a été récemment publié afin d'augmenter la reproductibilité et la fiabilité des expériences de qPCR (Bustin *et al.*, 2009). Cette procédure est facile à réaliser et consiste à mesurer le niveau d'expression des gènes de référence et des gènes cibles dans tous les échantillons expérimentaux. Les gènes de référence codent des transcrits dont le niveau d'expression est présumé constant quelle que soit la condition expérimentale.

Afin de sélectionner et de valider des gènes de référence appropriés, de nombreux logiciels ont été développés. Les plus utilisés sont Bestkeeper (Pfaffl *et al.*, 2004), Normfinder (Andersen *et al.*, 2004) et geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002). Ces algorithmes permettent aux auteurs de calculer la stabilité du niveau d'expression et d'évaluer le nombre optimal de gènes de référence nécessaires à la normalisation des données de qPCR dans des conditions expérimentales données chez l'organisme étudié. De nombreuses études concernant la validation de gènes de référence chez des espèces modèles (*Arabidopsis thaliana* (Lilly *et al.*, 2011), *Zea mays* (Chen *et al.*, 2011), cultivars de soja (*Glycine max*) (Hu *et al.*, 2009)) et non-modèles (*Arachis spp.* (Condori *et al.*, 2011; Morgante *et al.*, 2011), *Cucumis sativus* (Migocka & Papierniak 2011), *Linum usitatissimum* (Huis *et al.*, 2010)) ont été publiées.

Le modèle utilisé dans cette étude est *Brassica oleracea* var. *viridis* (Chou fourrager). Cette plante fait partie de la famille des Brassicaceae parmi laquelle on peut retrouver *A. thaliana*, modèle végétal dont le génome a été entièrement séquencé (The *Arabidopsis* Initiative, 2000). Malgré l'importance économique et écotoxicologique de *B. oleracea*, il y a toujours un manque criant de données moléculaires dans les bases de données telles que Genbank™. Par conséquent, des gènes réputés comme étant gènes de référence (ex: gènes codant l'actine et l'ARN ribosomal 18S) ont été utilisés par défaut pour normaliser les données de qPCR. Des études réalisées chez *Brassica rapa* et *Brassica juncea* ont permis de tester différents gènes de références dans différents tissus et différents stades de développement, enrichissant ainsi la liste de gènes de référence potentiels (Qi *et al.*, 2010; Xiao *et al.*, 2012; Chandna *et al.*, 2012).

La validation de gènes de référence a été réalisée dans cette étude afin de fournir des gènes de référence fiables et précis pour *B. oleracea*. Les expériences ont été réalisées sur des feuilles de plants âgés de 8 semaines ayant subi des stress hydrique et thermique pendant 8 h. l'analyse de l'expression génique a été réalisée puis les données ont été soumises aux différents algorithmes afin de fournir une aide pour la sélection des gènes de référence requis pour la normalisation des données de qPCR. La méthodologie et les résultats obtenus font l'objet de la publication ci-dessous. La même approche sera rigoureusement employée par la suite chez *T. repens*, espèce pour laquelle peu d'informations moléculaires sont disponibles.

Publication 2 (Ecotoxicology, en révision)

How to identify suitable real-time PCR reference genes in a dedicated species: Example in leaves of *Brassica oleracea*

Franck Brulle^a, Fabien Bernard^{a,b}, Franck Vandebulcke^b, Damien Cuny^a & Sylvain Dumez^{a,*}

^a Université Lille Nord de France, EA 4483, Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille 2, B.P. 83, F-59006 Lille cedex, France

^b Université Lille Nord de France, LGCgE-Lille 1, Ecologie Numérique et Ecotoxicologie, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

* Corresponding author: sylvain.dumez@univ-lille2.fr

Abstract

Real-Time quantitative PCR is nowadays a standard method to study gene expression variations in various samples and various experimental conditions. However, to interpret results accurately, it is crucial to normalize the data with appropriate reference genes. In plants, numerous papers deal with identification and validation of suitable reference genes in model species. Despite *Brassica oleracea*'s culture normalization in 2000 and scientific recommendations to use this plant as a model in air pollution biomonitoring, few studies using this model have been performed at the molecular level, so far. In the present study, we have investigated eight candidate genes for their potential use as reference genes for normalization in leaves of *B. oleracea*. Expression stability of candidates was tested following drought and cold abiotic stresses. Using 3 different softwares (Bestkeeper, Normfinder and geNorm) and taking into account the entire dataset, 4 of the 8 genes (*BolC.TUB6*, *BolC.SAND1*, *BolC.UBQ2* and *BolC.TBPI*) emerged as the most stable across all treatments.

Further gene expression analysis using the drought-responsive gene, *BolC.DREB2A*, confirmed stability and reliability of the newly identified reference genes when used for normalization in the leaves of *B. oleracea*.

Identification and validation of such suitable reference genes in *B. oleracea* will provide helpful tools for interpretation of RT-qPCR dataset and will: i- set a basis for further analysis of gene expression variations; ii- improve the accuracy and reliability of gene expression analysis and iii- facilitate future development of transcriptomic studies for this ecotoxicologically-important plant.

Keywords: *Brassica oleracea* var. *viridis*, reference genes, abiotic stress, Real-time PCR.

Introduction

For more than a decade, quantitative Real-Time PCR (qPCR) has become a popular and powerful method for gene-expression analysis. This fluorescence-based molecular biology technique which has first been developed for both medical diagnosis and research, allows reliable detection and quantification of very low transcript amounts of target genes in a wide range of scientific areas such as medicine, microbiology, genetic and ecology (Jensen 2012; Klein 2002; Pfaffl 2010). Because of its high sensibility and accuracy, qPCR represents a genuine touchstone for nucleic acids quantification, especially at the mRNA level. Furthermore, it is a complementary method of choice that must be used to validate gene expression variations highlighted by microarrays and/or other transcriptomic analysis methods. Today, the high reproducibility and use simplicity mainly due to the development of ready-to-use reagents and protocols makes qPCR affordable for most of molecular biology laboratories. As a consequence, an increase of analysis methods applied was observed which underline the difficulty for authors to reach a consensus in qPCR experiments. Therefore, strong differences may appear between authors in experimentation design and data interpretations.

Recently, a set of guidelines, the «minimum information for publication of quantitative Real-Time PCR experiments» (MIQE), has been published with the aim to improve reproducibility and reliability of qPCR experiments (Bustin et al., 2009). Among the essential information to mention, the authors pointed out the normalization method, which constitutes one of the major issues in the analysis step of qPCR data. Thus, the normalization strategy, as a key element, should be clearly defined and submitted with manuscripts. To date, many approaches has been developed to normalize qPCR data but use of reference genes as internal control for relative quantification is maybe the most common. This procedure is easy to perform and consists in gene expression measurement of reference and target genes in all

experimental samples. Reference genes encode transcripts presumably expressed at a constant level throughout the experimental conditions, but many authors showed that some commonly accepted reference genes are not as stably expressed as they were thought (Lilly et al., 2011; Migocka and Papierniak 2011; Morgante et al., 2011; Chandna et al., 2012). Thus, choice of good reference genes is particularly important and whoever intends to perform gene expression analysis for any new model species and/or for any new experimental design, has to identify and validate reference genes prior any quantification. Indeed, arbitrary and empirical choice of inappropriate genes as reference in qPCR experiment, without any prior experimental validation, may lead to misinterpretation of the results (Gutierrez et al., 2008; Guénin et al. 2009).

To guide selection and validation of appropriate reference genes, numerous software have been developed and are commonly used. The most commonly used are Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004), Normfinder (Andersen et al., 2004) and geNorm (Vandesompele et al., 2002). These algorithms enable authors to calculate expression stability and assess the optimal number of reference genes that are necessary for qPCR data normalization in model organisms including plants. However, in 2008, despite the increasing number of publications using qPCR, it has been reported a lack of validation of reference genes in plants even in well-studied models species such as *Arabidopsis thaliana* (Gutierrez et al., 2008). Since then, numerous studies have been published about validation of reference genes in model and non-model plants such as: *Arabidopsis thaliana* (Lilly et al., 2011); *Arachis spp.* (Condori et al., 2011 & Morgante et al., 2011); *Zea mays* (Chen et al., 2011); *Soybean cultivars* (*Glycine max*) (Hu et al., 2009); *Cucumis sativus L.* (Migocka and Papierniak 2011) and *Linum usitatissimum L.* (Huis et al., 2010).

The genus *Brassica* belongs to the *Brassicaceae* family. They are agronomic important cruciferous that are widely cultivated around the world to provide industrial oilseed,

condiment and fodder crop. Many *Brassica* species are also important vegetable crops, among which the cole crop, *Brassica oleracea*. This species has a great diversity of morphotypes (broccoli, cauliflower, collard greens, brussels sprouts) and among them, one of the most important taxonomic variety is *viridis* (forage kale) (Warwick, 2011). Moreover, *B. oleracea* has become an ecotoxicologically important model in air pollution monitoring, especially since its culture has been standardized to assess the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in leaves (VDI-Guideline 3957/3).

Brassica genus species are close relatives of the model plant *Arabidopsis thaliana*, a small cruciferous whose 125 Mb genome was the first plant kingdom genome to be sequenced (The *Arabidopsis* Initiative, 2000) giving birth to an important functional genomic annotation effort. *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana* share a common ancestor from which they have diverged 15-20 million years ago (Yang et al., 1999). Mapping and colinearity studies have shown that parts of their corresponding genomes are characterized by an equivalent organization despite numerous chromosomal rearrangements during respective evolution of the two genera (Kowalski et al. 1994; Lagercrantz 1998; Lan et al., 2000; Qiu et al., 2009). Additionally, the level of nucleotidic conservation between two orthologous coding sequences, in the range of 75-90%, reflects the high level of similarity between the two species (Quiros et al., 2001). Consequently, *Brassica* can benefit from the numerous sequence data available in *Arabidopsis* and can also take advantage from the growing knowledge linked to many well-described functions encoded by the corresponding genes in this model plant.

Despite its economic and ecotoxicological importance as well as its close phylogenetic relationship with *Arabidopsis thaliana*, there is still a lack of genomic data available in databases such as Genbank for *B. oleracea*. Consequently, studies dealing with analysis of gene expression profile in *B. oleracea* morphotypes are pretty uncommon. Among the few publications using qPCR in *B. oleracea* varieties only traditional reference genes such as

ACTIN encoding genes (Hunter et al., 2011 ; Aiamla-or et al., 2012; Lee et al 2013) and 18S Ribosomal RNA (Muries et al., 2011) were used without prior stability evaluation. Very recently, experiments were carried out in close related species, namely *Brassica rapa* and *Brassica juncea*, to test reference genes in sets of tissue samples representing different developmental stages, stress, hormone treated conditions and cultivars (Qi et al., 2010; Xiao et al., 2012; Chandna et al., 2012). These studies provided information about reference genes testing in *Brassica* species and most importantly revealed that selection of control genes depends on the experimental conditions and is tissue-specific in *Brassicaceae*.

In the present work, we performed reference genes validation in order to provide accurate and reliable reference genes for *B. oleracea*. Experiments were carried out on leaves, the recommended tissue for sampling according to the VDI-Guideline 3957 (2000). Eight weeks-old plants were either subjected to a drought or a cold stress. Based upon literature review, we analyzed expression stability of 8 putative reference genes: i- 2 genes already used as reference gene in *B. oleracea*, *BolC.ACT2* encoding an actin isoform and *BolC.45SrRNA* a precursor transcript of the 18S, 5.8S, 25S ribosomal RNAs, the internal transcribed spacers (ITS) and the external transcribed spacers (ETS) homologous to that found in *Arabidopsis thaliana* (Layat et al., 2012) and ii- 6 new candidates selected from the literature encoding an elongation factor 1-alpha (*BolC.EF1a*), a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*BolC.ALDH1*) TATA-box-binding protein 1 (*BolC.TBPI*), an ubiquitin (*BolC.UBQ2*), a SAND family protein (*BolC.SAND1*) and a β -tubulin (*BolC.TUB6*) (Chen et al., 2011; Condori et al., 2011; Lilly et al., 2011). Gene expression analysis was then performed and data were subjected to the statistical algorithms Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004), Normfinder (Andersen et al., 2004) and geNorm (Vandesompele et al., 2002) to provide help in identification of the most stable candidate reference genes required for normalization of qPCR data. From our experiments, it appeared that some of the reference

genes tested in our study are clearly not stably expressed and must be eliminated for future quantifications. In addition, the impact of the use of such unstable references for gene expression studies was further demonstrated by quantifying the expression level of a drought-responsive transcript using appropriate and inappropriate reference genes for normalization.

Material and Methods

Plant treatment and sample collection.

Culture of *Brassica oleracea* var. *viridis* (forage kale) is based on the German standard VDI 3957 (2000). Commercially available seeds were sown in pots filled with wet peat-based compost (NF U 44-551). Seedlings were transplanted into round pots, (H: 12 cm x D: 10 cm). Plants were grown and maintained in a greenhouse set at $20 \pm 2^\circ\text{C}$ with natural lighting. Eight weeks-old plants were subjected to two abiotic stresses. For the different tested conditions, 3 leaf pieces of 30 mg each were harvested from 3 plants, mixed together in a 2 mL microtube and immediately frozen in liquid nitrogen before storage at -80°C until RNA extraction. Controls (T0) were sampled the same way at the beginning of each experiment. For drought stress assays, plants were subjected to water privation and leaf samples were collected after 1, 4, 6 and 8 days. For cold stress, a group of 12 plants was placed in a cold chamber ($6^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$) for 4 hours. Leaf samples were collected after 1 hour and 4 hours. Then, the 6 remaining plants were put back at room temperature ($18^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) for 4 more hours. Leaves were sampled after 1 and 4 hours, respectively.

RNA isolation and cDNA synthesis

After grinding each frozen sample into fine powder in a 2 mL microtube using a micro-pestle, total RNA was isolated using the Plant RNeasy mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), including the on-column DNase digestion step, according to the manufacturer's protocols. Concentration and purity of the RNA samples was determined using Nanodrop

(ND-1000 Spectrophotometer; Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE, U.S.A.). All samples exhibited an absorbance ratio (absorbance at 260/280 nm) between 1.8 and 2.2. RNA integrity was then checked using a method adapted from Masek et al., 2005. Briefly, 2 µg of total RNA were denatured for 5 min at 65°C in 50% (v/v) formamide, 1X TAE, 5% (v/v) glycerol and 0.025% (w/v) bromophenol blue. After heating, samples were immediately chilled on ice before loaded on a 1% agarose gel containing 1X TAE buffer and 0.5 µg.mL⁻¹ of ethidium bromide.

Reverse transcription was performed on 1.5 µg of total RNA from each sample using the oligo(dT)₁₈ primer and the RevertAid™ H Minus First strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, St. Leon-Rot, Germany), according to manufacturer's instructions.

Determination and validation of nucleotidic sequences and primers/oligonucleotides

Specific amplification primer pairs were first designed for the 8 candidate reference genes that represent distinct functional classes and gene families (Table 1). The *Arabidopsis* coding gene sequences were recovered through the TAIR website (The *Arabidopsis* Information Resource; <http://www.arabidopsis.org>). Then, the identified *Arabidopsis* sequences served as queries in BlastX and BlastN searches in Genbank™ using “*Brassica*” as organism search term or in the publicly available *Brassica* ESTs database from the John Craig Venter Institute *Brassica* genomics database (<http://blast.jcvi.org/er-blast/index.cgi?project=bog1> ; Trick et al., 2009). For all genes, primer pairs were designed using Primer 3 software (Rozen and Skaletsky, 2000). Primers sequences and corresponding lengths of the amplicons are listed in Table 1.

Partial *Brassica oleracea*'s coding sequences were amplified by PCR with 1U of Taq DNA Polymerase (Euromedex, Souffelweyersheim, France) and 0.2 mM of each primer. Typical PCR cycling conditions were 20 sec at 95 °C, 20 sec at 55 °C, and 30 sec at 72 °C for 35

cycles. Expected size products were resolved on a 2% (w/v) agarose gel stained with ethidium bromide. Bands were cut-off from the gel and subsequently cleaned with the EZ-10 spin column DNA gel extraction kit (Biobasic, Markham, Canada). PCR products corresponding to *BolC.ACT2*, *BolC.TBP1*, *BolC.TUB6* and *BolC.UBQ2* were directly sequenced whereas those corresponding to *BolC.45SrRNA*, *BolC.EF1a*, *BolC.ALDH1*, *BolC.SAND1* and *BolC.DREB2A* were cloned into the pGEM-T Vector (Promega, Charbonnières, France). The recombinant clones were purified using EZ-10 spin column plasmid DNA kit (Biobasic, Markham, Canada) before sequencing the insert. Sequence analysis was performed using Genbank (NCBI).

Real-time PCR procedure

qPCR reactions were performed in triplicate in 96-well plates with a LightCycler 480 Real-Time PCR system using MESA Blue qPCR Master Mix Plus for SYBR Green Assay, no ROX (Eurogentec, Seraing, Belgium). Reactions were in 20 μ l volumes, containing 2 μ l of forward and reverse primer (3 μ M each primer), 2 μ l of cDNA (1.5 ng/ μ l), 10 μ l of MESA Blue qPCR Master Mix reagent and 4 μ l of RNase-DNase-free water. Oligonucleotide primer sequences used to amplify specific gene products are shown in Table 1.

Reactions were conducted with activation of the MeteorTaq DNA polymerase at 95°C for 5 min followed by amplification of the target cDNA (40 cycles of denaturation at 95°C for 3 s, annealing at 60°C for 30 s, and extension at 72°C for 10 s) and a melting curve program from 60 to 95°C increasing by 0.5°C every 10 s. Each run included a positive cDNA control and blank controls (water) with each primer pair. For gene-expression calculation, the threshold value (C_q) was determined for each target as the number of cycles at which the fluorescence rose appreciably above the background fluorescence. In the conditions here mentioned, real-time PCR amplifications with each primer pair tested led to the presence of a single product

of expected size after migration on a 2% (w/v) agarose electrophoresis gel and a single peak was observed in the melting curves using the LC480 software version 1.2 (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Amplification efficiency and gene expression stability analysis

For PCR efficiencies assessment (E) a pool of the 14 samples from the 3 experiments was used. Efficiencies and correlation coefficient (R^2) were calculated using the LC480 software v. 1.2 for each primer pair by determining the slopes of standard curves generated using a pool of 14 cDNA samples over four dilution points from a tenfold dilution series analysis (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10.000) to ensure that E ranged from 90% to 100%, $r^2 \geq 0.95$. Real-time PCR efficiencies (E) were calculated from the given slope of the standard curve according to the equation $E = 10(-1/\text{slope})$.

Levels of expression of each target gene (Tg) were determined according to previously described procedures (Brulle et al., 2006). Briefly, for each sample, the levels of expression of the target genes (Tg) were compared to the expression of the reference genes selected after gene expression analysis. Then, expression ratio (R) was calculated according to the formula $R = (E_{Tg})^{Cq_{Tg}} / (E_{ref})^{Cq_{ref}}$.

To analyze gene expression stability and rank, Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004), NormFinder (Andersen et al., 2004) and geNorm (Vandesompele et al., 2002) algorithms were used. geNorm V (pairwise variation) was performed using qbasePLUS Version 1.5. Quantification cycle Cq values collected from our experiments were analyzed directly using BestKeeper. For both NormFinder and geNorm analysis, Cq values were first converted into relative expression quantity by ΔCq method. geNorm software was also used to determine the optimal number of genes required for normalization. It starts calculating the pairwise variation (V) $V_{2/3}$ between the NF2 (including the two most stable reference genes) and the

normalization factor NF3 (including the three most stable reference genes). Then, it performs a stepwise calculation of the $V_n / n+1$ between the NF_n and the NF_{n+1} .

Statistical analysis

For statistical analysis, relative expression for genes of interest in each sample was calculated as $2^{-\Delta C_q}$, and normalized by the geometric average of $2^{-\Delta C_q}$ values for 2, 3 and 4 reference genes per sample when needed. Normal distribution of the data was tested using the Kolmogorov–Smirnov tests. Treatment effects were determined by one-way ANOVA. Statistical differences between group means were determined after correction for multiple comparisons, Tukey adjustment was used for samples subjected to abiotic stresses.

Results

Selection of candidate reference genes, amplification specificity and efficiency

Many candidate reference genes have been analyzed in various plant species so far and some have been already used for qPCR normalization. Among them, we have selected 8 genes and their stability in *Brassica oleracea* has been tested. Examination of the literature lead us to choose genes and thus the nucleotidic sequences in close related species (Aiamla-or et al., 2012; Chen et al., 2011; Condori et al., 2011; Lilly et al., 2011; Muries et al., 2011) (see Table 1 for details) to identify sequences of each listed genes from which primers were designed using the primer 3 software. Genes were named according to the nomenclature of *Brassica oleracea* genes (Østergaard and King, 2008).

Specific amplification was confirmed by presence of a single peak in melting curves obtained after each qPCR run. Neither primer dimers nor non-specific amplicons were detected in any control templates. An agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining was performed to check if a single amplification product with the expected size was amplified for

each primer couple (Fig. 1). Sequencing of each amplicon was also done to confirm the specificity of amplification of each primer pair then sequences have been submitted to Genbank (accession numbers KF218590 to KF218598).

For each candidate reference gene, quantification cycle (Cq) were obtained, then for each genes Cq values were pooled an a mean was calculated so that the expression level across all genes could be compared and has revealed differences in transcript abundance between candidate genes (Table 1 and Fig.2). These Cq values ranged from 19.90 to 28.68. *BolC.ACT2* was the most highly expressed gene with a mean of 19.90 whereas 2 genes – *BolC.TBP1* and *BolC.SAND1* - had the less abundant transcript level with mean Cq of 28.68 and 26.68 respectively. Four genes showed low Cq dispersal: *BolC.TBP1*, *BolC.TUB6*, *BolC.UBQ2* and *BolC.SAND1* The highest Cq dispersal was observed for *BolC.ALDH1* 24.34 ± 1.61 (SE).

Expression stability of candidates reference genes

Bestkeeper analysis was first performed. This Excel based tool calculates a geometric mean known as Bestkeeper Index from Cq values of candidates. Then, to estimate inter-gene relations, pair-wise correlations analyses were performed. From such correlations, the Pearson correlation coefficient (r) was calculated. Bestkeeper revealed that the best correlation were obtained for *BolC.TUB6* (r=0.814) and *BolC.UBQ2* (r=0.668) with p-values of 0.0001 for *BolC.TUB6* and a p-value of 0.005 for *BolC.UBQ2*. *BolC.TBP1* was identified as the least stable gene with r=0.049 (Fig. 3). Note that during analysis, *BolC.ALDH1* exhibited a standard deviation higher than 1 (i.e.: 1.30) and was consequently considered as inconsistent and consequently the least stable gene.

Then, Normfinder analysis was performed. This model-based approach is a visual basic application for Microsoft Excel applying a mathematical model to describe expression values measured by RT-qPCR. Normfinder determine the most stable reference gene based

upon analysis of sample subgroups variation. Genes are ranked with a stability value based on the intra- and inter-group variance. Candidates with the lower gene stability value are the most stable. In our experiment, NormFinder revealed *BolC.TUB6* and *BolC.SAND1* among the most stable genes, first and third most stable genes, respectively, *BolC.UBQ2* being the second. *BolC.EF1a*, *BolC.ACT2* and *BolC.ALDH1* were ranked as the less stable (Fig. 4).

geNorm is another visual basic application for Microsoft Excel. This measure is based on the assumption that expression ratio of two internal control gene is identical in all samples, regardless of the experimental condition or cell type (Vandesompele et al., 2002). This program calculates an internal control gene-stability measure (M) which is an arithmetic mean of all pairwise variations of a candidate with all other selected reference genes. The lowest the M-value is, the more stable the gene is. None of our selected reference genes exhibited an M-value greater than 1.5 which is the threshold above which expression of a gene is not considered stable. A well-defined rank of stability was provided by geNorm. Three genes, *BolC.SAND1*, *BolC.TUB6*, and *BolC.TBPI* had the highest stability-value (lowest M-value of 0.459, 0.475 and 0.490, respectively). *BolC.ALDH1* and *BolC.ACT2* were listed as the least stable genes with M-value of 1.031 and 0.848, respectively (Fig. 5a).

geNorm was further used to determine the optimal number of genes required for normalization across different sets of experiment. Pairwise variation (V_n/V_{n+1}) between sequential normalization factors (NF) (NF_n and NF_{n+1}) was used to estimate the suitable number of reference genes needed for normalization (Vandesompele et al., 2002). According to Vandesompele et al. (2002), we decided to use $V = 0.150$ as a cut-off value, below which the inclusion of an additional reference gene doesn't constitute a significant contribution to the normalization factor. In our experiments, inclusion of a fifth gene to the combination of four genes, *BolC.SAND1*, *BolC.TUB6*, *BolC.TBPI* and *BolC.UBQ2* produced a $V_{4/5}$ value

below 0.150 ($V4/5= 0.134$) (Fig. 5b), therefore the optimal number of reference genes that should be used for reliable gene expression normalization of target genes should be four.

Real-Time qPCR validation of references genes

The expression profile of *BolC.DREB2A*, was analyzed using the most stable (*BolC.TUB6*, *BolC.SAND1*, *BolC.UBQ2* and *BolC.TBP1*) and the least stable reference genes (*BolC.ALDH1*) identified by the Bestkeeper, Normfinder and geNorm analysis. As we determined the optimal number of reference genes that should be used for reliable normalization, expression profile of this gene was further analyzed with combinations of two, three and four control genes identified by geNorm. All gene expression results were expressed as a relative ratio of transcript amounts to the control values.

In *Arabidopsis thaliana*, *DREB2A* is a transcription factor known as a drought-responsive gene (Sakuma et al., 2006). Thus, expression of this gene in *B. oleracea* was analyzed during an 8 days drying experiment. When normalized using only one reference gene (*BolC.SAND1* or *BolC.TUB6*), *BolC.DREB2A* expression pattern was characterized by an increase of the number of transcripts after 8 days of drying, whereas expression level remains low from the beginning of the experiment until 6 days (Fig. 6A, 6B). Similar expression patterns were generated when combination of two, three or four of the most stable genes (as identified by geNorm) were considered for normalization (Figure 6C, 6D and 6E). Normalization based on the less stable genes, *BolC.ALDH1* produced a picture of *BolC.DREB2A* expression in which transcript level was characterized by an induction of its expression after 4 and 8 days whereas expression is depressed at day 1 and 6, respectively (Fig. 6F).

Discussion

During the last decade, qPCR has become more and more popular and numerous research teams have started to use this technique to gain knowledge about modifications occurring at the transcriptomic level in model and non-model organisms. However, there is still a lack of consensus about how data should be analyzed, interpreted and published. This situation may confuse readers and leads to a misunderstanding of the main outcome of publications. One of the most common ways to analyze and interpret qPCR measurements is the use of an internal control (a. k. a. reference genes) that should be expressed with minimal change of its expression variation regardless of the experimental conditions. To date, some so called reference genes are extensively used because of their involvement in basic cellular processes (cytoskeleton maintenance, translocation, etc) and prior validation of their expression stability was of minor interest. But increasingly, it has become more and more evident that their expression may be tissue-, stage- and treatment-dependent (Cruz et al., 2009; Guénin et al., 2009; Hu et al., 2009; Chandna et al., 2012). In 2009, Bustin and co-workers listed the identification and use of suitable reference genes as a requirement for good quality evaluation of qPCR data. As a result, many researchers realized the necessity of such tests and numerous papers have been published in model-organisms.

Since 2008, use of *Brassica oleracea* var. *viridis* as a biomonitoring model of air-pollution is recommended (VDI-Guideline), but to date few studies using this plant in ecotoxicology has been published. However, its phylogenetical proximity with the well-used *Brassicaceae*, *Arabidopsis thaliana*, makes this plant a promising model for pollution assessment in the ecotoxicology field. Consequently, as great potential model, there is no doubt that in the upcoming years, many studies will be performed to better understand modifications occurring at the molecular level in *B. oleracea*. To our knowledge, recent publications have been issued using both *Brassica oleracea* as a model and RT-qPCR, to

analyze gene expression modulations (Aiama-or et al., 2012; Hunter et al., 2011; Muries et al., 2011). In those studies, very common reference genes (*ACTIN* and *rRNA 18S*) have been used but no prior reference gene validations were carried out. Thus, there is a lack of data regarding reference genes expression variations in *B. oleracea*.

In this study, we sought accurate reference genes for normalization of relative gene expression analysis in *Brassica oleracea* var. *viridis* during two abiotic stresses. (i.e. drought and cold stress), that plants may experience. Indeed, abiotic stresses are known to modulate gene expression of reference genes in various plant models (Migocka and Papierniak 2011; Morgante et al., 2011 ; Xiao et al., 2012 ; Lee et al., 2013). Eight putative reference genes were selected, cloned and tested for their stability in *Brassica oleracea*. Then, analysis, selection, as well as determination of the optimal number of reference genes required for appropriate normalization across experiments were greatly simplified by usage of the statistical algorithms Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004), Normfinder (Andersen et al., 2004) and geNorm (Vandesompele et al., 2002).

Based upon transcriptional profiles of the 8 selected candidates and algorithms analyses, we concluded that gene encoding *BolC.TUB6*, *BolC.SAND1*, *BolC.UBQ2* and *BolC.TBP1* are the most stable and represent good candidates for normalization of general gene expression during an abiotic stress. Using BestKeeper, NormFinder and geNorm, we have been able to calculate and verify gene expression stability of our candidates. Interestingly, our analyses demonstrated that among the 8 reference genes tested, *BolC.TUB6* which was ranked as the most stable by BestKeeper and NormFinder, was also the second most stable by geNorm. In the opposite, *BolC.SAND1* that was ranked as the most stable by geNorm and second by NormFinder, was however not ranked among the 3 most stable genes when using BestKeeper. This difference in ranking when using these 3 programs has been previously observed in other plants (Cruz et al. 2009; de Almeida et al., 2011; Demidenko et

al., 2011) and was expected. Indeed, Bestkeeper, NormFinder and geNorm use different algorithms for their calculations. Bestkeeper is an excel-based tool that calculates both geometric means from Cq values of each candidate and pair-wise correlations between each genes by calculating a Pearson correlation coefficient to estimate inter-gene relations. Normfinder is a model-based approach for Excel that focuses on inter- and intra-groups variations and combines then into a stability value for each gene. This algorithm ranks the top genes with minimal estimated inter- and intra-group variation. geNorm is a visual basic application for Microsoft Excel. As opposed to Normfinder, the geNorm measure is based on the assumption that expression ratio of two internal control genes is identical in all samples, regardless of the experimental condition or tissue used for analysis (Vandesompele et al., 2002). This program calculate an internal control gene-stability measure (M) which is an arithmetic mean of all pairwise variations of a candidate with all other selected reference genes. The gene with the highest M-value (i.e. least stable) gets eliminated until the two most stable expressed genes remain. Candidate reference genes are ranked according to the average M-value, an optimal number of reference genes was determined and a normalization factor could be derived, based on geometric averaging of the expression level (relative quantities) of the most stable reference genes. This software also offers the possibility to calculate the optimal number of reference genes that should be used for normalization.

Because of these differences in gene expression stability assessment, it was not surprising to observe such discrepancies in our analysis. To our knowledge, no study reporting comparison of the use of these 3 softwares for evaluation of the stability of reference genes in plants has been published yet. Considering the error or at least the variations that could result from using only one reference gene for normalization and the fact that : i- the recommended numbers of reference genes that should be used for normalization is 4 according to geNorm (*BolC.SAND1*, *BolC.TUB6*, *BolC.TBP1* and *BolC.UBQ2*); ii- the 3 best candidates identified

by Normfinder are listed among the best 4 according to geNorm; iii- and that Bestkeeper ranked also *BolC.TUB6* and *BolC.UBQ2* as the 2 best reference genes; we recommend the use of the genes highlighted by geNorm as new reference genes in *B. oleracea* leaves. Indeed, robustness and capacity of this algorithm to restore the accuracy of RT-qPCR analysis has been already evidenced (Gutierrez et al., 2008).

Among the 8 putative reference genes tested in the present study, the corresponding orthologs of *BolC.TUB6*, *BolC.UBQ2*, *BolC.ALDH1*, *BolC.ACT2* and *BolC.EF1a* are widely used for normalization in gene expression analysis studies and they have been previously found to be highly stable in various plants (Nicot et al., 2005; Huis et al., 2010; Chen et al., 2011; Mafra et al., 2012; Xu et al., 2012). Our analysis showed that each program consistently ranked *BolC.ALDH1*, *BolC.ACT2* and *BolC.EF1a* as showing unstable expression during abiotic stresses in *B. oleracea*.

BolC.ALDH1 was shown to be the least stably expressed candidates (Figures 3, 4 and 5) whatever the used algorithm. This is not the first time that *GAPDH* is ranked as one of the least appropriate and thus considered as a non-reliable reference gene. Indeed, in other species such as wheat (*Triticum aestivum* L. cv Chinese Spring) and peanut (*Arachis hypogaea*), *GAPDH* expression was characterized by a low stability suggesting that its use may lead to inaccurate gene expression profiles when used for data normalization in stress-stimulated plants (Long et al., 2010; Morgante et al., 2011). More interestingly, our finding is in accordance with a recent study performed in *Brassica juncea*, wherein *GAPDH* was ranked last by both Normfinder and geNorm when mustard seedling were subjected to drought and cold stresses (Chandna et al., 2012). In contrast, *GAPDH* was also observed as a good reference gene in *Brassica rapa* during drought stress (Qi et al., 2010).

The present study showed also that *BolC.EF1a* and *BolC.ACT2* were poorly ranked as reference genes. *EF1 α* is an often used reference genes that has been highly recommended

during abiotic stress when normalization was needed in many plants such as potato (Nicot et al., 2005), cucumber (Migocka and Papierniak, 2011) rice (Jain et al., 2006) and *Brassica rapa* (Xiao et al., 2012), while it was observed as one of the least transcribed gene in peanut and mustard during drought stress (Morgante et al., 2011; Chandna et al., 2012).

The unreliability of *BolC.ACT2* as a reference gene in *B. oleracea* leaves was not expected and surprising since this gene, or paralogs, has been used as reference gene in earlier works (Hunter et al., 2011; Aiama-or et al., 2012; Lee et al. 2013). However, our results are in accordance with prior results that have shown that use of a gene encoding an ACTIN protein family member for normalization is not appropriate during biotic and abiotic stresses in cucumber and peanut (Migocka and Papierniak 2011; Morgante et al., 2011) and even in close related species such as *A. thaliana* (Lilly et al., 2011) and *B. juncea* (Chandna et al., 2012). In contrast, *ACTIN* was found to be a reliable reference gene in *B. rapa* leaves (Xiao et al., 2012) during abiotic stress studies including drought and cold treatments. Furthermore, in opposition to our results, *ACTIN*, *GAPDH* and to a lesser extend *EF1- α* were found to be among the most reliable reference genes in leaves of the chinese cabbage under abiotic stress (Drought stress) (Xiao et al., 2012). As demonstrated before, performance of tested reference genes may vary across plants, even between plants belonging to the same genus. These results point out that validations of reference genes in one plant do not give support to their use in other plants, as there are many evidences that those genes are not regulated the same way and might exhibit expression variation according to the studied plant and treatment applied (Chandna et al., 2012; Løvdaal and Lillo 2009; Morgante et al., 2011).

Variations observed in gene expression profiles of “commonly used” reference genes may be due to their involvement in various biological processes besides their well-known physiological function. For instance, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is known to be part of the Calvin cycle by catalyzing an NADPH-consuming reaction (Sparla et al., 2005),

but it is also involved in the oxidation-reduction and cysteine biosynthetic process, according to the gene ontology database (Carbon et al., 2009). In similar manner, varied amount of transcripts encoding ACTIN may be due because of its essential role as component of plant cytoskeleton. Moreover, it may act in many other important cellular processes among which cell-division, -shape, -growth and motility (For review see Hussey et al., 2006; Thomas et al., 2009 and Smertenko and Franklin-Tong 2011).

Following identification of the most stable reference genes from the full eight genes set, there was a need to test whether the choice or number of these genes could influence interpretation of expression profile of a target gene. Thus, we performed a normalization analysis with a well-known drought-inducible gene in *Brassicaceae*, the dehydration responsive element binding proteins-2 (*DREB2A*). (Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998; Nakashima et al., 2009; Chandna et al., 2012). Role of this gene in acquisition of tolerance against various stresses is well-documented (Nakashima et al., 2000, 2009; Sakuma et al., 2006). *DREB2A* encodes a transcription factor that interacts with a cis-acting dehydration-responsive element sequence and activates expression of many stress-target genes involved in drought-, heat- and salt-stress response and then provide better tolerance of plants to these stresses (Sakuma et al., 2006; Maruyama et al., 2009). In our experiment, after a 8 days drying experiment, whereas expression profile of *BolC.DREB2A* looked the same while using good quality reference genes alone or in combination for normalization, clear differences in transcript abundance were observed between this latter group and the expression profile of our target gene normalized by *BolC.ALDH1*. Observation of this difference was not surprising since *BolC.ALDH1* was ranked as the least stable gene both by NormFinder and geNorm and was even excluded by Bestkeeper during statistical analysis. Interestingly, this result demonstrates that our analysis was successful both in identifying good quality reference genes in *B. oleracea*, and in excluding genes that are not stably expressed during abiotic stresses.

Furthermore, *BolC.DREB2A* induction was observed after 8 days of drying for each normalization using our new identified reference genes either alone or in combination. Differences appear also in estimated transcript abundance between patterns normalized by *BolC.SAND1* and *BolC.TUB6*. When normalized against *BolC.SAND1*, transcript abundance was higher (8.5 fold induction) than against *BolC.TUB6* (6.7 fold induction), probably because *BolC.TUB6* transcript level was greater than that of *BolC.SAND1* (Figure 2). Similarly, when both genes were used in combination for normalization, higher values were obtained. This difference in transcripts abundance between the 2 reference genes might explain these results suggesting that not only the stability but also the abundance of a reference gene influence the normalization process in genes expression analysis. These results further confirmed the importance of selection of stable reference genes for the correct normalization of RT-qPCR data.

The present study reports the first validation of reference genes in leaves of forage kale, *Brassica oleracea* var. *viridis* for normalization of qPCR data. Through selection, cloning, real-time PCR testing and statistical analysis of gene expression profiles of 8 candidate reference genes in leaves subjected to drought or cold stress, our study is the first to provide appropriate reference genes for an important plant species for which use is recommended as bioindicator in air pollution assessment. The genes *BolC.TUB6*, *BolC.SAND1*, *BolC.UBQ2* and *BolC.TBP1* has been identified as the most stably expressed reference genes in *B. oleracea* leaves during abiotic stresses. They provide a basis for further reliable RT-qPCR data analysis in this species. More importantly, our results suggest that some genes commonly used as reference genes in previous study in other species such as *BolC.ACT2* and *BolC.ALDH1* are not suitable for normalization in forage kale as their use may lead to misinterpret results of a target gene. This emphasizes the importance of reference genes validation procedure for each species and by extension for each treatment plants are

subjected to. Finally, use of a combination of these 4 genes as reference genes might improve reliability of gene expression analysis by RT-qPCR in *B. oleracea*.

Acknowledgments

This study was supported by the Université Lille Nord de France, the Région Nord Pas-de-Calais, the European Union (FEDER funds) and ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie).

References:

- Aiamla-or S, Nakajima T, Shigyo M, Yamauchi N (2012) Pheophytinase activity and gene expression of chlorophyll-degrading enzymes relating to UV-B treatment in postharvest broccoli (*Brassica oleracea* L. *Italica* Group) florets. *Postharvest Biology and Technology* 63: 60-66. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.08.003>.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 64: 5245-5250. DOI: 64/15/5245 [pii] 10.1158/0008-5472.CAN-04-0496.
- Brulle F, Mitta G, Cocquerelle C, 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. *Environ Sci Technol* 40: 2844-2850.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-622. DOI: [clinchem.2008.112797](https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797) [pii] 10.1373/clinchem.2008.112797.
- Carbon S, Ireland A, Mungall CJ, Shu S, Marshall B, Lewis S, Hub A, Group WPW (2009) AmiGO: online access to ontology and annotation data. *Bioinformatics* 25: 288-289. DOI: 10.1093/bioinformatics/btn615.
- Chandna R, Augustine R, Bisht NC (2012) Evaluation of candidate reference genes for gene expression normalization in *Brassica juncea* using real time quantitative RT-PCR. *PLoS One* 7: e36918. DOI: 10.1371/journal.pone.0036918.
- Chen K, Fessehaie A, Arora R (2012) Selection of Reference Genes for Normalizing Gene Expression During Seed Priming and Germination Using qPCR in *Zea mays* and *Spinacia oleracea*. *Plant Molecular Biology Reporter* 30: 478-487. DOI: 10.1007/s11105-011-0354-x.
- Chen L, Zhong HY, Kuang JF, Li JG, Lu WJ, Chen JY (2011) Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta* 234: 377-390. DOI: 10.1007/s00425-011-1410-3.
- Condori J, Nopo-Olazabal C, Medrano G, Medina-Bolivar F (2011) Selection of reference genes for qPCR in hairy root cultures of peanut. *BMC Res Notes* 4: 392. DOI: 10.1186/1756-0500-4-392.
- Cruz F, Kalaoun S, Nobile P, Colombo C, Almeida J, Barros LG, Romano E, Grossi-de-Sá M, Vaslin M, Alves-Ferreira M (2009) Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Molecular Breeding* 23: 607-616.
- de Almeida MR, Ruedell CM, Ricachenevsky FK, Sperotto RA, Pasquali G, Fett-Neto AG (2010) Reference gene selection for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction normalization during in vitro adventitious rooting in *Eucalyptus globulus* Labill. *BMC Mol Biol* 11: 73. DOI: 10.1186/1471-2199-11-73.

Demidenko NV, Logacheva MD, Penin AA (2011) Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR in buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) based on transcriptome sequence data. PLoS One 6: e19434. DOI: 10.1371/journal.pone.0019434.

Gutierrez L, Mauriat M, Guénin S, Pelloux J, Lefebvre JF, Louvet R, Rusterucci C, Moritz T, Guerineau F, Bellini C, Van Wuytswinkel O (2008) The lack of a systematic validation of reference genes: a serious pitfall undervalued in reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in plants. Plant Biotechnol J 6: 609-618. DOI: 10.1111/j.1467-7652.2008.00346.x.

Guénin S, Mauriat M, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L (2009) Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. J Exp Bot 60: 487-493. DOI: 10.1093/jxb/ern305.

Hu R, Fan C, Li H, Zhang Q, Fu YF (2009) Evaluation of putative reference genes for gene expression normalization in soybean by quantitative real-time RT-PCR. BMC Mol Biol 10: 93. DOI: 10.1186/1471-2199-10-93.

Huis R, Hawkins S, Neutelings G (2010) Selection of reference genes for quantitative gene expression normalization in flax (*Linum usitatissimum* L.). BMC Plant Biol 10: 71. DOI: 10.1186/1471-2229-10-71.

Hunter DA, Pinkney TT, Watson LM, Trivellini A, Janssen BJ, Brummell DA, Heyes JA (2011) Effect of postharvest water deficit stress on gene expression in heads of broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Postharvest Biology and Technology 59: 113-123. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.09.010>.

Hussey PJ, Ketelaar T, Deeks MJ (2006) Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. Annu Rev Plant Biol 57: 109-125. DOI: 10.1146/annurev.arplant.57.032905.105206.

Initiative AG (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408: 796-815. DOI: 10.1038/35048692.

Jain M, Nijhawan A, Tyagi AK, Khurana JP (2006) Validation of housekeeping genes as internal control for studying gene expression in rice by quantitative real-time PCR. Biochem Biophys Res Commun 345: 646-651. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.04.140.

Jensen EC (2012) Real-time reverse transcription polymerase chain reaction to measure mRNA: use, limitations, and presentation of results. Anat Rec (Hoboken) 295: 1-3. DOI: 10.1002/ar.21487.

Klein D (2002) Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends Mol Med 8: 257-260.

Kowalski SP, Lan TH, Feldmann KA, Paterson AH (1994) Comparative mapping of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* chromosomes reveals islands of conserved organization. Genetics 138: 499-510.

Lagercrantz U (1998) Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica nigra* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements. *Genetics* 150: 1217-1228.

Lan TH, DelMonte TA, Reischmann KP, Hyman J, Kowalski SP, McFerson J, Kresovich S, Paterson AH (2000) An EST-enriched comparative map of *Brassica oleracea* and *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res* 10: 776-788.

Layat E, Sáez-Vásquez J, Tourmente S (2012a) Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 53: 267-276. DOI: 10.1093/pcp/pcr177.

Layat E, Sáez-Vásquez J, Tourmente S (2012b) Regulation of Pol I-transcribed 45S rDNA and Pol III-transcribed 5S rDNA in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 53: 267-276. DOI: 10.1093/pcp/pcr177.

Lee J, Park I, Lee Z-W, Kim S, Baek N, Park H-S, Park S, Kwon S, Kim H (2013) Regulation of the major vacuolar Ca²⁺ transporter genes, by intercellular Ca²⁺ concentration and abiotic stresses, in tip-burn resistant *Brassica oleracea*. *Molecular Biology Reports* 40: 177-188. DOI: 10.1007/s11033-012-2047-4.

Lilly ST, Drummond RS, Pearson MN, MacDiarmid RM (2011) Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 294-304. DOI: 10.1094/MPMI-10-10-0236.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406.

Long XY, Wang JR, Ouellet T, Rocheleau H, Wei YM, Pu ZE, Jiang QT, Lan XJ, Zheng YL (2010) Genome-wide identification and evaluation of novel internal control genes for Q-PCR based transcript normalization in wheat. *Plant Mol Biol* 74: 307-311. DOI: 10.1007/s11103-010-9666-8.

Løvdaal T, Lillo C (2009) Reference gene selection for quantitative real-time PCR normalization in tomato subjected to nitrogen, cold, and light stress. *Anal Biochem* 387: 238-242. DOI: 10.1016/j.ab.2009.01.024.

Mafra V, Kubo KS, Alves-Ferreira M, Ribeiro-Alves M, Stuart RM, Boava LP, Rodrigues CM, Machado MA (2012) Reference genes for accurate transcript normalization in citrus genotypes under different experimental conditions. *PLoS One* 7: e31263. DOI: 10.1371/journal.pone.0031263.

Maruyama K, Takeda M, Kidokoro S, Yamada K, Sakuma Y, Urano K, Fujita M, Yoshiwara K, Matsukura S, Morishita Y, Sasaki R, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A. *Plant Physiol* 150: 1972-1980. DOI: 10.1104/pp.109.135327.

Masek T, Vopalensky V, Suchomelova P, Pospisek M (2005) Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. *Anal Biochem* 336: 46-50. DOI: 10.1016/j.ab.2004.09.010.

Migocka M, Papierniak A (2011) Identification of suitable reference genes for studying gene expression in cucumber plants subjected to abiotic stress and growth regulators. *Mol Breeding*, 28: 343-357. DOI: 10.1007/s11032-010-9487-0

Morgante CV, Guimarães PM, Martins AC, Araújo AC, Leal-Bertioli SC, Bertioli DJ, Brasileiro AC (2011) Reference genes for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction expression studies in wild and cultivated peanut. *BMC Res Notes* 4: 339. DOI: 10.1186/1756-0500-4-339.

Muries B, Faize M, Carvajal M, Martínez-Ballesta MeC (2011) Identification and differential induction of the expression of aquaporins by salinity in broccoli plants. *Mol Biosyst* 7: 1322-1335. DOI: 10.1039/c0mb00285b.

Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiol* 149: 88-95. DOI: 10.1104/pp.108.129791.

Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000a) Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol Biol* 42: 657-665.

Nakashima K, Shinwari ZK, Sakuma Y, Seki M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000b) Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol Biol* 42: 657-665.

Nicot N, Hausman JF, Hoffmann L, Evers D (2005) Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56: 2907-2914. DOI: 10.1093/jxb/eri285.

Ostergaard L, King GJ (2008) Standardized gene nomenclature for the *Brassica* genus. *Plant Methods* 4: 10. DOI: 10.1186/1746-4811-4-10.

Pfaffl MW (2010) The ongoing evolution of qPCR. *Methods* 50: 215-216. DOI: 10.1016/j.ymeth.2010.02.005.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509-515.

Qi J, Yu S, Zhang F, Shen X, Zhao X, Yu Y, Zhang D (2010) Reference Gene Selection for Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction of mRNA Transcript Levels in Chinese Cabbage (*Brassica rapa L. ssp. pekinensis*). *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 597-604. DOI: 10.1007/s11105-010-0185-1.

Qiu D, Gao M, Li G, Quiros C (2009) Comparative sequence analysis for *Brassica oleracea* with similar sequences in *B. rapa* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 28: 649-661. DOI: 10.1007/s00299-008-0661-3.

Quiros CF, Grellet F, Sadowski J, Suzuki T, Li G, Wroblewski T (2001) *Arabidopsis* and *Brassica* comparative genomics: sequence, structure and gene content in the ABI-Rps2-Ck1 chromosomal segment and related regions. *Genetics* 157: 1321-1330.

Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132: 365-386.

Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006a) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 1292-1309. DOI: 10.1105/tpc.105.035881.

Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe Y, Qin F, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2006b) Functional analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 1292-1309. DOI: 10.1105/tpc.105.035881.

Schmidt R, Bancroft I, Warwick S (2011) *Brassicaceae in Agriculture Genetics and Genomics of the Brassicaceae*. Springer New York, pp. 33-65.

Smertenko A, Franklin-Tong VE (2011) Organisation and regulation of the cytoskeleton in plant programmed cell death. *Cell Death Differ* 18: 1263-1270. DOI: 10.1038/cdd.2011.39.

Sparla F, Zaffagnini M, Wedel N, Scheibe R, Pupillo P, Trost P (2005) Regulation of photosynthetic GAPDH dissected by mutants. *Plant Physiol* 138: 2210-2219. DOI: 10.1104/pp.105.062117.

Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997) *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 1035-1040.

Thomas C, Tholl S, Moes D, Dieterle M, Papuga J, Moreau F, Steinmetz A (2009) Actin bundling in plants. *Cell Motil Cytoskeleton* 66: 940-957. DOI: 10.1002/cm.20389.

Trick M, Cheung F, Drou N, Fraser F, Lobenhofer EK, Hurban P, Magusin A, Town CD, Bancroft I (2009) A newly-developed community microarray resource for transcriptome profiling in *Brassica* species enables the confirmation of *Brassica*-specific expressed sequences. *BMC Plant Biol* 9: 50. DOI: 10.1186/1471-2229-9-50.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paep A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH0034.

VDI Verein Deutscher Ingenieure (2000b): *Biologische Messverfahren zur Ermittlung und Beurteilung der Wirkung von Luftverunreinigungen auf Pflanzen (Bioindikation)*. Verfahren

der standardisierten Exposition von Grünkohl. – Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindication). Standardised exposure of green cabbage. VDI-Guideline 3957 Part 3.

Xiao D, Zhang N-W, Zhao J-J, Bonnema G, Hou X-L (2012) Validation of reference genes for real-time quantitative PCR normalisation in non-heading Chinese cabbage. *Functional Plant Biology* 39: 342-350.

Xu Y, Zhu X, Gong Y, Xu L, Wang Y, Liu L (2012) Evaluation of reference genes for gene expression studies in radish (*Raphanus sativus* L.) using quantitative real-time PCR. *Biochem Biophys Res Commun* 424: 398-403. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.06.119.

Yang YW, Lai KN, Tai PY, Li WH (1999) Rates of nucleotide substitution in angiosperm mitochondrial DNA sequences and dates of divergence between Brassica and other angiosperm lineages. *J Mol Evol* 48: 597-604.

Figure 1: Specificity of RT-qPCR. Amplified fragments were separated on an ethidium bromide staining 2% (w/v) agarose gel. Highest marker band corresponds to 1500 bp; each following band is 100 bp less than preceding

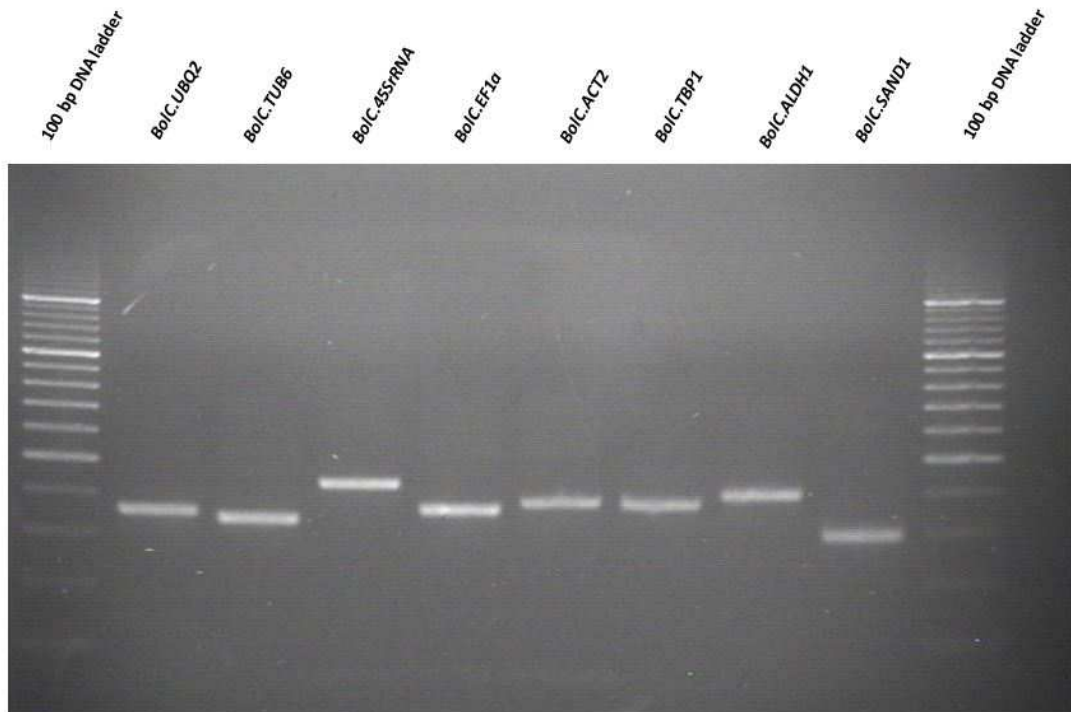


Figure 2: Box-and-whisker plot showing the expression profile of reference genes under different abiotic stress conditions. RT-qPCR expression values for candidate reference genes in *B. oleracea* leaves under drought and cold stress. Expression data are displayed as cycle threshold values for each (Cq). A line across the box depicts the median. The box indicates the 25% and 75% percentiles. Whiskers represent the maximum and minimum values.

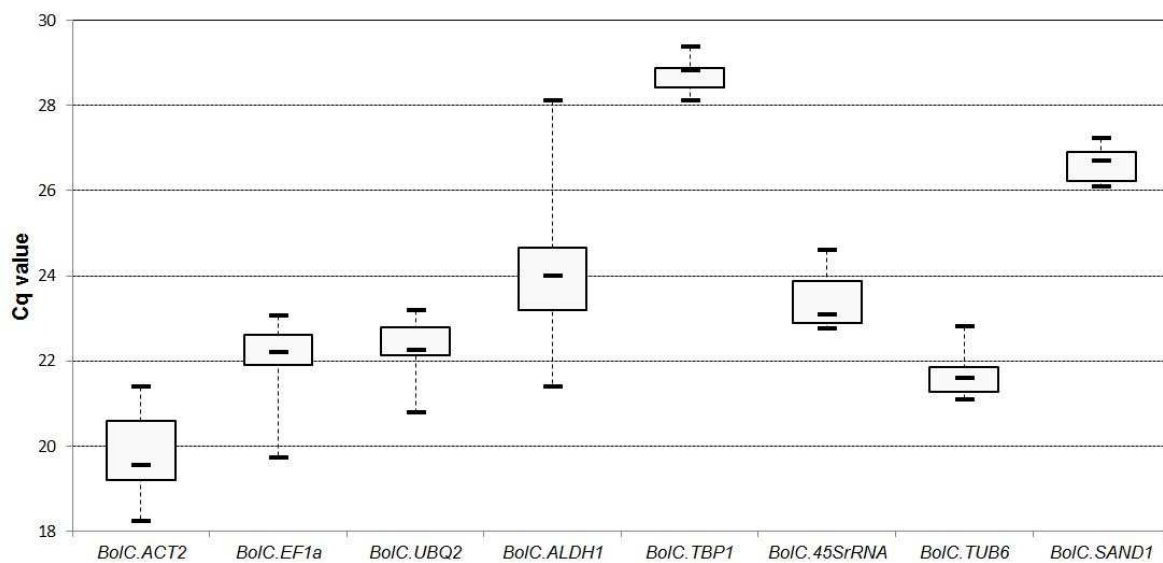


Figure 3: Bestkeeper ranking of reference genes. 7 genes are presented since *BolC.ALDH1* was excluded because of its high S.D. (>1)

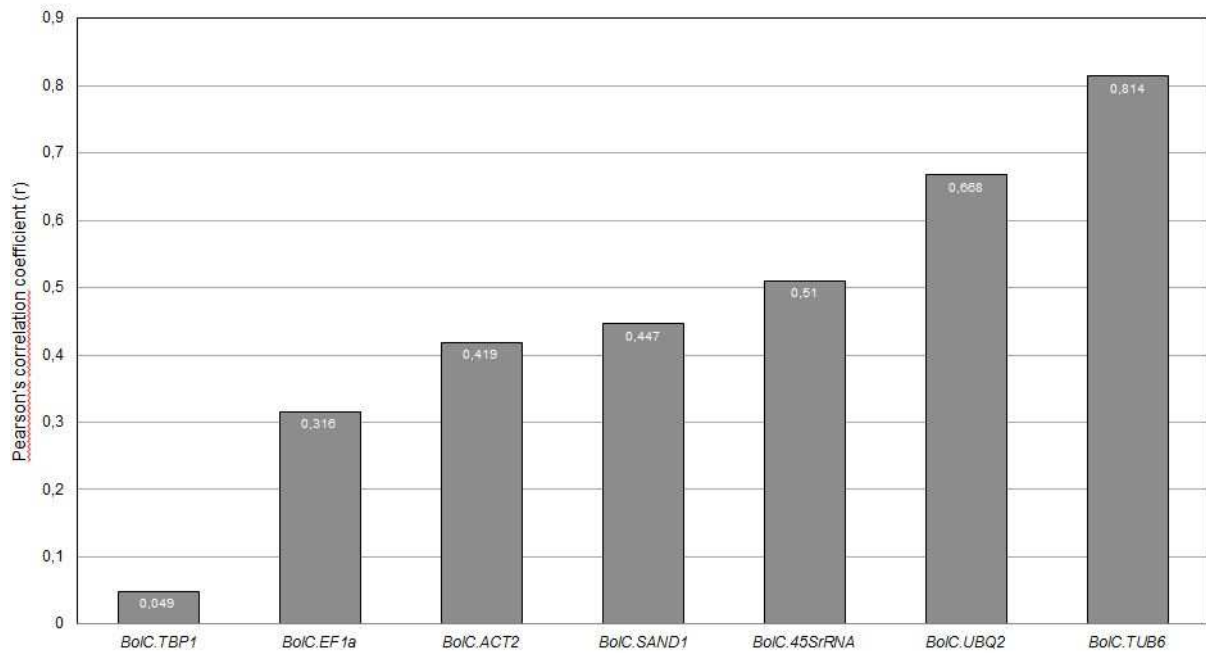


Figure 4: Normfinder ranking of reference genes. Ranking of reference genes based on their stability value

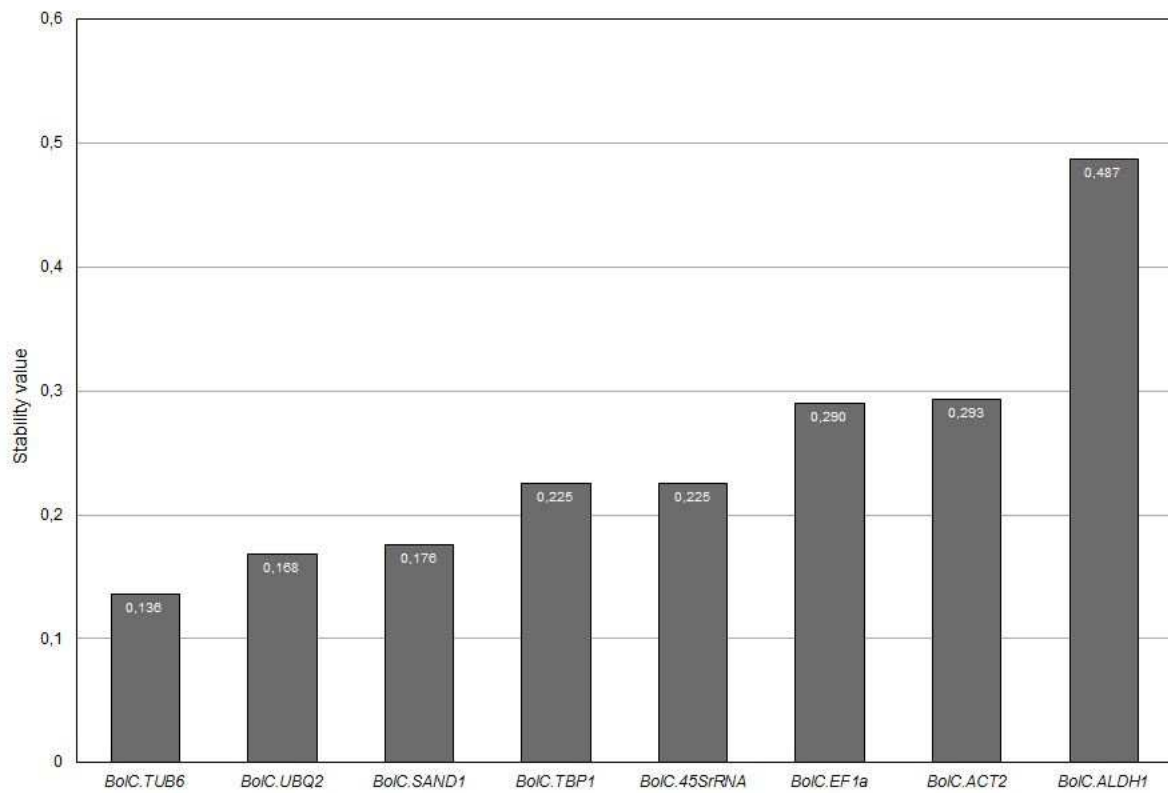


Figure 5a: GeNorm ranking of candidate reference genes. Expression stability of all 8 candidate reference genes from all samples. A lower average expression stability M value indicates more stable expression.

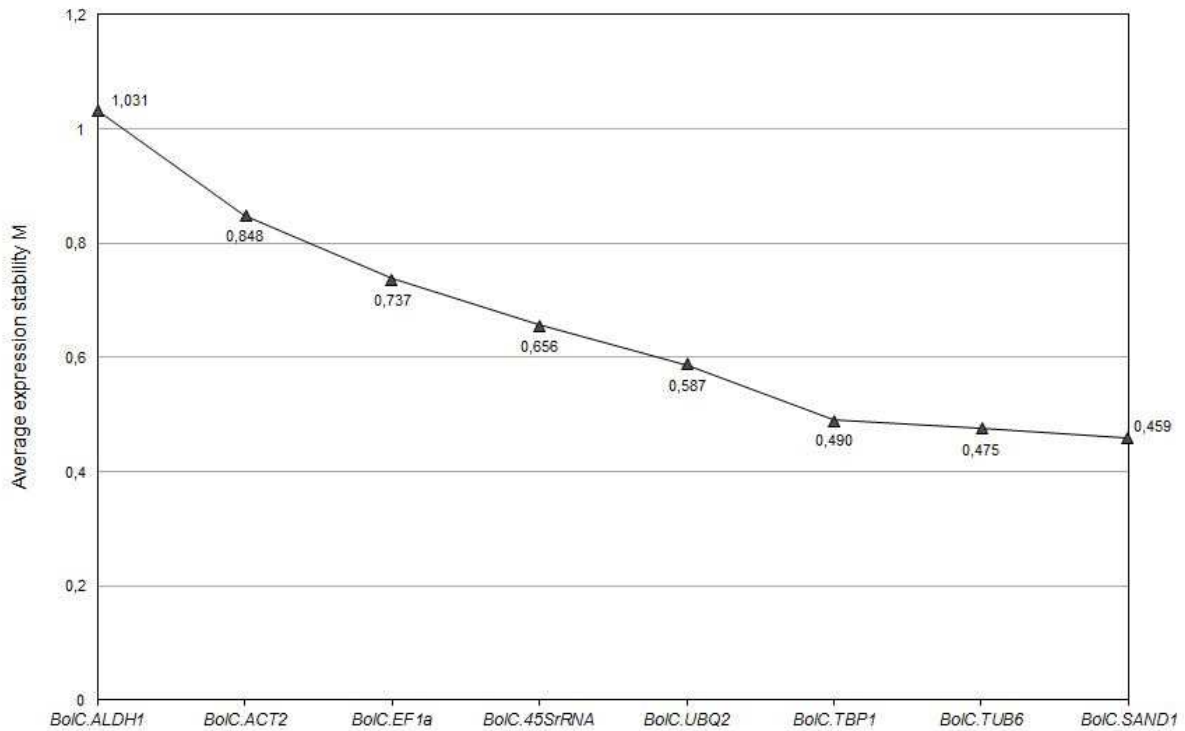


Figure 5b: Pairwise variation of the candidate genes as predicted by geNorm. The optimal number of reference genes required for effective normalization. The pairwise variation (V_n/V_{n+1}) was analyzed between the normalization factors NF_n and NF_{n+1} by geNorm program to determine the optimal number of reference genes required for RT-qPCR data normalization

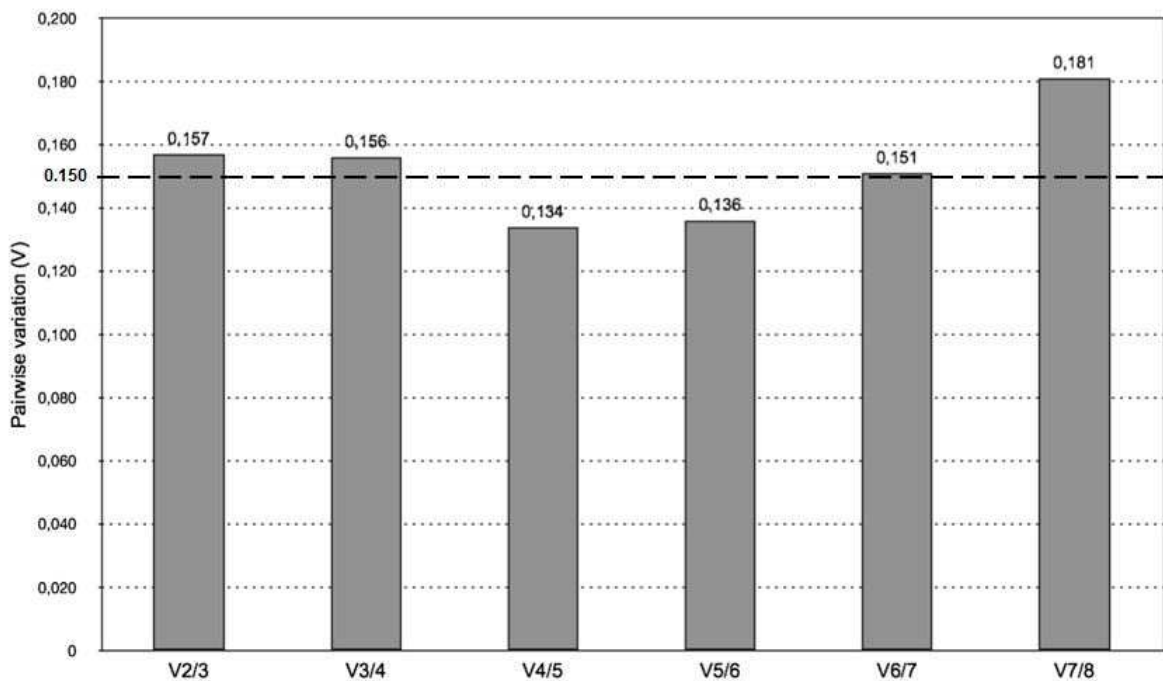


Figure 6: Relative expression of *BolC.DREB2A* during drought stress using validated reference genes for normalization. A: *BolC.SAND1*; B: *BolC.TUB6*; C: *BolC.SAND1* + *BolC.TUB6*; D: *BolC.SAND1* + *BolC.TUB6* + *BolC.UBQ2*; E: *BolC.SAND1* + *BolC.TUB6* + *BolC.UBQ2* + *BolC.TBP1*; F: *BolC.ALDH1*. The results are represented as a mean fold change in relative expression compared to the control (To). cDNA samples were taken from the same set used for gene expression stability analysis.

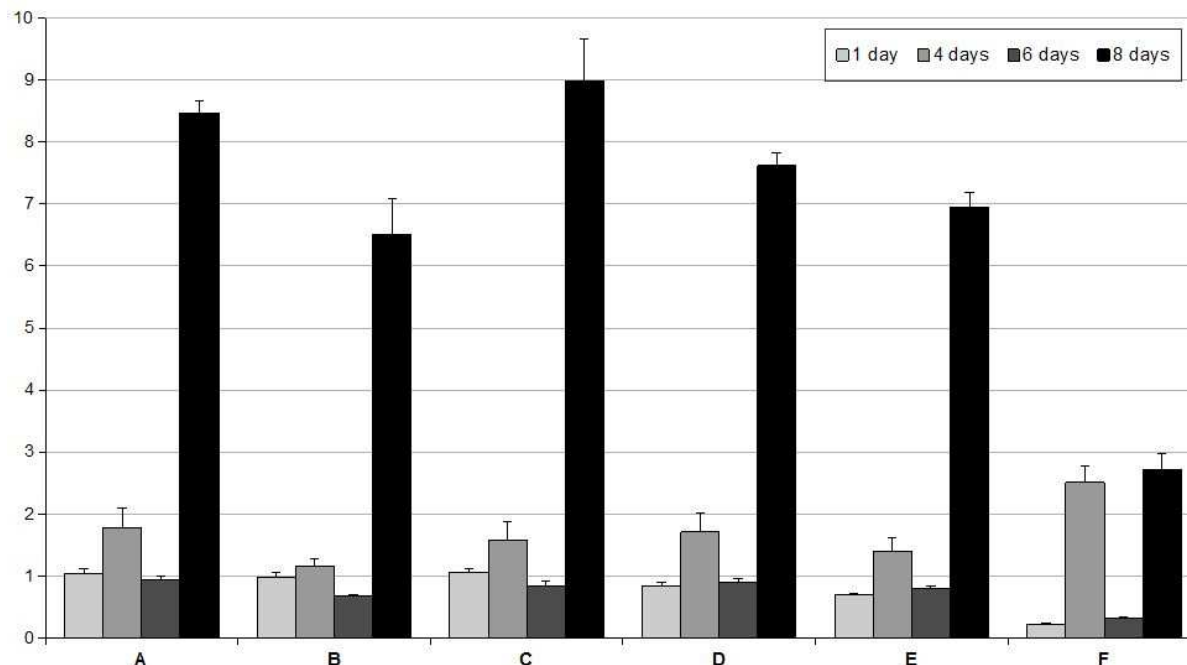


Table 1 : qPCR primer sequences of the genes used in this study, encoding Elongation Factor 1-alpha (*EF1a*), Actin (*ACT2*), Ubiquitin (*UBQ2*), ribosomal RNA 45S transcript precursor (*45SrRNA*), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*ALDH1*), TATA-box binding protein (*TBP1*), Sand family protein (*SAND1*), beta 6-tubulin (*TUB6*) and dehydration-responsive element-binding protein 2A (*DREB2A*).

Gene name ¹	Primer sequences (5' → 3')	Genbank accession Number	<i>Arabidopsis thaliana</i> ortholog accession number	<i>Arabidopsis thaliana</i> AGI identification	Primer efficiency (%)	Mean Cq (±SE)	Amplification length
<i>BolC.EF1a.a</i>	F : CAACGTCGGGTCAATG R : CATGTCCTAACAGCG	KF218590	NM_100666	At1g07920	94.85%	21.88 ± 0.96	370
<i>BolC.ACT2.a</i>	F: TCTCACTGTGCCAAT R: TCCACGTCACACTCAT	KF218591	AK318637	At3g18780	95.85%	19.90 ± 0.87	386
<i>BolC.45SrRNA.a</i>	F: TGAGGACGCTTCTCCAGACT R: AATTGCAGAATCCCGTGAAC	KF218592	X52320	N/A	100%	23.40 ± 0.58	444
<i>BolC.UBQ2.a</i>	F: ATATTCGTGAAGACGCTG R: CTCAACTGGTGTGCTG	KF218593	AY056360	At2g36170	98.45%	22.34 ± 0.68	359
<i>BolC.ALDH1.a</i>	F: TCTCGTGTATCGAAGATTG R: CTAAGACTACCTTAACCGCA	KF218594	NM_127989	At2g24270	94.95%	24.34 ± 1.61	398
<i>BolC.TBP1.a</i>	F: AACATTGTGTCGACGGTGAA R: ATTAGCCCCGGAACAACCTC	KF218595	NM_112190	At3g13445	99.9%	28.68 ± 0.40	377
<i>BolC.SAND1.a</i>	F: GCGGCTCTGGTATTGTT R: CAATGCGAATCCTGCAATC	KF218596	NM_128399	At2g28390	96.6%	26.68 ± 0.39	294
<i>BolC.TUB6.a</i>	F: GGAATGGATACCGAACAACG R: CAACGCTAGTCTCAGCAGCA	KF218597	NM_121263	At5g12250	95.75%	21.71 ± 0.44	345
<i>BolC.DREB2A.a</i>	F: GCGAAAGGGTCCAAGAAAG R: TGAACACGCCCACTAGTC	KF218598	NM_001036760	At5g05410	100%	28.97 ± 1.98	312

The primers were designed based on the published sequences with genbank accession number; their corresponding *A. thaliana* ortholog accession number and AGI identifier; their corresponding PCR efficiencies (mean ± standard deviations) and amplicon length are provided in the table

¹Gene nomenclature according to Østergaard and King (2008).

II.2) Etude au niveau transcriptionnel de protéines impliquées dans le stress oxydatif chez *Trifolium repens* et *Brassica oleracea* exposés à du Cd et du Pb

De nombreuses études chez des plantes et des animaux vivants en contact étroit avec le sol ont été réalisées afin de mieux comprendre les mécanismes d'action des contaminants, les changements au niveau physiologique tels que les mécanismes de détoxification et d'acclimatation qui sont observés lors d'un stress métallique (Cobbett, 1999; Stone *et al.*, 2001; Timmermans *et al.*, 2005; Morgan *et al.*, 2007). L'accumulation de métaux peut entraîner des perturbations au niveau des traits de vie (survie, croissance, reproduction), la chlorose chez les végétaux supérieurs, l'apoptose, l'accumulation d'EROs et l'altération de l'activité des principales enzymes impliquées dans diverses voies métaboliques (respiration, photosynthèse, stress oxydatif,...). Ainsi, l'accumulation d'EROs peut entraîner un déséquilibre entre molécules pro-oxydantes et anti-oxydantes et aboutir à un état de stress oxydatif. Dans ce cas, les activités des enzymes impliquées dans ce mécanisme peuvent être perturbées et c'est ce qui est généralement mesuré.

Dans cette étude, nous proposons de mesurer les variations des expressions de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif chez *T. repens* et *B. oleracea*. En effet, comparée à l'approche biochimique basée des mesures d'activités, l'étude des variations des niveaux d'expression génique permet de distinguer la régulation de chaque enzyme lors du stress oxydatif au niveau transcriptionnel. De plus, des variations d'expressions géniques bien identifiées peuvent ainsi être utilisées comme «biomarqueurs d'exposition».

Néanmoins, lorsque nous avons commencé ce travail, aucune donnée moléculaire concernant les candidats impliqués dans le stress oxydatif chez *T. repens* n'était présente dans les banques de données (sauf *TrMT1B*). Grâce aux données collectées chez des espèces voisines de *T. repens* (Fabaceae) et à un relativement haut degré de conservation des séquences protéiques entre espèces pour la plupart des candidats, nous avons pu cloner les gènes codant une protéine appartenant aux principales familles impliquées dans le stress

oxydatif et qui sont les plus étudiées. Ainsi, 10 candidats ont pu être clonés et séquencés. Au total, 11 gènes sont étudiés dans ce travail: six candidats cytosoliques (une peroxydase (*TrPRX22*), une métallothionéine (*TrMT1B*), une ascorbate peroxydase (*TrAPX1*), une glutathion transférase (*TrGSTU19*), une phytochélatine synthase (*TrPCS1*) et une glutathion réductase (*TrGRI*)), un candidat mitochondrial (une superoxyde dismutase manganèse (*TrMSD1*)), un candidat peroxysomal (une catalase (*TrCAT5*)) et trois candidats chloroplastiques (une superoxyde dismutase cuivre/zinc (*TrCSD2*), une glutathion peroxydase (*TrGPX7*) et une glutathion réductase (*TrGR2*)).

De plus, afin d'obtenir des résultats robustes, une normalisation des données de qPCR est nécessaire. Par conséquent, nous avons procédé à une sélection de divers gènes considérés comme gènes de référence potentiels par la littérature. Ainsi, le travail de sélection de ces gènes a été réalisé selon la méthodologie appliquée chez *B. oleracea* (Brulle *et al.*, en révision; **publication 2** de ce mémoire) et a permis de tester 7 gènes de référence potentiels: *TrEF1a1* (elongation factor 1 alpha), *TrTBP2* (TATA box binding protein), *TrACT* (actine), *TrSAND1* (SAND family protein), *TrRiboS18* (protéine ribosomale 18S), *TrTUB* (tubuline bêta) et *TrGAPDH* (glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase). Puis, une expérience a été réalisée pour valider les gènes de référence sélectionnés. Brièvement, des plants de *T. repens* ont subi des stress hydrique et thermique pendant 8 h ainsi qu'une exposition au Cd pendant 10 j. Ensuite, le niveau d'expression de chaque gène a été mesuré au niveau des feuilles. Les données de qPCR ont ensuite été soumises aux différents logiciels de normalisation (BestKeeper, NormFinder et geNorm). Selon BestKeeper, *TrEF1a1* (1^{er}), *TrTBP2* (2nd) and *TrSAND1* (3^{ème}) sont les gènes les plus stables. D'après l'analyse de NormFinder, *TrTBP2* (1^{er}), *TrEF1a1* (2nd) and *TrTUB* (3^{ème}) sont les gènes les plus stables. Enfin, selon geNorm, *TrSAND1* (1^{er}), *TrTBP2* (2nd) and *TrEF1a1* (3^{ème}) sont les gènes les plus stables. *TrEF1a1*, *TrTBP2* et *TrSAND1* ont donc été choisis comme gènes de référence chez *T. repens*.

L'analyse de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif chez *T. repens* par le biais de la qPCR est réalisée dans ce travail. L'application d'un tel outil en écotoxicologie permet d'avoir une meilleure compréhension des modes d'action des contaminants sur les organismes étudiés. L'analyse des variations des niveaux d'expression de gènes est un outil puissant en complément des méthodes classiques utilisées en écotoxicologie (ex: mesures des traits de vie, mesures des doses et des concentrations léthales de polluants, mesures des activités enzymatiques, ...) pour diagnostiquer l'existence d'un stress et surtout pour analyser d'un point de vue mécanistique la réponse à un stress.

Un de nos objectifs a donc été de mesurer les niveaux d'expression génique de candidats impliqués dans le stress oxydatif et ainsi, de pouvoir déterminer des biomarqueurs d'exposition chez un organisme vivant en contact étroit avec le sol et répondant à une pollution constituée d'un mélange de Cd et de Pb à des concentrations réalistes. Afin d'obtenir des conditions d'exposition réalistes, *T. repens* a été exposé dans des microcosmes contenant un sol de référence artificiellement contaminé par du Cd et Pb, seuls ou en mélange pendant, 3, 10 et 56 jours.

Parmi les 11 candidats sélectionnés, seuls 4 ont des niveaux d'expression exploitables dans nos conditions expérimentales: *TrGPX7*, *TrCAT5*, *TrAPX1* et *TrMT1B*. *TrGPX7* et *TrCAT5* ne montrent aucune variation du niveau d'expression quels que soient le temps et la condition d'exposition. *TrAPX1* et *TrMT1B* sont induits significativement après 3 jours et 56 jours d'exposition respectivement aux différentes conditions de Cd ($p < 0,05$). Ces deux candidats peuvent être utilisés comme biomarqueurs d'exposition au Cd chez *T. repens* lors de courtes et longues périodes respectivement.

Publication 3 (soumis)

Title: Oxidative stress molecular analysis in *Trifolium repens* and *Brassica oleracea* exposed to Cd and Pb.

Authors: Bernard F.^{1,2,3}, Dumez S.^{1,3}, Brulle F.^{1,3}, Lemière S.^{1,2}, Platel A.^{1,4}, Nessler F.^{1,4}, Cuny D.^{1,3}, Deram A.^{1,3,5} et Vandebulcke F.^{1,2}

¹ Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

² Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement – Université de Lille 1, Ecologie Numérique et Ecotoxicologie, F-59650 Villeneuve d'Ascq, France

³ Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques – Université de Lille 2, EA4483, 59006 Lille Cedex, France

⁴ Laboratoire de Toxicologie – Institut Pasteur de Lille, EA 4483, 59800 Lille, France

⁵ Faculté de Management de la Santé (ILIS) - Université de Lille 2, EA4483, F-59120 Loos, France

* Corresponding author : Franck Vandebulcke
Université Lille Nord de France-Lille 1
Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement EA4515
F-59655 Villeneuve d'Ascq, France
tel : + 33 3 20 33 59 99
franck.vandebulcke@univ-lille1.fr

Abstract

This study focused on gene expression analysis of oxidative stress biomarkers in *T. repens* and in *B. oleracea*. The objective of the study was to measure gene expression biomarker responses in two organisms living in close contact with soil and responding to a contamination composed of a mixture containing Cd and Pb at low concentrations. In order to expose plants in realistic conditions, *T. repens* and *B. oleracea* were exposed in microcosms to a reference soil spiked by Cd and Pb, alone or in admixture for 3, 10 and 56 days. For each

species, expression level of genes encoding most studied proteins involved in oxidative stress were quantified by real-time PCR. Among oxidative stress candidates, *TrAPX1* and *TrMT1B* showed significant up-regulation during Cd exposure (3 and 56 days of exposure respectively) whereas *BolC.MT1C*, *BolC.GSTU19* and *BolC.PRXCB* were significantly up-regulated during Cd10-Pb exposures (10 d). *TrAPX1* could be used as short-term biomarker of exposure to Cd, *BolC.MT1C*, *BolC.GSTU19* and *BolC.PRXCB* as mid-term biomarker of exposure to Cd10-Pb mixtures and *TrMT1B* could be used as long-term biomarker of exposure to Cd.

Keywords: *Trifolium repens*, *Brassica oleracea*, oxidative stress, gene expression, metal accumulation, cadmium, lead.

1) Introduction

Both natural and anthropogenic activities are responsible for causing heavy metal contamination (Dembitsky, 2003). Some of the natural sources are parent geologic rock material, volcanic outcropping or forest fires. Since more than two centuries, large quantities of metals have been released in the environment by human activities such as burning of fossil fuels, mining and smelting activities, fertilizers, pesticides, municipal wastes, sewage and car exhausts. Among these different sources of pollutants, metallurgic industries have largely contributed to the metal contamination in surrounding soils especially in the Northern part of France. Although most of the soil contaminations are located in the superficial layers, heavy metal transfer at low concentration levels have been found in some cases at up to 2 m depth (Sterckeman et al., 2000). This pollution might lead to contamination of groundwater and ultimately the regional food web with metal transfer through different trophic levels (Fritsch et al., 2010; 2011; Godet et al., 2011).

Numerous studies on plants and animals living in close contact with soils have been carried out to better understand the mechanisms of action of contaminants, the physiological changes, and the detoxification and acclimation mechanisms induced by metallic stress (Cobbett, 1999; Stone et al., 2001; Cobbett & Goldsbrough, 2002; Stürzenbaum et al., 2004; Timmermans et al., 2005; Cui et al., 2007; Morgan et al., 2007). Toxicity of heavy metals caused stunted growth of plants, leaf chlorosis and alteration in the activity of many key enzymes involved in various metabolic pathways (Arduini et al., 1996). For example, the reduction in plant growth during metal stress may be due to low water potential, hampered nutrient uptake and secondary stress such as oxidative stress (Prasad et al., 2005).

Among heavy metals, cadmium (Cd) and lead (Pb) are both part of most toxic pollutants for living organisms. Cd can be found in the air, water and soil. It is released into environment by traffic, metal-working industries, mining, as a by-product of mineral fertilizers. Although not essential for plants, Cd is easily taken up by roots in several species, with translocation and accumulation in the shoots occurring readily (Uraguchi et al., 2009). In plants, Cd can cause various symptoms of phytotoxicity such as browning of root tips, inhibition of root elongation, reduction of biomass, chlorosis and even death, owing to its influence on different metabolic processes such as water and nutrient uptake, photosynthesis and respiration (Sanita di Toppi & Gabbrielli, 1999; Wojcik & Tukiendorf, 2004; Mohanpuria et al., 2007). Cd toxicity has been attributed to several factors, i.e. the blockage of essential functional groups in biomolecules (Schützenbüdel & Polle, 2002), displacement of essential metal ions from enzymes (Rivetta et al., 1997) and enhanced accumulation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical (OH^{\bullet}) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Romero-Puertas et al., 2004; Ranieri et al., 2005; Iannone et al., 2010). To limit and circumscribe Cd toxicity, plants provide several cellular defense mechanisms such as plasma

membrane exclusion, vacuolar compartmentalization and cell wall immobilization (Sanita di Toppi & Gabbrielli, 1999).

Pb is known to pose significant risks to human, animal and plant health (Sharma & Dubey, 2005; Schell et al., 2010). This is a toxic heavy metal released in the natural environment from a variety of anthropogenic sources including mining, agricultural and industrial activities (Sharma & Dubey, 2005). Pb contamination in soils negatively affects growth and development of vegetation and induces toxicity resulting in physiological disorders (Sharma & Dubey, 2005; Lamb et al., 2010). Crops grown in Pb-contaminated soils are severely affected, and their yield is greatly reduced (Sharma & Dubey, 2005). Pb negatively affects the growth and metabolism in crop plants like tomato (Kratovalieva & Cvetanowska, 2001), pea (Malecka et al., 2009), Indian mustard (Meyers et al., 2008), sunflower (Kastori et al., 1992) and rice (Verma & Dubey, 2003). Most of these studies have investigated the Pb-induced oxidative damage and the associated changes in the antioxidant mechanism (Kastori et al., 1992; Kratovalieva & Cvetanowska, 2001; Verma & Dubey, 2003; Malecka et al., 2009).

Heavy metal uptake and accumulation by higher plants depends on (1) the nature and speciation of metals, (2) soil factors and (3) the characteristics of the plant itself (Bargagli, 1998; Brooks, 1998). In actual fact, about 450 species from a number of different families such as Fabaceae and Brassicaceae possess the ability to tolerate very high levels of metal(loid)s in the soil and in shoots (Hassan & Aarts, 2011). The Fabaceae *Trifolium repens* and the Brassicaceae *Brassica oleracea* were chosen in this study. *T. repens* is a wild, common and ubiquitous species of agronomic interest. Indeed, it is spread over a wide geographical area (sub-arctic zone to sub-tropical regions) and is able to establish a root symbiosis (nodules) with atmospheric nitrogen-fixing bacteria and thus contributing to soil fertilization with nitrogen. *T. repens* is increasingly used in studies focusing on metal contaminated soils. This species is also tolerant to the presence of metals (Bidar et al., 2007;

2009). Recently, Manier et al. (2009a) have adapted the micronucleus test in *T. repens* and have made measurements of enzymatic activities (Manier et al., 2012).

B. oleracea is commonly used in biomonitoring for the accumulation of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) (German standard VDI 3957, 2000; 2007). Mechanisms of accumulation of light organic compounds and their mechanisms of action at the cellular and tissue levels (generation of oxidative stress (malondialdehyde (MDA), ascorbate peroxidase (APX) and glutathione peroxidase (GPX)), genotoxicity (comet assay)) have been studied (Rzepka, 2007). This species is also used in phytoremediation of metal contaminated soils (Shahandeh & Hossner, 2002b; Kusznierevicz et al., 2012). This plant, which is in close contact with the soil by its roots, is also able to accumulate Zn and Cd in the shoots which have a large leaf area (Kusznierevicz et al., 2012).

This study focused on gene expression analysis of oxidative stress biomarkers in *T. repens* and in *B. oleracea*. The use of biochemical and molecular biology techniques applied to ecotoxicology allows a better understanding of the modes of action of contaminants in living organisms. Indeed, expression profiles elucidate the effect of environmental stressors on the genome and its products. Thus, analysis of changes of gene expression is a powerful tool to (1) diagnose the existence of a stress and to (2) analyze mechanistically the response to a stressor.

Fundamentally, the objective of the study was to measure gene expression biomarker responses in two organisms living in close contact with soil and responding to pollution composed of a mixture of both Cd and Pb at low concentrations. In order to work in a more realistic context, *T. repens* and *B. oleracea* were exposed in microcosms to a reference soil spiked by Cd and Pb, alone or in admixture for 3, 10 and 56 days.

2) Material and Methods

2.1) Plant materials and growth conditions

2.1.1) *Trifolium repens* cv *Haifa*

Commercially available dried seeds of white clover (*Trifolium repens* cv *Haifa*) were used to conduct the experiments. Seeds were homogeneous in size and stored in a cold chamber ($4\pm 2^\circ\text{C}$). About ten weeks before the beginning of the experiment, seeds of *T. repens* were directly sowed in boxes (length: 32 x width: 26 x height: 15 cm) containing mold (NF U 44-551) (4 g of seeds for 5 kg of mold). Then, boxes were placed in ventilated greenhouse at about 20°C and plants were watered once every day to avoid hydric stress.

2.1.2) *Brassica oleracea* var *viridis*

About ten weeks before the beginning of the experiment, seeds of forage kale (*Brassica oleracea* var *viridis*) were sowed in earthenwares containing mold (NF U 44-551). Earthenwares were placed in ventilated greenhouse at about 20°C . Mold humidity was checked and if necessary was daily corrected. When plantlets were more developed, they were transplanted in plastic flowerpots (d:12 x h:9 cm) containing mold. Plants were watered once every day to avoid hydric stress.

2.2) Soil contamination

Reference soil used is an agricultural soil collected from an urban area (town of Loos, Nord, France) and maintained at the state of fallow for ten years. This soil has already been used in previous studies (Manier et al., 2009; 2012). Physical chemistry and soil properties (Table 1) are representative of the pedo-geochemical background of most soils in Nord/Pas-de-Calais (Sterckeman et al., 2002). During this study, soil is used as a reference and is artificially contaminated with lead (Pb) and cadmium (Cd), alone or in admixture.

One month before the beginning of the experiments, about 155 kg of reference soil was sieved through a 5 mm mesh and dried at 40°C until total dehydration. Then, reference soil was divided into 14 artificially contaminated soil aliquots according to the following procedure. For contamination of reference soils by Cd, a range of four concentrations was prepared: 2.5 mg.kg⁻¹, 5 mg.kg⁻¹, 10 mg.kg⁻¹ and 20 mg.kg⁻¹ of Cd. Reference soil was contaminated with cadmium chloride (CdCl₂). For each concentration, 8 kg of soil were needed. The range of Cd-contaminated soils was prepared as followed: 521,856 mg of CdCl₂ were crushed in a mortar and mixed to 1 kg of dried reference soil. Then, this contaminated soil was transferred into a mortar trough and 15 kg of reference soil were progressively added. In order to obtain the 20 mg.kg⁻¹ Cd-contaminated soil, 8 kg of contaminated soil were simply taken and progressively watered until obtaining 15% of humidity. For the 10 mg.kg⁻¹ Cd-contaminated soil, 4 kg of contaminated soil were placed into a mortar trough and 4 kg of reference soil were progressively added. These 8 kg were progressively watered. For the 5 mg.kg⁻¹ Cd-contaminated soil, 2 kg of contaminated soil were placed into a mortar trough and 6 kg of reference soil were added. This soil was progressively watered. Finally, for the 2.5 mg.kg⁻¹ Cd-contaminated soil, 1 kg of contaminated soil was placed into a mortar trough and 7 kg of reference soil were added. Soil watering was also done. Concerning contamination of reference soil by Pb, the same methodology as for Cd was used. A range of four contaminated soils was prepared: 250 mg.kg⁻¹, 500 mg.kg⁻¹, 1000 mg.kg⁻¹ and 2000 mg.kg⁻¹ of Pb. Reference soil was contaminated with lead acetate ([Pb(CH₃COO)₂, 3H₂O]). 58.58 g of [Pb(CH₃COO)₂, 3H₂O] were needed to prepare the range of Pb-contaminated soils. Finally, for contamination of reference soil by Cd-Pb mixtures, the required amount of metallic salts was added to 8 kg of dried soil. Table 2 sums up quantities of metallic salts used for each soil of the range.

2.3) Experiment design

10 week-old plants were transplanted in plastic flowerpots (d:12 x h:9 cm) and were exposed during 3, 10 and 56 d to following ranges of conditions: Batch 1: reference soil, Cd 2.5 mg.kg⁻¹, Cd 5 mg.kg⁻¹, Cd 10 mg.kg⁻¹ and Cd 20 mg.kg⁻¹; Batch 2: reference soil, Pb 250 mg.kg⁻¹, Pb 500 mg.kg⁻¹, Pb 1000 mg.kg⁻¹ and Pb 2000 mg.kg⁻¹; Batch 3: reference soil, OECD soil, Cd-Pb 5-250 mg.kg⁻¹, Cd-Pb 5-500 mg.kg⁻¹ and Cd-Pb 5-1000 mg.kg⁻¹; Batch 4: reference soil, Cd-Pb 10-250 mg.kg⁻¹, Cd-Pb 10-500 mg.kg⁻¹ and Cd-Pb 10-1000 mg.kg⁻¹.

Plastic flowerpots were chosen in order to avoid metal adsorption to material. 500 g of dried soil were placed in each pot and a system to control soil humidity was set up to avoid roots asphyxiation due to silt and to limit leaching of soils for the long-time exposure. After transplantation, plants were watered and pots were placed in a 25 L mortar trough which contained a trickle of water. Exposure times were chosen according to a previous work (Manier et al., 2008).

For each condition and time exposure, 5 pots of *T. repens* and 3 pots of *B. oleracea* were used. At the end of each exposure time, plants were collected, and the bulk soil surrounding the roots was removed. The roots were then washed thoroughly with tap water to remove remaining soil particles and blotted dry on filter paper. The root and aerial parts of samples were separated and dried at 40°C and subsequently used for metal accumulation measurement. For gene expression studies, 3 replicates of 100 mg of leaves per sample were collected, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Finally, remaining material was used for the comet assay (see Lanier et al., submitted).

2.4) Metal accumulation

Element contents were quantified using triplicates of about ten plants for *T. repens* and triplicates of three plants for *B. oleracea* collected at the end of each exposure periods. Cd,

Pb; zinc (Zn), copper (Cu), iron (Fe), manganese (Mn) and calcium (Ca) concentrations were determined by Inductively Coupled Plasma optical Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) (Varian Liberty Series II axial view, Varian S.A., Les Ulis, France) (adapted from Demuyne et al., 2007). Calibration was done with standards for each metal (Cd: 0.5, 0.1, 0.05, 0.025, 0.01 mg.L⁻¹; Pb: 1, 0.5, 0.25, 0.1, 0.05 mg.L⁻¹) prepared in 500 mmol.L⁻¹ nitric acid (65% Suprapur, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) with a commercial standard stock solution of 1 g.L⁻¹ of Cd, Pb and Zn Titrisol (VWR). Cd, Pb and Zn contents in plant leaves (three groups of about ten plants for *T. repens* and three groups of three plants for *B. oleracea* per condition) were determined after acid digestion. Briefly, plants were ground in liquid nitrogen in order to obtain fine powder and digested for 12 h at room temperature with 1 mL of 65% of nitric acid per 100 mg (drymass). Digestion was performed by progressive heating at 120°C until half reduction of the volume and nitrous vapour removal. After cooling, 1 mL of a solution of analytical grade nitric, sulphuric and perchloric acids (10, 2, 3 V respectively) was added to samples and heating was followed at 180°C for reducing the volume. Samples were then filtered and volume was adjusted to 20 mL with ultrapure water (Milli-Q water, Millipore, Molsheim, France).

2.5) Gene expression analysis in *T. repens* and *B. oleracea*

All expression analysis were conducted on total RNA from leaves of groups of 10 individuals for *T. repens* and groups of 3 plants for *B. oleracea*, using RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions. RNA purity and integrity were conducted as previously described (Brulle et al., 2006). Then, total RNAs were reverse transcribed using Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Illkirch, France), oligo (dT) primers (18-mer) 1.5 µg total RNA for Real-Time PCR analysis.

2.5.1) Real-Time PCR

Expression levels of six genes encoding cytosolic peroxidase (*TrPRX22*), metallothionein (*TrMT1B*), ascorbate peroxidase (*TrAPX1*), glutathione transferase (*TrGSTU19*), phytochelatin synthase (*TrPCS1*) and glutathione reductase (*TrGR1*), one gene encoding a mitochondrial manganese superoxide dismutase (*TrMSD1*), one gene encoding a peroxisomal catalase (*TrCAT5*) and three genes encoding chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase (*TrCSD2*), glutathione peroxidase (*TrGPX7*) and glutathione reductase (*TrGR2*) were measured by Real-Time PCR in *T. repens*. In *B. oleracea*, eight genes encoding cytosolic metallothionein (*BolC.MT1C*), phi glutathione transferase (*BolC.GSTF2*), tau glutathione transferase (*BolC.GSTU19* and *BolC.GSTU5*), zeta glutathione transferase (*BolC.GSTZ1*), ascorbate peroxidase (*BolC.APX1*), phytochelatin synthase (*BolC.PCS1*) and glutathione reductase (*BolC.GR1*), one gene encoding a cell wall peroxidase (*BolC.PRXCB*), one gene encoding a mitochondrial manganese superoxide dismutase (*BolC.MSD1*), two genes encoding peroxisomal catalase (*BolC.CAT2*) and theta glutathione transferase (*BolC.GSTT1*) and five genes encoding chloroplastic copper/zinc superoxide dismutase (*BolC.CSD2*), glutathione peroxidase (*BolC.GPX7*), iron superoxide dismutase (*BolC.FSD3*), glutathione reductase (*BolC.GR2*) and thylakoidal bound ascorbate peroxidase (*BolC.tAPX*) were measured by Real-Time PCR. RT-PCR reactions were performed with a LightCycler[®] 480 apparatus (Roche Molecular Biochemicals, Germany) according to previously described procedure (Bernard et al., submitted). Primers used for *T. repens* candidates are presented in Table 3 and in Table 4 for *B. oleracea* candidates. For each reaction, the crossing point (CP) was determined using the LightCycler[®] 480 Software (Roche Diagnostics). PCR reactions were set in duplicate and the mean values of the CPs were calculated.

2.5.2) Relative quantification of expression levels

Expression levels and amplification efficiencies (E) of each gene, reference (Rg) and target genes (Tg) were determined according to previously described procedures (Brulle et al., 2006). Briefly, for each sample, expression levels of target genes were compared to expression of reference genes, which are constitutively expressed in our experimental conditions. For *T. repens*, *TrEF1a1* (KC710340), *TrTBP2* (KC710341) and *TrSAND1* (KC710342) were used as reference genes (Bernard et al., submitted). For *B. oleracea*, *BolC.TUB6* (KF218597), *BolC.SAND1* (KF218596) and *BolC.UBQ2* (KF218593) were used as reference genes (Brulle et al., submitted). The expression ratio was calculated according to the formula $R=(E_{Tg})^{CP_{Tg}}/(\text{geometric mean } ((E_{TrEF1a1})^{CP_{TrEF1a1}}; (E_{TrTBP2})^{CP_{TrTBP2}}; (E_{TrSAND1})^{CP_{TrSAND1}}))$ for *T. repens* and according to the formula $R=(E_{Tg})^{CP_{Tg}}/(\text{geometric mean } ((E_{BolC.TUB6})^{CP_{BolC.TUB6}}; (E_{BolC.SAND1})^{CP_{BolC.SAND1}}; (E_{BolC.UBQ2})^{CP_{BolC.UBQ2}}))$ for *B. oleracea*. These formulas allow calculation of absolute quantification of target gene expressions.

Relative quantification can be also calculated. For a given gene, it fits to ratio between absolute quantification in exposed individuals and absolute quantification in control individuals. In this case, absolute quantification can be defined as gene concentration (C). $C=E^{\text{mean}CP_{\text{cont.}}-\text{mean}CP_{\text{sample}}}$. Relative fold expression (RFE) is calculated according to the formula $RFE=C_{Tg}/(\text{geometric mean } (C_{TrEF1a1}; C_{TrTBP2}; C_{TrSAND1}))$ for *T. repens* and according to the formula $RFE=C_{Tg}/(\text{geometric mean } (C_{BolC.TUB6}; C_{BolC.SAND1}; C_{BolC.UBQ2}))$ for *B. oleracea*.

2.7) Statistical analysis

For metallic contents in plants, non-parametric Kruskal-Wallis tests followed by pair multiple comparison Dunn tests were conducted. Expression levels were compared by means of 2-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test using Statistica software (version 5.1

97). The normality of each distribution was verified by Kolmogorov-Smirnov's tests and variance homogeneity by Levene's tests. An α level of 0.05 was used in all procedures.

3) Results

3.1) Metal accumulation

3.1.1) *Trifolium repens*

Figure 1A shows Cd accumulation in leaves of *T. repens* exposed to Cd-spiked soils. An increased accumulation of Cd with increasing Cd concentration and exposure time (dose- and time-dependent relationship) was observed. During a 3-d and a 10-d exposure, Cd accumulations did not significantly increase except in leaves of plants exposed to Cd20-spiked soils ($p = 7.74 \cdot 10^{-3}$). However, accumulation of Cd in leaves increased significantly after a 56-d exposure to Cd5- ($p = 1.75 \cdot 10^{-3}$), to Cd10- ($p = 1.47 \cdot 10^{-4}$) and to Cd20-spiked soils ($p = 1.47 \cdot 10^{-4}$). Figure 1B shows that Pb accumulations in leaves of *T. repens* exposed to Pb-spiked soils were not time-dependent. Only plants exposed to Pb2000-spiked soils during 3 days showed a significant increase in Pb accumulation ($p = 2.15 \cdot 10^{-3}$).

Figure 1C shows Cd accumulation in leaves of *T. repens* exposed to soils spiked by mixtures of Cd and Pb. During a 3-d exposure to Cd5/Pb250 and Cd5/Pb500 mixtures and a 10-d exposure to Cd10/Pb mixtures, Cd accumulation in leaves of *T. repens* was higher than those exposed to 5 and 10 mg.kg⁻¹ of Cd respectively. On the other hand, Cd accumulation in remaining mixtures was lower than those exposed to 5 and 10 mg.kg⁻¹ of Cd alone. Plants exposed to Cd10/Pb1000-spiked soils during 10 days showed a significant increase in Cd accumulation ($p = 1.32 \cdot 10^{-2}$). Concerning 56-d exposures, *T. repens* exposed to mixtures containing 5 mg.kg⁻¹ of Cd showed no difference in Cd accumulation with those exposed to Cd5-spiked soils. On the other hand, *T. repens* exposed to mixtures containing 10 mg.kg⁻¹ of Cd showed significant Cd accumulation in leaves of plants exposed to Cd10/Pb250- ($p = 2.10 \cdot 10^{-3}$).

³), to Cd10/Pb500- ($p = 5.47.10^{-3}$) and to Cd10/Pb1000-spiked soils ($p = 1.44.10^{-4}$). No difference between Pb accumulation in *T. repens* exposed to single metal spiked soils and Pb accumulation in *T. repens* exposed to metal mixture spiked soils was observed.

3.1.2) *Brassica oleracea*

Figure 2A shows Cd accumulation in leaves of *B. oleracea* exposed to Cd-spiked soils. After 3-d or 10-d exposure periods, Cd was poorly accumulated in leaves whatever time and condition of exposure. However, a dose-dependent and significant increase was observed in leaves of *B. oleracea* exposed to Cd5- ($p = 1.48.10^{-4}$), to Cd10- ($p = 1.48.10^{-4}$) and to Cd20-spiked soils ($p = 1.48.10^{-4}$) during 56 days. In Pb-spiked soil exposure, Pb was poorly accumulated in leaves whatever time and condition of exposure (data not shown).

Figure 2B shows Cd accumulation in leaves of *B. oleracea* exposed to soils spiked by mixtures of Cd and Pb. During exposure to Cd and Pb mixtures, Cd accumulations in leaves of *B. oleracea* were lower than those observed in plants exposed to Cd5- and Cd10-spiked soils. However, plants exposed to Cd10-Pb mixtures show a significant accumulation of Cd in leaves of plants exposed to Cd10/Pb250- ($p = 1.04.10^{-3}$), to Cd10/Pb500- ($p = 2.07.10^{-4}$) and to Cd10/Pb1000-spiked soils ($p = 2.97.10^{-3}$) during 56 days.

3.2) Real-Time PCR

3.2.1) *Trifolium repens*

TrPCS1, *TrCSD2*, *TrMSD1*, *TrGSTU19*, *TrGR2*, *TrGR1* and *TrPRX22* expression levels were under quantification limit of LightCycler[®] 480 (Roche Molecular Biochemicals, Germany) in our experimental conditions. *TrGPX7* and *TrCAT5* did not show significant variation whatever time and condition of exposure. Figure 3A shows relative fold expression (RFE) of *TrAPX1* in leaves of *T. repens* exposed to Cd-spiked soils. For mid- and long-term exposure,

no significant variation in *TrAPX1* RFE was observed. Concerning Pb and Cd/Pb mixture exposures, no significant variation in *TrAPX1* RFE was observed. During a 3-d exposure, *TrAPX1* was significantly up-regulated in leaves of plants exposed to Cd2.5- (2.18 fold, $p = 9.67 \cdot 10^{-3}$), to Cd10- (3.03 fold, $p = 1.93 \cdot 10^{-4}$) and to Cd20-spiked soils (5.17 fold, $p = 1.80 \cdot 10^{-4}$). Figure 3B shows *TrMT1B* RFE in leaves of *T. repens* exposed to Cd-spiked soils. No significant variation in *TrMT1B* RFE during Pb and Cd/Pb mixture exposures was observed. During 3-d and 10-d exposure, *TrMT1B* RFE shows no significant variation except for the strongest Cd concentration (20 mg.kg⁻¹, $p = 1.80 \cdot 10^{-4}$). On the other hand, *TrMT1B* was significantly up-regulated in leaves of plants exposed to Cd2.5- (2.4 fold, $p = 1.97 \cdot 10^{-4}$), to Cd5- (3.38 fold, $p = 1.03 \cdot 10^{-3}$), to Cd10- (2.31 fold, $p = 1.80 \cdot 10^{-4}$) and to Cd20-spiked soils (5.68 fold, $p = 1.80 \cdot 10^{-4}$) during 56 days.

3.2.2) *Brassica oleracea*

BolC.CSD2, *BolC.GSTT1*, *BolC.GR2* and *BolC.GPX7* expression levels were under quantification limit of LightCycler® 480 (Roche Molecular Biochemicals, Germany) in our experimental conditions. However, *BolC.PCS1*, *BolC.FSD3*, *BolC.MSD1*, *BolC.GSTU5*, *BolC.GR1*, *BolC.tAPX*, *BolC.APX1* and *BolC.CAT2* expression levels were quantified by real-time PCR but no significant variations were observed in our experimental conditions (data not shown). *BolC.GSTF2* and *BolC.GSTZ1* did not show significant variation in RFE whatever time and condition of exposure. Figure 4 shows *BolC.GSTU19* (Fig. 4A), *BolC.PRXCB* (Fig. 4B) and *BolC.MT1C* (Fig.4C) RFE in leaves of *B. oleracea* exposed to Cd/Pb mixture-spiked soils. Plants exposed to Cd- and Pb-spiked soils did not show significant variation in RFE. After 3 and 56 days of exposure, *BolC.GSTU19* RFE did not show significant variation (Fig. 4A). However, after 10 days of exposure, it was significantly up-regulated in leaves of plants exposed to Cd10/Pb250- (4.7 fold, $p = 3.12 \cdot 10^{-4}$), to Cd10/Pb500- (4.95 fold, $p = 2.38 \cdot 10^{-4}$)

and to Cd10/Pb1000-spiked soils (3.25 fold, $p = 1.50.10^{-2}$). Concerning *BolC.PRXCB*, no significant variation was observed in plants exposed to Cd/Pb-spiked soils during 3 days (Fig. 4B). However, *BolC.PRXCB* was significantly up-regulated in leaves of plants exposed to Cd5/Pb1000- (2.51 fold, $p = 1.80.10^{-4}$), to Cd10/Pb250- (3.86 fold, $p = 1.82.10^{-2}$), to Cd10/Pb500- (6.85 fold, $p = 1.84.10^{-4}$) and to Cd10/Pb1000-spiked soils (3.44 fold, $p = 2.14.10^{-3}$). Finally, plants exposed to Cd5/Pb250-spiked soils during 56 days showed a *BolC.PRXCB* up-regulation (2.44 fold, $p = 1.82.10^{-4}$). During a 3-d exposure, *BolC.MTIC* RFE (Fig. 4C) increased slightly and significantly in plants exposed to Cd10/Pb250-spiked soils (2 fold, $p = 6.90.10^{-3}$). During a 10-d exposure, *BolC.MTIC* was significantly down-regulated in plants exposed to Cd5/Pb250- (2.19 fold, $p = 1.80.10^{-4}$) and to Cd5/Pb1000-spiked soils (2.64 fold, $p = 1.80.10^{-4}$) whereas it was up-regulated in plants exposed to Cd10/Pb250- (4.46 fold, $p = 2.66.10^{-3}$), to Cd10/Pb500- (5.18 fold, $p = 6.20.10^{-4}$) and to Cd10/Pb1000-spiked soils (4.49 fold, $p = 2.84.10^{-3}$). After 56 days of exposure, *BolC.MTIC* was down-regulated in plants exposed to Cd5/Pb250- (2.24 fold, $p = 1.82.10^{-2}$) and to Cd10/Pb1000-spiked soils (2.62 fold, $p = 1.73.10^{-4}$) whereas it was up-regulated in plants exposed to Cd5/Pb1000-spiked soils (2.25 fold, $p = 1.81.10^{-4}$).

4) Discussion

Purpose of this study was to measure expression of genes encoding enzymes involved in oxidative stress mechanism in *Trifolium repens* and in *Brassica oleracea* exposed to a reference soil spiked with Cd, Pb and mixtures of both metals at low and realistic concentrations. According to Peijnenburg et al. (1997), bioavailability should be considered to be a dynamic process comprised of two distinct phases: a physico-chemically driven desorption process (often referred to as “environmental availability”) and a physiologically driven up-take process (also referred as “environmental bioavailability”). “Environmental

bioavailability” can be approximated using a test species. First, Cd and Pb concentrations in leaves of *T. repens* and *B. oleracea* were measured. Despite low and realistic Cd concentrations in spiked-soils, results concerning Cd accumulation in both species during an exposure to high concentrations of Cd are in accordance with those obtained by Dixit et al. (2001), in *Pisum sativum*), Semane et al. (2007), in *Arabidopsis thaliana*) and Seth et al. (2008), in *Brassica juncea*) who showed a time- and/or dose-dependent accumulation of Cd in plant leaves. These observations could be explained by the fact that Cd is known to be easily transported within plants in the form of metallo-organic complexes (Hasan et al., 2009). However, we have to be careful with Cd contents measured in leaves. Indeed, the retention or immobilization of high amounts of Cd in the roots is a typical response of several plants, and this mechanism can be regarded as an important system for protecting against the spread of Cd in plant (Verkleij & Schat, 1990). Cd concentrations were measured in *T. repens* and *B. oleracea* roots. Results showed that Cd concentrations in *T. repens* roots was much higher than Cd concentrations in spiked-soils whereas those measured in *B. oleracea* roots were similar to Cd concentration in spiked soils (data not shown). Nevertheless, *B. oleracea* showed a higher Cd accumulation in leaves than *T. repens*. This observation could be explained by the fact that *B. oleracea* is a leafy vegetable and has a greater ability in Cd translocation via Cd transport through xylem sap (Salt et al., 1995b). Pb contents in *B. oleracea* leaves are very low whereas those in *T. repens* are higher; a dose-dependent relationship can be observed. However, Pb amounts found in *T. repens* leaves was much lower than those observed in roots (data not shown). A weak Pb amount in *T. repens* and *B. oleracea* leaves could be explained by its behavior. Pb is one of the elements which have a very low translocation from soil to leaves (De Nicola et al., 2003). This means that if the soil has a great availability of lead, the plant leaves which grow on that area might not have availability of lead at all, or they might have a much smaller concentration compared with that

of the soil. Once Pb is taken up from the soil, it accumulates in the root tissues and only a small quantity of it is transported to the leaves (Baycu et al., 2006). In plants simultaneously exposed to both metals, the leaf Cd contents also increased significantly, but not as strongly as in the monometal-treated plants. However, differences in Cd contents between Cd exposures and Cd/Pb exposures are very low which suggests that the presence of Pb does not affect bioavailability of Cd for plants. This result is in accordance with those observed by Smeets et al. (2009). They exposed hydroponic cultures of *A. thaliana* to Cd, Cu and a Cd/Cu mixture and observed a lower but significant leaf Cd and Cu contents in plants exposed to both metals compared to those exposed to monometal treatments. In this study, the reduction of Cd accumulation was more pronounced than that of Cu and authors suggested that root-to-shoot transport might be disturbed due to the strong phytotoxic effect of Cu in the roots (Smeets et al., 2009). In our experimental conditions, *T. repens* showed higher Pb accumulation and lower Cd accumulation in leaves than *B. oleracea*. Differences in Cd accumulation could be explained by the fact that *B. oleracea* foliar area is much higher than that of *T. repens*.

Cd and Pb are known to induce oxidative stress by generation of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide radical ($O_2^{\bullet-}$), hydroxyl radical (OH^{\bullet}), singlet oxygen (1O_2) and hydrogen peroxide (H_2O_2) (Romero-Puertas et al., 2004; Ranieri et al., 2005; Iannone et al., 2010; Phang et al., 2010). Plant cells use antioxidant defenses mechanisms to protect against these ROS. Enzyme activities are largely used to study oxidative stress in plants (Skorzynska-Polit et al., 2004; Zhou et al., 2008; Wang & Song, 2009; Posmyk et al., 2009; Manier et al., 2012). Lanier et al. (submitted) measured ascorbate peroxidases and gaiacol peroxidases activities in *T. repens* and *B. oleracea* leaves exposed to Cd-, to Pb- and to Cd/Pb-spiked soils during 3, 10 and 56 days. Experimental conditions were identical to our study. Authors showed that no significant variation in enzymes activities was observed. In this study, we propose an alternative way by exploring at transcriptional level major enzymes involved in

oxidative stress in *T. repens* and *B. oleracea*. Indeed, molecular markers (biomarkers of exposure) are at a low level in biological organization and they are supposed to respond to stressors earlier than biochemical markers (biomarkers indicators). First, *T. repens* results are going to be discussed then those of *B. oleracea* too. Indeed, both species are phylogenetically different; *T. repens* belongs to Fabaceae family whereas *B. oleracea* is part of Brassicaceae family. Then, oxidative stress candidates in both species are different even if some effectors present in *T. repens* and in *B. oleracea* belong to the same protein family.

In *T. repens*, molecular data concerning enzymes involved in oxidative stress were absent from databases. Thus, we have cloned these candidates and sequenced them in order to perform gene expression quantification by real-time PCR (Bernard et al., submitted). Cysolic enzymes *TrPRX22*, *TrMT1B*, *TrAPX1*, *TrGSTU19*, *TrPCS1* and *TrGR1*, mitochondrial enzyme *TrMSD1*, peroxisomal enzyme *TrCAT5* and chloroplastic enzymes *TrCSD2*, *TrGPX7* and *TrGR2* were studied. Among these candidates, *TrPCS1*, *TrCSD2*, *TrMSD1*, *TrGSTU19*, *TrGR2*, *TrGR1* and *TrPRX22* expression levels were under quantification limit of LightCycler® 480 (Roche Molecular Biochemicals, Germany) in our experimental conditions. Some belongs to largely studied anti-oxidant enzymes at biochemical level (enzyme activities).

Superoxide dismutases (SODs, EC 1.15.1.1) are the most effective intracellular enzymatic antioxidants which are ubiquitous in all aerobic organisms and in all subcellular compartments prone to ROS mediated oxidative stress. It is well established that various environmental stresses often lead to the increased generation of ROS, where, SODs have been proposed to be important in plant stress tolerance and provide the first line of defense against the toxic effects of elevated levels of ROS. The SODs remove $O_2^{\bullet-}$ by catalyzing its dismutation, one $O_2^{\bullet-}$ being reduced to H_2O_2 and another oxidized to O_2 . It removes $O_2^{\bullet-}$ and hence decreases the risk of OH^{\bullet} formation via the metal catalyzed Haber Weiss-type

reaction. In 2002, Mascher et al. grew red clover plants (*Trifolium pratense*) in a greenhouse on a sandy soil amended with different concentrations of arsenic or a heavy metals mixture. SOD activities were measured in leaves. Increases in SOD activities are correlated with increasing As content in plants. SOD activities decreased when plants are exposed to soils spiked by heavy metal mixture. Results indicate that metal exposure, both As and heavy metal mixture, produce oxidative damage in clover leaves. In 2009, Bidar et al. sowed *Trifolium repens* seeds on non-contaminated and heavy metal-contaminated field soils (*in situ* work). Plants were collected 6 month after sowing and SOD activities were measured. SOD activities in *T. repens* exposed to heavy metals was higher than those exposed to non-contaminated soil. However, these activities decreased strongly for high heavy metal concentrations. An important oxidative stress seems to be present in plants exposed to contaminated soils.

SODs are classified by their metal cofactors into three known types: the copper/zinc (Cu/Zn-SOD), the manganese (Mn-SOD) and the iron (Fe-SOD), which are localized in different cellular compartments (Mittler, 2002). In *A. thaliana* genome, three FeSOD genes (FSD1, FSD2 and FSD3), three Cu/ZnSOD genes (CSD1, CSD2 and CSD3), and one MnSOD gene (MSD1) have been reported (Kliebenstein et al., 1999). The Mn-SOD is found in the mitochondria of eukaryotic cells and in peroxisomes (del Rio et al., 2003); some Cu/Zn-SOD isozymes are found in the cytosolic fractions, and also in chloroplasts of higher plants (del Rio et al., 2002). The Fe-SOD isozymes, often not detected in plants (Ferreira et al., 2002) are usually associated with the chloroplast compartment when present (Alscher et al., 2002).

Glutathione reductases (GRs, EC 1.8.1.7) are flavo-protein oxidoreductases which plays an essential role in defense system against ROS by sustaining the reduced status of GSH. GRs are localized predominantly in chloroplasts, but small amount of these enzymes has also been found in mitochondria and cytosol (Edwards et al., 1990; Creissen et al., 1994). GRs catalyze the reduction of GSH into GSSG which consists of two GSH linked by a disulphide bridge

which can be converted back to GSH by GRs. In 2008, Zhou et al. exposed *Medicago sativa* hydroponics seedlings to Hg-contaminated solutions (0-40 μM) during 7 days. The aim of this study was to achieve a better understanding of the biological mechanisms for the Hg-induced oxidative stresses in plants and to develop an appropriate method that can be used to estimate the degree of toxicity in Hg-contaminated soils. GR activities were assayed but no significant variation was observed. In 2009, Sobrino-Plata et al. treated hydroponic *M. sativa* cultures with Cd or Hg at doses of 0, 3, 10 and 30 μM for 7 days. The aim of this study was to examine the alteration of glutathione metabolism in *M. sativa* plants grown in semi-hydroponic system and treated for 1 week with increasing doses of Cd or Hg. GR activities were assayed; activities were enhanced in leaves of plants exposed to Cd and Hg. However, these activities were enhanced in Cd-treated plants but were severely inhibited in roots of plants treated with Hg. GR activities showed a metal-dependent response in roots.

Phytochelatins (PCs) are peptides synthesized post-transcriptionally by constitutive phytochelatase (PCS, EC 2.3.2.15) (a.k.a γ -glutamylcysteine dipeptidyl transferase) using reduced glutathione as a substrate (Rea et al., 2004). PCS itself is rapidly induced by heavy metal ions such as As^- , Se^- , Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} and Pb^{2+} (Grill et al., 1985). PCs possess the general structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ where 'n' ranges from 2 to 11, although PC2 and PC3 appear to be the predominant forms (Raab et al., 2004). PCs are high-affinity chelators of metals, and play major roles in the detoxification of Cd^{2+} and arsenate in plants (Hall, 2002; Clemens, 2006), but appears to play no role in Ni and Zn detoxification, whilst its role in Cu tolerance remains unresolved (Hall, 2002). In our experimental conditions, TrPCS1 expression levels were under quantification limit of LightCycler[®] 480 (Roche Molecular Biochemicals, Germany).

Despite the fact that more than about 60% of selected candidates were not detected in our experimental conditions, *TrCAT5*, *TrGPX7*, *TrAPX1* and *TrMT1B* expression levels were

notwithstanding measured. Catalases (CATs, EC 1.11.1.6) are tetrameric heme containing enzymes with the potential to directly dismutate H₂O₂ into H₂O and O₂ and are indispensable for ROS detoxification during stressed conditions (Garg & Manchanda, 2009). The CAT isoforms have been studied extensively in higher plants (Polidoros & Scandalios, 1999). For example, 12 CAT isoforms were determined in Brassica genus (Frugoli et al., 1996). In 2009, Wang & Song exposed hydroponic *T. repens* seedlings to Cd-contaminated solutions (0, 400 and 600 µM). CAT activities were measured. In the upper part of the plant, Cd²⁺ exposure led to a significant decrease in CAT activities. The reduction observed in antioxidant enzyme activity could be responsible for the overproduction of ROS, which would produce oxidative damages in Cd stress.

Glutathione peroxidases (GPXs, EC 1.11.1.9) are a large family of diverse isozymes that use GSH to reduce H₂O₂, and therefore help plant cells from oxidative stress (Noctor et al., 2002). Millar et al. (2003) identified a family of seven related proteins in cytosol, chloroplast, mitochondria and endoplasmic reticulum, named *AtGPX1-AtGPX7* in Arabidopsis. Perturbation of GPXs was observed under salt stress (Sreenivasulu et al., 2004), heavy metal stress (Li et al., 2000), oxidative stress (Li et al., 2000; Avsian-Kretchmer et al., 2004) and mechanical stimulation (Depège et al., 1998). In 2009, Wang & Song exposed hydroponic *T. repens* seedlings to Cd-contaminated solutions (0, 400 and 600 µM). GPX activities were measured. In the upper part of the plant, Cd²⁺ exposure led to a significant decrease in GPX activities. In this study, gene expression of *TrCAT5* and *TrGPX7*, the first encoding for a peroxisomal catalase and the other for a chloroplastic glutathione peroxidase, were studied. No significant variation in both gene expressions was observed suggesting that no oxidative stress could be detected by means of the gene expression analysis of these two candidates in *T. repens* exposed to metal-spiked soils at low and realistic concentration.

Ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) is thought to play the most essential role in scavenging ROS and protecting cells in higher plants, algae, euglena and other organisms. APX is involved in scavenging of H₂O₂ in water-water and ascorbate-glutathione cycles and utilizes ascorbate as the electron donor. The APX family consists of different isoforms such as cytosolic (cAPX) and chloroplastic (stroma (sAPX) and thylakoid (tAPX)) forms and has a higher affinity for H₂O₂ (μM range) than catalases (CATs) and peroxidases (POXs) (mM range). In 2009, Wang & Song exposed hydroponic *T. repens* seedlings to Cd-contaminated solutions (0, 400 and 600 μM). APX activities were measured. In the upper part of the plant, Cd²⁺ exposure led to a significant increase in APX activities. In 2012, Manier et al. exposed in microcosms simultaneously two test species (*T. repens* and *E. fetida*) to a reference soil contaminated by a landfill leachate during 10 weeks. APX activities were assayed and no significant variation in APX activities was observed in roots of plants exposed to pure leachate and 50% diluted leachate compared to those exposed to the reference soil. On the contrary, in roots of these plants, an increase in APX activities was observed. Increased APX activities may reflect H₂O₂ accumulation in plant cells (Stavreva & Gichner, 2002). In our experimental conditions, results show that *TrAPX1* is up-regulated during short-term exposure to Cd-spiked soils. Thus, *TrAPX1* up-regulation could be induced by possible presence of Cd-generated ROS in leaves. This candidate could be used as a potential biomarker of a short-term exposure to soil contaminated by Cd.

Metallothioneins (MTs) are small cysteine rich proteins that range in size from 4 to 8 kDa and bind various metals like copper, cadmium, zinc, nickel, etc. (Hamer 1986). Metallothioneins have been found in a wide variety of organisms including animals, cyanobacteria, fungi, and higher plants (Coyle et al. 2002; Cobbett and Goldsbrough 2002). Plant MTs have been sub-divided into three classes based on the arrangement of cysteine residues (Zhou et al. 2006). Most plant MTs belong to class I wherein the two cysteine rich

domains are separated by a spacer of about 30–40 amino acids. Results show that *TrMT1B* is up-regulated during exposures to the most contaminated soil (20 mg.kg⁻¹ Cd) and during a 56-day exposure to Cd-spiked soils. After a 56-day exposure, *TrMT1B* expression level and Cd accumulation increased with increasing soil Cd concentrations. This observation suggests that increasing Cd accumulation could induce up-regulation of *TrMT1B* in order to produce more MTs in order to scavenge Cd²⁺ ions. However, detailed studies in plants and animals demonstrated that MTs function not only in metal homeostasis but also involved in reactive oxygen species (ROS) scavenging (Akashi et al. 2004; Wong et al. 2004), cell proliferation, zinc exchange with zinc-containing metalloproteins and transcription factors like MTF (Palmiter 1998; Haq et al. 2003) and act as possible cellular redox sensors (Fabisiak et al. 2002). Therefore, increasing Cd accumulation in *T. repens* leaves could also increase ROS generation and induce up-regulation of *TrMT1B* in order to produce ROS scavenging proteins. This candidate could be used as a potential biomarker of a long-term exposure to soil contaminated by Cd.

In *B. oleracea*, molecular data concerning oxidative stress was present in database for some candidates like genes encoding MT, APX, CAT and GPX (Genbank™, NCBI). Nevertheless, some candidates were missing so we performed the same work as for *T. repens*. Cytosolic enzymes *BolC.MT1C*, *BolC.GSTF2*, *BolC.GSTU19*, *BolC.GSTU5*, *BolC.GSTZ1*, *BolC.APX1*, *BolC.PCS1* and *BolC.GR1*, a cell wall enzyme *BolC.PRXCB*, a mitochondrial enzyme *BolC.MSD1*, two peroxisomal enzymes *BolC.CAT2* and *BolC.GSTT1* and five chloroplastic enzymes *BolC.CSD2*, *BolC.GPX7*, *BolC.FSD3*, *BolC.GR2* and *BolC.tAPX* were studied. Among these candidates, *BolC.CSD2*, *BolC.GSTT1*, *BolC.GR2* and *BolC.GPX7* expression levels were under quantification limit of LightCycler® 480 (Roche Molecular Biochemicals, Germany) in our experimental conditions. However, *BolC.PCS1*, *BolC.FSD3*, *BolC.MSD1*, *BolC.GSTU5*, *BolC.GR1*, *BolC.tAPX*, *BolC.APX1* and *BolC.CAT2* expression

levels in leaves of plants exposed to Cd²⁺-spiked soils were quantified by real-time PCR. No significant variations were observed (data not shown). Some belongs to largely studied antioxidant enzymes at biochemical and molecular levels.

Superoxide dismutases (SODs, EC 1.15.1.1) are the most effective intracellular enzymatic antioxidants which are ubiquitous in all aerobic organisms and in all subcellular compartments prone to ROS mediated oxidative stress. In 2007, Hajiboland & Hamjad (2007) performed hydroponics experiments with 2 varieties of *B. oleracea* (cabbage and kohlrabi) exposed to selenium (Se) solutions (10 and 20 μ M). SOD activities were measured. Cabbage and kohlrabi expressed very low enzyme activities. Authors demonstrated that sulfur sufficient *B. oleracea* plants concomitant with growth stimulation in response to Se addition expressed a progressive oxidative stress as judged by a lower activity of antioxidant enzymes and accumulation of oxidants. On the contrary, Posmyk et al. (2009) showed that SOD activities measured in red cabbage (*B. oleracea* var. *rubrum*) seedlings exposed to solutions containing Cu (0.5 and 2.5 mM) during 4 days were increased in plants exposed to Cu. In 2008, Smeets et al. grew hydroponically *A. thaliana* seedlings for 24 h in 0, 5, 10 and 20 μ M Cd-spiked solutions. *csd2*, *fsd2* and *msd1* gene expression were measured in leaves and roots. *csd2* expression level decreased in both organs whereas *fsd2* and *msd1* expression levels were stable in leaves. This suggests that oxidative stress caused by Cd is not due to superoxide in the leaves. Vanhoudt et al. (2010b) grew *A. thaliana* seedlings on hydroponics and exposed for 3 days to μ M U in combination with 5 μ M Cd. Gene expression of *csd1*, *csd2*, *csd3*, *fsd1*, *fsd2*, *fsd3* and *msd1*, were studied. Oxidative stress related responses are highly affected by Cd while U influence is more limited. While for roots, based on an increase in *fsd1* gene expression, oxidative stress was suggested to be superoxide induced, in leaves on the other hand, hydrogen peroxide related genes were mostly altered. In 2012, Opendakker et al. grew hydroponically *A. thaliana* seedlings and exposed plants to Cu- or Cd-spiked solutions (2 and

5 μM respectively) during 24 hours (2, 4, 6 and 24 h). Gene expression of *csd1*, *csd2* and *fsd1* were measured. During Cu exposure, *csd1* and *csd2* (leaves and roots) transcript levels increased whereas those of *fsd1* (leaves and roots) decreased. During Cd exposure, *fsd1* (roots) transcript levels increased whereas those of *csd1* and *csd2* (roots) decreased. Cu-exposed seedlings showed a direct effect of the metal on roots and a differed effect on leaves. Cd exposure showed direct effects of Cd on leaves and roots after 24 hours.

Glutathione reductases (GRs, EC 1.8.1.7) are flavo-protein oxidoreductases which plays an essential role in defense system against ROS by sustaining the reduced status of GSH. In 2008, Russo et al. grew *Brassica napus* plants in nutrient solutions containing 0.25 μM of Cu. Then, plants were exposed during 6 h to a solution containing 100 μM of Cu. GR activities were measured. An increase of GR activities in leaves and a decrease in roots was observed. Different enzymes seem to show a different sensitivity to oxidative stress intensity since GR was activated. This might be correlated with the compartmentation of different redox signalling molecules in different organs of the plant. In fact, since glutathione can be transported throughout the plant, it has been proposed that possibilities for a long-range signalling via glutathione levels and GSH/GSSG ratio may exist (Foyer et al., 1997). The decrease in GR activities indicates the loss of efficiency in the glutathione recycling system suggesting that Cu treatment resulted in an oxidative damage to *Brassica napus* roots. In 2009, Posmyk et al. exposed red cabbage (*B. oleracea* var. *rubrum*) seedlings to solutions containing Cu (0.5 and 2.5 mM) during 4 days. GR activities were measured and decreased in plants exposed to Cu. In 2012, Remans et al. grew hydroponically *A. thaliana* seedlings and exposed plants to Zn-contaminated solutions (0, 100, 250 and 500 μM) during 24 hours. GR activities and *gr1* and *gr2* expression levels were measured. Expression of glutathione reductase genes *gr1* and *gr2* was not decreased in the roots, suggesting an effect of excess Zn on the protein level, analogous to Cd which can cause an oxidative modification of this

protein resulting in a higher proteolytic degradation (Romero-Puertas et al., 2002). Decreased GR activity in the leaves may originate from decreased plastidal glutathione reductase (*gr2*) mRNA levels, although cytosolic glutathione reductase (*gr1*) mRNA levels were increased.

Phytochelatin (PCs) are peptides synthesized post-transcriptionally by constitutive phytochelatin synthase (PCS, EC 2.3.2.15) (a.k.a γ -glutamylcysteine dipeptidyl transferase) using reduced glutathione as a substrate (Rea et al., 2004). In 2007, Semane et al. exposed *A. thaliana* plants to Cd solutions (0, 1 and 10 μ M) during one week and performed gene expression analysis of *pcs1*. *pcs1* expression level increased with Cd doses. PC synthases activities is induced by Cd (Cobbett 2000, Rauser 2001) and was supported by the higher *pcs1* transcript levels suggesting that de novo synthesis of this enzyme occurs in Cd exposed plants. These observations indicate an active complexation of free Cd in the leaves by PCs. In 2012, Moudouma et al. studied *pcs1* and *pcs2* gene expression in *A. thaliana* exposed to Cd. *pcs1* was up-regulated by a factor of 2.4 in shoots but its expression in roots was not significantly modified. *pcs2* was up-regulated in whole seedlings with a ratio of 3.5 in roots and 3.7 in shoots. Authors showed that *pcs1* was only up-regulated in shoots after 1 week of Cd exposure. The number of transcripts in treated shoots was more important for *pcs1* than *pcs2*, suggesting that PCS1 could still be the main enzyme involved in PC synthesis. However, *pcs2* might be up-regulated in later responses to Cd and thus could take over *pcs1* in roots. Both genes seem to be non-redundant and play complementary roles. In response to Cd exposure or another abiotic stress, PCS2 could be involved in GS-conjugate catabolism and/or in another unknown activity.

Glutathione peroxidases (GPXs, EC 1.11.1.9) are a large family of diverse isozymes that use GSH to reduce H₂O₂, and therefore help plant cells from oxidative stress (Noctor et al., 2002). In 2007, Semane et al. exposed *A. thaliana* plants to Cd solutions (0, 1 and 10 μ M) during one week and measured GPX activities. Activities enhanced whatever Cd

concentration. Higher GPX activities might be an indication of protection against lipid peroxidation caused by Cd exposure. In 2009, Posmyk et al. exposed red cabbage (*B. oleracea* var. *rubrum*) seedlings to solutions containing Cu (0.5 and 2.5 mM) during 4 days. GPX activities were measured and were very low. This could suggest that in the analysed plant the ascorbate–glutathione pathway was not so much involved in H₂O₂ scavenging. In 2008, Smeets et al. grew hydroponically *A. thaliana* seedlings for 24 h in 0, 5, 10 and 20 μM Cd-spiked solutions and measured *gpx2* expression levels. Level of *gpx2* appeared to be increased in leaves for all Cd treatments, although this was only significant for 10 μM CdSO₄.

Catalases (CATs, EC 1.11.1.6) are tetrameric heme containing enzymes with the potential to directly dismutate H₂O₂ into H₂O and O₂ and are indispensable for ROS detoxification during stressed conditions (Garg & Manchanda, 2009). In 2009, Posmyk et al. exposed red cabbage (*B. oleracea* var. *rubrum*) seedlings to solutions containing Cu (0.5 and 2.5 mM) during 4 days. CAT activities were measured. Inhibition of CAT activities under Cu²⁺ stress conditions could additionally increase H₂O₂ level in the tissues. It is known that CAT is sensitive to Cu²⁺ stress. Low Cu²⁺ concentrations could stimulate CAT activity but high blocked it (Srivastava et al., 2006). In 2012, Hasanuzzaman et al. studied CAT activities in *B. napus* exposed to Cd and Se. CAT activities sharply decrease upon Cd stress, suggesting its inability to detoxify H₂O₂ generated by Cd stress. In 2009, Smeets et al. measured *cat1* gene expression in *A. thaliana* exposed to Cd and Cu. In leaves, the mRNA levels of *cat1* increased all exposures. In 2012, Opendakker et al. grew hydroponically *A. thaliana* seedlings and exposed plants to Cu- or Cd-spiked solutions (2 and 5 μM respectively) during 24 hours (2, 4, 6 and 24 h). Expression levels of *cat1*, *cat2* and *cat3* were measured *cat3* showed an increased expression after 24 h exposure to Cu. In leaves of plants exposed to Cd for 24 h, *cat2* transcript levels were reduced, while expression of *cat3* was increased.

Ascorbate peroxidase (APX, EC 1.11.1.11) is thought to play the most essential role in scavenging ROS and protecting cells in higher plants, algae, euglena and other organisms. In 2005, Pandey et al. grew *Brassica juncea* for 15 days in hydroponic culture supplemented with 0.2, 2 and 20 μM of chromium (Cr^{6+}). APX activities were measured. Enhancement in APX activities was recorded at 20 μM Cr^{6+} in roots as well as in leaves and this possibly contributed to substantial accumulation of H_2O_2 in these plant parts. APX is a potent scavenger of H_2O_2 , which minimize its accumulation and diffusion across the cellular membranes, preventing oxidative damage to cellular constituents. In 2007, Mobin & Khan exposed two *Brassica juncea* cultivars (RH-30 and Varuna) to artificial Cd-spiked soils (0, 25, 50 and 100 mg.kg^{-1}). APX activities were measured. Enzyme activities in Varuna cultivar were higher than those measured in RH-30 cultivar. The enhanced activities of APX in Varuna cultivar alleviated Cd stress and protected the photosynthetic activity. In 2006, Chiang et al. measured *apx1* and *apx3* gene expression in *Arabidopsis halleri* and *A. thaliana* hydroponic cultures exposed to Cd (50 and 100 μM) or to paraquat (1 μM). *apx1* and *apx3* were expressed 2.8 and 2.1 times higher, respectively, in *A. halleri* than in *A. thaliana*. Cytosolic *apx1* has been demonstrated as a central component in the ROS gene regulation network and plays a key role in the cross-compartment protection of thylakoid APX and stromal/mitochondrial APX under oxidative stress in *Arabidopsis* (Davletova et al., 2005). Authors suggest that high expression of *apx1* extensively protects *A. halleri* from oxidative damage under high levels of Zn/Cd.

Glutathione transferases (GSTs, EC 2.5.1.18) are a diverse family of proteins that share a similar three-dimensional structure and possess a well-defined glutathione-binding domain at their active sites (Armstrong, 1997). GSTs are divided into four distinct classes: the Phi, Tau, Zeta, and Theta GSTs (Edwards et al., 2000). In this study, we analyzed expression levels of genes encoding a Phi GST (*BolC.GSTF2*), a Tau GST (*BolC.GSTU19*) and a Zeta GST

(*BolC.GSTZ1*). The two largest classes are the plant-specific Phi and Tau GSTs. Both classes have major roles in herbicide detoxification (Marrs, 1996; Edwards & Dixon, 2000) and can function as glutathione peroxidases in order to counteract oxidative stress (Roxas et al., 1997; Cummins et al., 1999). In our experimental conditions, only *BolC.GSTU19* showed an up-regulation of its expression level after a 10-day exposure to Cd10/Pb-spiked soils. Pandey et al. (2005) observed no significant changes in GST activities in leaves of *B. juncea* exposed to Cr whereas Hasanuzzaman et al. (2012) showed that GST activities in *B. napus* plants profoundly increased in response to Cd exposure. According to Kumari et al. (2008), approximately 50% of the GSTs identified as Al responsive belonged to the Tau sub-family. This GST family plays an important role under stress conditions (Kilili et al. 2004). We can suppose that *BolC.GSTU19* encodes a protein which plays an important protective role under Cd/Pb exposures.

Plant peroxidases (POXs) are part of peroxidase superfamily which is largely distributed in living organisms. Except APXs (class I POXs), class III POXs are the most studied POXs in plants. Class III is a multigenic group of which number of copies by plant seems to be correlated with plant complexity and biotope (Duroux & Welinder, 2003; Passardi et al., 2004a). For example, 73 genes encoding POXs are available in *A. thaliana* genome (Tognolli et al., 2002). Class III POXs are present in soluble form in apoplast or linked to cell wall (Passardi et al., 2005) and their principal role is to reduce H₂O₂ during oxidative stress induced by metals. Our results show that *BolC.PRXCB* is significantly up-regulated after a 10-day exposure in leaves of plants exposed to a Cd5/Pb1000- and to Cd10/Pb-spiked soils and after a 56-day exposure to a Cd5/Pb250-spiked soil. Since POXs were reported to reduce H₂O₂ using PhC including flavonoids, some authors proposed their possible involvement in H₂O₂ scavenging in cells (Yamasaki, 1997; Yamasaki et al., 1997), e.g. guaiacol peroxidase has been demonstrated to catalyse the oxidation of various organic compounds such as PhC

(Quiroga et al., 2000). POXs are considered to be heavy metal stress-related enzymes (Karataglis et al., 1991) and are used as stress markers in metal poisoning situations (Chaoui et al., 2004). In many plant species, excessive uptake of heavy metals such as Ni, Pb and Cd induces a strong increase in POX activities and qualitative changes to their isoenzyme patterns (Baccouch et al., 2001; Mazhoudi et al., 1997).

Metallothioneins (MTs) are small cysteine rich proteins that range in size from 4 to 8 kDa and bind various metals like copper, cadmium, zinc, nickel, etc. (Hamer 1986). Like *BolC.GSTU19* and *BolC.PRXCB*, *BolC.MTIC* is significantly up-regulated in leaves of plants exposed to Cd10/Pb-spiked soils during 10 days. These up-regulations could be explained by the fact that Cd accumulations in leaves are important and presence of Cd could induce *BolC.MTIC*. However, some significant down-regulation were observed in leaves of plants exposed to Cd5/Pb250- and Cd5/Pb1000-spiked soils during 10 days and to Cd5/Pb250- and Cd10/Pb1000-spiked soils during 56 days. These results are difficult to analyze and could be explained by the fact that MTs are involved in several mechanisms like metal homeostasis, reactive oxygen species (ROS) scavenging, cell proliferation, zinc exchange and act as possible cellular redox sensors. However, Zhang et al. (2005) measured *AsPCSI* and *AsMT2A* expression levels in *Allium sativum* plants exposed to Cd. Authors suggested that *AsMT2a* and *AsPCSI* could coordinately function in different phases of Cd treatment. *AsMT2a* might confer the long and persistent Cd tolerance on *A. sativum* seedlings, i.e. once an excess of Cd accumulation over the chelating capacity of PCs happens, MTs synthesis is largely increased. This hypothesis has to be verified in *B.oleracea* in our experimental conditions. *BolC.GSTU19*, *BolC.PRXCB* and *BolC.MTIC* could be used as potential biomarker of a mid-term exposure to soil contaminated by Cd/Pb mixtures.

In this study, we explored oxidative stress at transcriptomic level in two different plant species, *T. repens* and *B. oleracea*. Each species possess its own batch of oxidative stress

genes. Indeed, available molecular data in databases (e.g. GenBank™) are more important for *B. oleracea* than *T. repens*. A partial sequencing of the genome has been performed by Ayele et al. (2005). Thus, a large number of molecular data is now available for this species in different databases. For example, a bit more than 180,000 expressed sequence tags (ESTs) can be found in Genbank™. Only a few molecular data concerning oxidative stress effectors could be identified from these set of data. Moreover, *Arabidopsis thaliana*, which belongs to the same family as *B. oleracea* (Brassicaceae), has its genome entirely sequenced and identified. A comparison of molecular data between both Brassicaceae orthologs is robust in order to identify target genes in *B. oleracea*. Concerning *T. repens*, no sequence encoding oxidative stress protein was found in databases for *T. repens* although 40,000 ESTs have been produced by Sawbridge et al. (2003) by means of high throughput sequencing. By means of CODEHOPs, we were able to clone and sequence some oxidative stress effectors. Among these candidates, metallothionein family protein was represented in both species. However, effectors are different and have different behaviours. For example, *TrMT1B* is significantly up-regulated whereas *BolC.MT1C* show no significant variation in plants exposed to Cd-spiked soils. In our experimental conditions, *T. repens* is more sensitive to Cd-spiked soils whereas *B. oleracea* is more sensitive to Cd/Pb-spiked soils. The use of several species in order to diagnose toxicity of contaminated soil is an important parameter to better analyze and understand effects of contaminated soils on living organisms.

5) Conclusion

Application of chronic additions of low doses rather than a single high dose mimicked more realistic conditions. Despite low metal concentrations in spiked-soils, metal content in leaves of *T. repens* and *B. oleracea* increased with increasing metal concentrations. Metal accumulation is a good method to observe metal effects on living organisms. Concerning gene

expression analysis, target genes were different between both species despite the fact that some effectors belong to the same family protein. Moreover, *T. repens* is more sensitive to Cd exposure (*TrMT1B* and *TrAPX1* up-regulations) whereas *B. oleracea* is more sensitive to Cd/Pb exposure (*BolC.MT1C*, *BolC.GSTU19* and *BolC.PRXCB* up-regulations). Consequently, both species can be used in a complementary manner to assess soil quality as they live in close contact with soil. These results suggest that there is a benefit to use complementary species in order to better apprehend the biological effects in ecotoxicology. Indeed, the use of two species allowed (1) a better testing of an ecologically relevant microcosm, (2) testing of different exposure routes and (3) measure of a wider range of biological effects (i.e. biomarkers).

Acknowledgments

The present study was supported by a grant from ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) and Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Fabien B. was supported by a doctoral fellowship from ADEME and Région Nord/Pas-de-Calais.

References

- Akashi K., Nishimura N., Ishida Y., Yokota A. (2004). Potent hydroxyl radical scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem Biophys Res Commun* 323:72–78.
- Alscher R.G., Erturk N., Heath L.S. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants, *J. Exp. Bot.* 53:1331–1341.
- Arduini I., Godbold D.L., Onnis A. (1996). Cadmium and copper uptake and distribution in Mediterranean tree seedlings. *Physiol Plant* 97:111–117.
- Armstrong R. N. (1997). Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. *Chem. Res. Toxicol.* 10:2–18.

- Avsian-Kretchmer O., Gueta-Dahan Y., Lev-Yadun S., Gollop R., Ben-Hayyim G. (2004). The salt-stress signal transduction pathway that activates the *gpx1* promoter is mediated by intracellular H₂O₂, different from the pathway induced by extracellular H₂O₂, *Plant Physiol.* 135:1685–1696.
- Ayele, M., Haas, B.J., Kumar, N., Wu, H., Xiao, Y., Van Aken, S., Utterback, T.R., Wortman, J.R., White, O.R., Town, C.D., 2005. Whole genome shotgun sequencing of *Brassica oleracea* and its application to gene discovery and annotation in *Arabidopsis*. *Genome Research* 15, 487-495.
- Baccouch S., Chaoui A., El Feriani E. (2001). Nickel toxicity induces oxidative damage in *Zea mays* roots. *J. Plant Nutr.* 24:1085–1097.
- Bargagli R., 1998. Chemical elements and plant life. In: Bargagli, R. (Ed.), *Trace Elements in Terrestrial Plants d An Ecophysiological Approach to Biomonitoring and Biorecovery*. Springer, New York, 324 pp.
- Baycu G., Tolunay D., Özden H., Günebakan S. (2006). Ecophysiological and seasonal variations in Cd, Pb, Zn and Ni concentrations in the leaves of urban deciduous trees in Istanbul. *Environmental Pollution*, 143:545–554.
- Bernard F., Brulle F., Dumez S., Lemiere S., Platel A., Nesslany F., Cuny D., Deram A., Vandebulcke F. Identification, cloning and gene expression study of the genes involved in oxidative stress in three soil ecotoxicology important test species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, submitted.
- Bidar, G., Garçon, G., Pruvot, C., Dewaele, D., Cazier, F., Douay, F., Shirali, P. (2007). Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environmental Pollution* 147, 546-553.
- Bidar, G., Pruvot, C., Garçon, G., Verdin, A., Shirali, P., Douay, F. (2009). Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 42-53.
- Brooks R.R., 1998. Phytochemistry of hyperaccumulators. In: Brooks, R.R. (Ed.), *Plants that Hyperaccumulate Heavy Metals: Their Role in Archaeology, Microbiology, Mineral Exploration, Phytomining and Phytoremediation*. CAB International, Wallingford/New York, 380 pp.
- Brulle, F., Mitta, G., Cocquerelle, C., 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., Bernard F., Vandebulcke F., Cuny D., Dumez S. How to identify suitable real-time PCR reference genes in a dedicated species: Example in leaves of *Brassica oleracea*. *Ecotoxicology*, in revision.

Chaoui A., Jarrar B., El Feriani E. (2004). Effect of cadmium and copper on peroxidase NADH oxidase and IAA oxidase activities in cell wall soluble and microsomal membrane fraction of pea roots. *J. Plant Physiol.* 161:1225–1234.

Chiang, H.C., Lo, J.C., Yeh, K.C., 2006. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: A genomic survey with cDNA microarray. *Environmental Science and Technology* 40, 6792-6798.

Clemens S. (2006). Evolution and function of phytochelatin synthases. *J. Plant. Physiol.* 163:319–332.

Cobbett C. (1999). A family of phytochelatin synthase genes from plant, fungal and animal species. *Trends Plant Sci* 4:335–7.

Cobbett C., Goldsbrough P. (2002). Phytochelatins and metallothioneins: Roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol* 53:159–82.

Coyle P., Philcox J.C., Carey L.C., Rofe A.M. (2002). Metallothionein: the multi-purpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59:627–647.

Creissen G.P., Broadbent P., Kular B., Reynolds H., Wellburn A.R., Mullineaux P.M. (1994). Manipulation of glutathione reductase in transgenic plants: implications for plant responses to environmental stress, *Proc. R. Soc. Edinb.* 102(B):167–175.

Cui Y., McBride S.J., Boyd W.A., Alper S., Freedman J.H. (2007). Toxicogenomic analysis of *Caenorhabditis elegans* reveals novel genes and pathways involved in the resistance to cadmium toxicity. *Genome Biol* 8. [art. no. R122].

Cummins I., Cole D. J., Edwards R. (1999). A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* 18:285–292.

Davletova S., Rizhsky L., Liang H., Shengqiang Z., Oliver D. J., Coutu J., Shulaev V., Schlauch K., Mittler R. (2005). Cytosolic ascorbate peroxidase 1 is a central component of the reactive oxygen gene network of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17(1):268-281.

De Nicola F., Maistro G., Alfani A. (2003). Assessment of nutritional status and trace element contamination of holm oak woodlands through analyses of leaves and surrounding soils. *The Science of the Total Environment*, 311:191–203.

del Río L.A., Corpas F.J., Sandalio L.M., Palma J.M., Gómez M., Barroso J.B. (2002). Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes, *J. Exp. Bot.* 53:1255–1272.

del Rio L.A., Sandalio L.M., Altomare D.A., Zilinskas B.A. (2003). Mitochondrial and peroxisomal magnese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence, *J. Exp. Bot.* 54:923–933.

- Dembitsky V. (2003). Natural occurrence of arseno compounds in plants, lichens, fungi, algal species, and microorganisms. *Plant Sci* 165:1177–1192.
- Demuynck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemièrre S., Leprêtre, A. (2007). Cd/Zn exposure interactions on metallothionein response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Comp. Biochem. Phys. C* 145:658–668.
- Depège N., Drevet J., Boyer N. (1998). Molecular cloning and characterization of tomato cDNAs encoding glutathione peroxidase-like proteins, *Eur. J. Biochem.* 253:445–451.
- Dixit, V., Pandey, V., Shyam, R., 2001. Differential antioxidative responses to cadmium in roots and leaves of pea (*Pisum sativum* L. cv. Azad). *Journal of Experimental Botany* 52, 1101-1109.
- Duroux L., Welinder K. (2003). The Peroxidase Gene Family in Plants: A Phylogenetic Overview. *Journal of Molecular Evolution* 57(4):397-407.
- Edwards E.A., Rawsthorne S., Mullineaux P.M. (1990). Subcellular distribution of multiple forms of glutathione reductase in leaves of pea (*Pisum sativum* L.), *Planta* 180:278–284.
- Edwards R., Dixon D. P. (2000). In *Herbicides and Their Mechanisms of Action* (Cobb, A. H., and Kirkwood, R. C., eds) pp. 38–71, Sheffield Academic Press, Sheffield, UK.
- Edwards R., Dixon D. P., Walbot V. (2000). Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci.* 5:193–198.
- Fabisiak J.P., Borisenko G.G., Liu S.X., Tyurin V.A., Pitt B.R., Kagan V.E. (2002). Redox sensor function of metallothioneins. *Methods Enzymol* 353:268–281.
- Ferreira R.R., Fornazier R.F., Vitoria A.P., Lea P.J., Azevedo R.A. (2002). Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress, *J. Plant Nutr.* 25:327–342.
- Foyer, C.H., Lopez-Delgado, H., Dat, J.F., Scott, I.M. (1997). Hydrogenperoxide- and glutathione-associated mechanisms of acclamatory stress tolerance and signalling. *Physiol. Plant.* 100:241–254.
- Fritsch C., Giraudoux P., Coeurdassier M., Douay F., Raoul F., Pruyot C, et al. (2010). Spatial distribution of metals in smelter-impacted soils of woody habitats: Influence of landscape and soil properties, and risk for wildlife. *Chemosphere* 81:141–55
- Fritsch C., Coeurdassier M., Giraudoux P., Raoul F., Douay F., Rieffel D., et al. (2011). Spatially Explicit Analysis of Metal Transfer to Biota: Influence of Soil Contamination and Landscape. *PLoS One* 6:e20682.
- Frugoli J.A., Zhong H.H., Nuccio M.L., McCourt P., McPeck M.A., Thomas T.L., McClung C.R. (1996). Catalase is encoded by a multigene family in *Arabidopsis thaliana* (L.), *Plant. Physiol.* 112:327–336.

- Garg N., Manchanda G. (2009). ROS generation in plants: boon or bane? *Plant Biosys.* 143:8–96.
- Godet J.P., Demuynck S., Waterlot C., Lemiere S., Souty-Grosset C., Scheifler R., et al. (2011). Growth and metal accumulation in *Porcellio scaber* exposed to poplar litter from Cd-, Pb-, and Zn-contaminated sites. *Ecotoxicol Environ Saf* 74:451–8.
- Grill E., Winnacker E.L., Zenk M.H. (1985). Phytochelatins: the principal heavy- metal complexing peptides of higher plants. *Science* 230:674–676.
- Hajiboland, R., Amjad, L., 2007. Does antioxidant capacity of leaves play a role in growth response to selenium at different sulfur nutritional status? *Plant, Soil and Environment* 53, 207-215.
- Hall J.L. (2002). Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J. Exp. Bot.* 53:1–11.
- Hamer D.A. (1986). Metallothionein. *Annu Rev Biochem* 55:913–951.
- Haq F., Mahoney M., Koropatnick J. (2003). Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res* 523:211–226.
- Hasan S.A., Fariduddin Q., Ali B., Hayat S., Ahmad A. (2009). Cadmium: toxicity and tolerance in plants, *J. Environ. Biol.* 30:165–174.
- Hasanuzzaman, M., Hossain, M.A., Fujita, M., 2012. Exogenous selenium pretreatment protects rapeseed seedlings from cadmium-induced oxidative stress by upregulating antioxidant defense and methylglyoxal detoxification systems. *Biological Trace Element Research* 149, 248-261.
- Hassan Z., Aarts M.G.M. (2011). Opportunities and feasibilities for biotechnological improvement of Zn, Cd or Ni tolerance and accumulation in plants, *Environ. Exp. Bot.* 72:53–63.
- Iannone M.F., Rosales E.P., Groppa M.D., Benavides M.P. (2010). Reactive oxygen species formation and cell death in catalase deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium, *Protoplasma* 245:15–27.
- Karataglis S., Moustakas M., Symeonidis L. (1991). Effects of heavy metals on isoperoxidases of wheat. *Biol. Plantarum (Praha)* 33:3–9.
- Kastori R., Petrovic M., Petrovic N. (1992). Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. *J Plant Nutr* 15:2427–2439.
- Kilili K.G., Atanassova N., Vardanyan A., Clatot N., Al-Sabarna K., Kanellopoulos P.N., Makris A.M., Kampranis S.C. (2004). Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *J Biol Chem* 279:24540–24551.

- Kliebenstein D.J., Dietrich R.A., Martin A.C., Last R.L., Dangel J.L. (1999). Regulates Salicylic Acid Induction of copper zinc superoxide dismutase in *Arabidopsis thaliana*, Mol. Plant-Microbe Interac. 12:1022–1026.
- Kratovalieva S., Cvetanowska L. (2001). Influence of different lead concentrations to some morphophysiological parameters at tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in experimental conditions. Maced Agric Rev 48(1/2):35–41.
- Kumari, M., Taylor, G.J., Deyholos, M.K., 2008. Transcriptomic responses to aluminum stress in roots of *Arabidopsis thaliana*. Molecular Genetics and Genomics 279, 339-357.
- Kusznierewicz, B., Baczek-Kwinta, R., Bartoszek, A., Piekarska, A., Huk, A., Manikowska, A., Antonkiewicz, J., Namieśnik, J., Konieczka, P., 2012. The dose-dependent influence of zinc and cadmium contamination of soil on their uptake and glucosinolate content in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *alba*). Environmental Toxicology and Chemistry 31, 2482-2489.
- Lamb D.T., Ming H., Megharaj M., Naidu R. (2010). Phytotoxicity and accumulation of lead in Australian native vegetation. Arch Environ Contam Toxicol 58(3):613–621.
- Lanier C., Bernard F., Dumez S., Leclercq J., Lemièrre S., Vandebulcke F., Nesslany F., Platel A., Devred I., Cuny D., Deram A. DNA damage, Ascorbate and Guaiacol peroxidase activities in *Trifolium repens* in response to Cd and/or Pb spiked field soil exposures. Ecotoxicology and Environmental Safety, submitted.
- Li W.J., Feng H., Fan J.H., Zhang R.Q., Zhao N.M., Liu J.Y. (2000). Molecular cloning and Expression of A phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase homolog in *Oryza sativa*, Biochim. Biophys. Acta 1493:225–230.
- Malecka A., Piechalak A., Tomaszewska B. (2009). Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions: the whole roots level. Acta Physiol Plant 31:1053–1063.
- Manier N. (2008). Etude d'un nouveau modèle biologique végétal (*Trifolium repens*) en écotoxicologie, applicable aux sols contaminés par les métaux lourds. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'université de Lille 2, 2008, 241p.
- Manier, N., Deram, A., Broos, K., Denayer, F.O., Wan Haluwyn, C. (2009). White clover modulation index in heavy metal contaminated soils- A potential bioindicator. Journal of Environmental Quality 38, 685-692.
- Manier, N., Brulle, F., Le Curieux, F., Vandebulcke, F., Deram, A. (2012). Biomarker measurements in *Trifolium repens* and *Eisenia fetida* to assess the toxicity of soil contaminated with landfill leachate: A microcosm study. Ecotoxicology and Environmental Safety 80:339–348.
- Marrs K. A. (1996). The functions and regulation of glutathione-S-transferases in plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47:127–158.

Mascher, R., Lippmann, B., Holzinger, S., Bergmann, H., 2002. Arsenate toxicity: Effects on oxidative stress response molecules and enzymes in red clover plants. *Plant Science* 163, 961-969.

Mazhoudi S., Chaoui A., Ghorbal M.H., El Feriani E. (1997). Response of antioxidant enzymes to excess copper in tomato (*Lycopersicon esculentum*, Mill). *Plant Sci.* 127:129–137.

Meyers D.E.R., Auchterlonie G.J., Webb R.I., Wood B. (2008). Uptake and localisation of lead in the root system of *Brassica juncea*. *Environ Poll* 153:323–332

Millar A.H., Mittova V., Kiddle G., Heazlewood J.L., Bartoli C.G., Theodoulou F.L., Foyer C.H. (2003). Control of ascorbate synthesis by respiration and its implication for stress responses, *Plant Physiol.* 133:443–447.

Mittler R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance, *Trends Plant Sci.* 7:405–410.

Mobin, M., Khan, N.A., 2007. Photosynthetic activity, pigment composition and antioxidative response of two mustard (*Brassica juncea*) cultivars differing in photosynthetic capacity subjected to cadmium stress. *Journal of Plant Physiology* 164, 601-610.

Mohanpuria P., Rana N.K., Yadav S.K. (2007). Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Environ Toxicol* 22:368–374.

Morgan A.J., Kille P., Stürzenbaum S.R. (2007). Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environ Sci Technol* 41:1085–96.

Moudouma, C., Gloaguen, V., Riou, C., Forestier, L., Saladin, G., 2012. High concentration of cadmium induces *AtPCS2* gene expression in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ecotype Wassilewskija seedlings. *Acta Physiologiae Plantarum* 34, 1083-1091.

Noctor G., Gomez L., Vanacker H., Foyer C.H. (2002). Interactions between biosynthesis, compartmentation, and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling, *J. Exp. Bot.* 53:1283–1304.

Opdenakker, K., Remans, T., Keunen, E., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2012. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAPKinase transcript levels. *Environmental and Experimental Botany* 83, 53-61.

Palmiter R.D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:8428–8430.

Pandey, V., Dixit, V., Shyam, R., 2005. Antioxidative responses in relation to growth of mustard (*Brassica juncea* cv. *Pusa Jaikisan*) plants exposed to hexavalent chromium. *Chemosphere* 61, 40-47.

Passardi F., Longet D., Penel C., Dunand C. (2004). The class III peroxidase multigenic family in rice and its evolution in land plants. *Phytochemistry* 65(13):1879-1893.

Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swissbarmy knife. *Plant Cell Reports* 24(5): 255-265.

Peijnenburg W.J.G.M., Posthuma L., Eijsackers H.J.P., Allen H.E. (1997). A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicol Environ Saf* 37:163–72.

Phang I.C., Leung D.W.M., Taylor H.H., Burritt D.J. (2011). Correlation of growth inhibition with accumulation of Pb in cell-wall and changes in response to oxidative stress in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Growth Regul.* doi:10.1007/S10725-010-9527-0.

Polidoros N.A., Scandalios J.G. (1999). Role of hydrogen peroxide and different classes of antioxidants in the regulation of catalase and glutathione S-transferase gene expression in maize (*Zea mays* L.), *Physiol. Plant.* 106:112–120.

Posmyk, M.M., Kontek, R., Janas, K.M., 2009. Antioxidant enzymes activity and phenolic compounds content in red cabbage seedlings exposed to copper stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 596-602.

Prasad S.M., Dwivedi R., Zeeshan M. (2005). Growth, photosynthetic electron transport, and antioxidant responses of young soybean seedlings to simultaneous exposure of nickel and UV-B stress. *Photosynth* 43(2):177–185.

Quiroga M.C., Guerrero A., Botella M., Barcelo I., Amaya M.I., Medina F.J., Alonso F.J., Forchetti H., Tigier H., Valpuesta V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiol.* 122:1119–1127.

Raab A., Feldmann J., Meharg A.A. (2004). The nature of arsenic-phytochelatin complexes in *Holcus lanatus* and *Pteris cretica*. *Plant Physiol.* 134:1113–1122.

Ranieri A., Castagna A., Scebba F., Careri M., Zagnoni I., Predieri G., Pagliari M., Sanità di Toppi L. (2005). Oxidative stress and PC characterisation in bread wheat exposed to Cd excess, *Plant Physiol. Biochem.* 43:45–54.

Remans, T., Opendakker, K., Guisez, Y., Carleer, R., Schat, H., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2012. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to excess Zn reveals a Zn-specific oxidative stress signature. *Environmental and Experimental Botany* 84, 61-71.

Rivetta A., Negrini N., Cocucci M. (1997). Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination, *Plant Cell Environ.* 20:600–608.

Romero-Puertas M.C., Rodriguez-Serrano M., Corpas F.J., Gomez M., Del Rio L.A. (2004). Cd-induced subcellular accumulation of O₂⁻ and H₂O₂ in pea leaves, *Plant Cell Environ.* 27:1122–1134.

- Roxas V. P., Smith R. K., Allen E. R., Allen R. D. (1997). Overexpression of glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nat. Biotechnol.* 15:988–991.
- Russo, M., Sgherri, C., Izzo, R., Navari-Izzo, F., 2008. *Brassica napus* subjected to copper excess: Phospholipases C and D and glutathione system in signalling. *Environmental and Experimental Botany* 62, 238-246.
- Rzepka, M.A., 2007. Mécanismes d'accumulation et de toxicité des composés organiques volatils chez les végétaux supérieurs. PhD degree report, University of Lille 2.
- Salt D.E., Prince R.C., I.J. Pickering I.J., I. Raskin I. (1995) Mechanisms of cadmium mobility and accumulation in Indian mustard, *Plant Physiol.* 109:1427–1433.
- Sanità di Toppi L., Gabbriellini R. (1999). Response to Cd in higher plants, *Environ. Exp. Bot.* 41:105–130.
- Sawbridge, T., Ong, E.K., Binnion, C., Emmerling, M., Meath, K., Nunan, K., O'Neill, M., O'Toole, F., Simmonds, J., Wearne, K., Winkworth, A., Spangenberg, G., 2003. Generation and analysis of expressed sequence tags in white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Science* 165, 1077-1087.
- Schell L.M., Burnitz K.K., Lathrop P.W. (2010). Pollution and human biology. *Ann. Human Biol.* 37:347–366.
- Schützendübel A., Polle A. (2002). Plant responses to abiotic stress: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization, *J. Exp. Bot.* 53:1351–1365.
- Semane, B., Cuypers, A., Smeets, K., Van Belleghem, F., Horemans, N., Schat, H., Vangronsveld, J., 2007. Cadmium responses in *Arabidopsis thaliana*: Glutathione metabolism and antioxidative defence system. *Physiologia Plantarum* 129, 519-528.
- Seth, C.S., Kumar Chaturvedi, P., Misra, V., 2008. The role of phytochelatins and antioxidants in tolerance to Cd accumulation in *Brassica juncea* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 76-85.
- Shahandeh, H., Hossner, L.R., 2002. Role of soil properties in phytoaccumulation of uranium. *Water, Air, and Soil Pollution* 141, 165-180.
- Sharma P., Dubey R.S. (2005). Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17:35–52.
- Skórzyńska-Polit, E., Drążkiewicz, M., Krupa, Z., 2004. The activity of the antioxidative system in cadmium-treated *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum* 47, 71-78.
- Smeets, K., Ruytinx, J., Semane, B., Van Belleghem, F., Remans, T., Van Sanden, S., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2008. Cadmium-induced transcriptional and enzymatic alterations related to oxidative stress. *Environmental and Experimental Botany* 63, 1-8.

Smeets, K., Opdenakker, K., Remans, T., Van Sanden, S., Van Belleghem, F., Semane, B., Horemans, N., Guisez, Y., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2009. Oxidative stress-related responses at transcriptional and enzymatic levels after exposure to Cd or Cu in a multipollution context. *Journal of Plant Physiology* 166, 1982-1992.

Sobrino-Plata, J., Ortega-Villasante, C., Laura Flores-Cáceres, M., Escobar, C., Del Campo, F.F., Hernández, L.E., 2009. Differential alterations of antioxidant defenses as bioindicators of mercury and cadmium toxicity in alfalfa. *Chemosphere* 77, 946-954.

Sreenivasulu N., Miranda M., Prakash H.S., Wobus U., Weschke W. (2004). Transcriptome changes in foxtail millet genotypes at high salinity: identification and characterization of a PHGPx gene specifically upregulated by NaCl in a salt-tolerant line, *J. Plant Physiol.* 161:467–477.

Srivastava S., Mishra S., Tripathi R.D., Dwivedi S., Gupta D.K. (2006). Copper-induced stress and responses of antioxidants and phytochelatin in *Hydrilla verticillata* (L.f.) Royle. *Aquat. Toxicol.* 80:405–415.

Stavreva D.A., Gichner T. (2002). DNA damage induced by hydrogen peroxide in cultured tobacco cells is dependent on the cell growth stage. *Mutat. Res.* 514:147–152.

Sterckeman T., Douay F., Proix N., Fourrier H. (2000). Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the north of France. *Environ Pollut* 107:377–89.

Sterckeman T., Douay F., Proix F., Fourrier H., Perdrix E. (2002). Assessment of the contamination of cultivated soils by eighteen trace elements around smelters in the North of France. *Water Air Soil Pollut.* 135:173–194.

Stone D., Jepson P., Kramarz P., Laskowski R. (2001). Time to death response in carabid beetles exposed to multiple stressors along a gradient of heavy metal pollution. *Environ Pollut* 113:239–44.

Stürzenbaum S.R., Georgiev O., Morgan A.J., Kille P. (2004). Cadmium detoxification in earthworms: From genes to cells. *Environ Sci Technol* 38:6283–9.

Timmermans M.J.T.N., Ellers J., Roelofs D., van Straalen N.M. (2005). Metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in metal-stressed and reference populations of the springtail *Orchesella cincta*. *Ecotoxicology* 14:727–39.

Tognolli M, Penel C., Greppin H., Simon P.(2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 288(1-2):129-138.

Uraguchi S., Mori S., Kuramata M., Kawasaki A., Arao T., Ishikawa S. (2009). Root-to-shoot Cd translocation via the xylem is the major process determining shoot and grain cadmium accumulation in rice, *J. Exp. Bot.* 60:2677–2688.

Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Horemans, N., Wannijn, J., Van Hees, M., Vangronsveld, J., Cuypers, A., 2010b. The combined effect of uranium and gamma radiation on biological

responses and oxidative stress induced in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Environmental Radioactivity 101, 923-930.

VDI, Verein Deutscher Ingenieure, 2000. Biologische Messverfahren zur Ermittlung und Beurteilung der Wirkung von Luftverunreinigungen auf Pflanzen (Bioindikation). Verfahren der standardisierten Exposition von Grünkohl. – Biological measuring techniques for the determination and evaluation of effects of air pollutants on plants (bioindikation). Standardised exposure of green cabbage. VDI-Guideline 3957 Part 3.

Verkleij J.A.C., Schat H. (1990). Mechanisms of metal tolerance in higher plants, in: A.J. Shaw (Ed.), Heavy Metal Tolerance in Plants: Evolutionary Aspects, CRC Press, Boca Raton, pp. 179–193.

Verma S., Dubey R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. Plant Sci 164:645–655.

Wang, C.Q., Song, H., 2009. Calcium protects *Trifolium repens* L. seedlings against cadmium stress. Plant Cell Reports 28, 1341-1349.

Wojcik M., Tukiendorf A. (2004). Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. Plant Growth Regul 44:71–80.

Wong H.L., Sakamoto T., Kawasaki T., Umemura K., Shimamoto K. (2004). Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase *OsRac1* in rice. Plant Physiol 135:1447–1456.

Yamasaki H. (1997). A function of color. Trends Plant Sci. 2:7–8.

Yamasaki H., Sakihama N., Ikehara N. (1997). Flavonoid–peroxidase reaction as a detoxification mechanism in plant cells against H₂O₂. Plant Physiol. 115:1405–1412.

Zhou G.K., Xu Y.F., Li J., Yang L., Liu J.Y. (2006). Molecular analysis of the metallothionein gene family in rice (*Oryza sativa* L.). J Biochem Mol Biol 39:595–606.

Zhou, Z.S., Wang, S.J., Yang, Z.M., 2008. Biological detection and analysis of mercury toxicity to alfalfa (*Medicago sativa*) plants. Chemosphere 70, 1500-1509.

Table 1: Physical chemistry and reference soil properties

Soil Properties	Unit	Value	ETM	mg.kg⁻¹	Mean value	HAP	mg.kg⁻¹
Humidity	%	17.5	Sb	0.84	0.7	Phenanthrene	0.09
pH		7.29	Cd	0.45	0.43	Fluoranthene	0.22
Clay (< 2µm)	g.kg ⁻¹	144	Zn	100	65.7	Pyrene	0.22
Silt (2-50µm)	g.kg ⁻¹	739	Pb	76	33.2	Benz(a)anthracene	0.11
Sand (50-2000µm)	g.kg ⁻¹	117	Cu	28	16.1	Chrysene	0.12
Organic Matter	g.kg ⁻¹	35.6	Cr	22	55.2	Benzo(b)fluoranthene	0.13
N total	g.kg ⁻¹	1.3	Ni	16	20.3	Benzo(k)fluoranthene	0.07
N (nitric)	mg.kg ⁻¹	23.6	Hg	0.21	0.083	Benzo(a)pyrene	0.12
N (ammonium)	mg.kg ⁻¹	10.4	As	8.96	8.6	Benzo(ghi)perylene	0.08
C/N		15.8	Ba	100	-	Indeno(1,2,3-cd)pyrene	0.15
CEC	cmol ⁺ .kg ⁻¹	9.37	Be	0.59	-		
CaCO ₃	%	2.4	Co	7.9	9.4	Total Hydrocarbons C10-C40	38

Table 2: Cd and Pb salt amounts used to spike 8 kg of reference soil.

Cd/Pb (mg/kg)	CdCl₂ amount	[Pb(CH₃COO)₂, 3H₂O] amount
5/250	69,308 mg	3,89 g
5/500	69,308 mg	7,78 g
5/1000	69,308 mg	15,56 g
10/250	138,616 mg	3,89 g
10/500	138,616 mg	7,78 g
10/1000	138,616 mg	15,56 g

Table 3: Primer sequences used in *Trifolium repens* to perform Real-Time PCR

Gene	Amplicon size (pb)	Efficiency	Forward	Reverse	Accession number
<i>TrEF1a1</i>	147	1.97	<u>TGGAAATTCGAGACCACCA</u>	<u>ACCAGCTCAAAACCACCA</u>	Genbank: KC710340
<i>TrTBP2</i>	231	1.99	<u>ATCCAAGCGTTTTGCTG</u>	<u>GCCGTATGGGGAATTTGA</u>	Genbank: KC710341
<i>TrSAND1</i>	103	2.07	<u>TGAAAACGGGGGTGATTCT</u>	<u>TTCCGTGGAGCTAATGCAG</u>	Genbank: KC710342
<i>TrAPX1</i>	459	1.97	<u>CAGAGGTTTCATCGCT</u>	<u>TCGAATCCAGAACGCT</u>	GenBank: JQ321599
<i>TrCAT5</i>	445	1.90	<u>AACACGTACTCCCTGAT</u>	<u>GTCTGTGCCTCTGTGA</u>	GenBank: JQ321596
<i>TrGPX7</i>	241	1.97	<u>AGATCACCAAAAAAGCCT</u>	<u>ACTACACGGAACCTCTCG</u>	GenBank: JQ321604
<i>TrPCSI</i>	438	< Q.L.	<u>GTCAGTGGAAATCCAATGT</u>	<u>AACTCAATCTGAACCTGC</u>	GenBank: JQ321605
<i>TrCSD2</i>	397	< Q.L.	<u>TACCACCAGCATTGCC</u>	<u>GGTACTTCCACCGTTG</u>	GenBank: JQ321597
<i>TrMSD1</i>	438	< Q.L.	<u>GCGTACTTCCAGTTGATG</u>	<u>TGCTGTGCGTAAAGCC</u>	GenBank: JQ321598
<i>TrGSTU19</i>	378	< Q.L.	<u>GTTGCGGATGAGGATCAG</u>	<u>CCCAACTCTTGCTCCA</u>	GenBank: JQ321600
<i>TrGR2</i>	388	< Q.L.	<u>TGCTCTTCGGTTAGACCA</u>	<u>AAGAATCACCTGAAGCC</u>	GenBank: JQ321603
<i>TrGRI</i>	318	< Q.L.	<u>AACGTGGACTTCAACTG</u>	<u>GCCTGCTCCAAGAATC</u>	GenBank: JQ321602
<i>TrPRX22</i>	461	< Q.L.	<u>GTAAAGAGTTGGATCAGGAC</u>	<u>GCTTTGTTCAAGGATGTG</u>	GenBank: JQ321606
<i>TrMT1B</i>	106	1.93	<u>ATGTCGAAGCCGAAACCA</u>	<u>TTGCAGCCACTGTCCTCA</u>	GenBank: Z26493

Legend: ATGC = sequences available in databases / ATGC = sequence cloned / ATGC = gene expression quantified / < Q.L. = under quantification limit.

Abbreviations: *TrEF1a1* = Elongation Factor 1 alpha 1, *TrTBP2* = TATA box binding protein 2, *TrSAND1* = SAND family protein 1, *TrAPX1* = Ascorbate peroxidase 1, *TrCAT5* = Catalase 5, *TrGPX7* = Glutathione peroxidase 7, *TrPCSI* = Phytochelatin synthase 1, *TrCSD2* = Copper/Zinc superoxide dismutase 2, *TrMSD1* = Manganese superoxide dismutase 1, *TrGSTU19* = Glutathione transferase tau 19, *TrGR2* = Chloroplastic glutathione reductase, *TrGRI* = Cytosolic glutathione reductase, *TrPRX22* = Peroxidase 22, *TrMT1B* = Metallothionein 1B.

Table 4: Primer sequences used in *Brassica oleracea* to perform Real-time PCR

Gene	Amplicon size (pb)	Efficiency	Forward	Reverse	Accession number
<i>BolC.TUB6.a</i>	345	1.92	<u>GGAATGGATACCGAACCAACG</u>	<u>CAACGCTAGTCTCAGCAGCA</u>	GenBank: KF218597
<i>BolC.SAND1.a</i>	297	1.93	<u>GCGCGTCTGGTGTATTGTT</u>	<u>CAATGCGAATCCTGCAATC</u>	GenBank: KF218596
<i>BolC.UBQ2.a</i>	359	1.97	<u>ATATTCGTGAAGACGCTG</u>	<u>CTCAACTGGTTGCTGTG</u>	GenBank: JQ218593
<i>BolC.PCS1.a</i>	246	1.92	<u>TCCATGGCTTCCCAAAGA</u>	<u>GGCTTCCCCTCACTAATCA</u>	GenBank: JQ321585
<i>BolC.FSD3.a</i>	174	1.88	<u>AACGCTGCGCAGGTCTAT</u>	<u>GACCCAGCCAGAACCAAA</u>	GenBank: JQ321586
<i>BolC.MSD1.a</i>	140	1.86	<u>TGCAGATCCATCACCAGAAG</u>	<u>TCCGCCGTTGAACTTGAT</u>	GenBank: JQ321587
<i>BolC.CSD2.a</i>	157	< Q.L.	<u>CATCGGCGTTGGCAGTA</u>	<u>GGCCTGCATGGTTTTCAC</u>	GenBank: JQ321588
<i>BolC.GSTF2.a</i>	254	2.10	<u>AACCGCAGGAATGTGGTG</u>	<u>ACCTGGCCCACTATGCAA</u>	GenBank: JQ321590
<i>BolC.GSTU19.a</i>	262	1.90	<u>TTCCGGTTCTCATCCACAA</u>	<u>TCTCCAAGCTCGGTTTCAA</u>	GenBank: JQ321591
<i>BolC.GSTU5.a</i>	299	1.93	<u>GGCGACCAAATCCAAAAA</u>	<u>TCCACAATGGCAAAACCA</u>	GenBank: JQ321592
<i>BolC.GSTT1.a</i>	232	< Q.L.	<u>ATCTTGGCGAAGCGTCAG</u>	<u>CACCAGGGCGTAAATTGG</u>	GenBank: JQ321593
<i>BolC.GSTZ1.a</i>	187	2.10	<u>CCAGTTGCGTGTTTTCCA</u>	<u>TCAATTTCGAGGCAGCAA</u>	GenBank: JQ321594
<i>BolC.PRXCB.a</i>	182	1.96	<u>TCAGTTCGAGTTGGCAGGAG</u>	<u>CCGGAGAGAGCAACGAGAT</u>	GenBank: JQ321595
<i>BolC.GR2.a</i>	181	< Q.L.	<u>TCATCCGGCAGAAAAAGG</u>	<u>TGCGAAAACCCATCAACA</u>	GenBank: JQ321589
<i>BolC.GR1.a</i>	123	2.05	<u>AGCGATTGTTGGCGAATG</u>	<u>AAATGTGCTTGGCGGTGT</u>	GenBank: AB125639
<i>BolC.tAPX.a</i>	227	2.07	<u>GCAAACGCTGGTCTCGTT</u>	<u>TGATCCGCTGGTGAAGGT</u>	GenBank: AB125634
<i>BolC.APX1.a</i>	257	1.98	<u>TGGTGGTCCATTCGGAAC</u>	<u>CGCAGCCCTTTGTAGCAT</u>	GenBank: AB078599
<i>BolC.CAT2.a</i>	236	1.89	<u>CGTTGGGCGTATGGTGTT</u>	<u>TGAAGCCCTCATGGTGGT</u>	GenBank: GQ500124
<i>BolC.GPX7.a</i>	220	< Q.L.	<u>CGGATATCAAGCGTTTCG</u>	<u>TGTAAAGGCGGGTCTGT</u>	GenBank: AY493200
<i>BolC.MTIC.a</i>	100	2.00	<u>GTGGTTCCGGTTGCAAAT</u>	<u>TCCCCACAGCTACAGTTTGA</u>	GenBank: AF458412

Legend: ATGC = sequences available in databases / **ATGC** = sequence cloned / ATGC = gene expression quantified / < Q.L. = under quantification limit.

Abbreviations: *BolC.TUB6* = Beta 6 tubulin, *BolC.SAND1* = SAND family protein 1, *BolC.UBQ2* = Ubiquitin 2, *BolC.PCS1* = Phytochelatin synthase 1, *BolC.FSD3* = Iron superoxide dismutase 3, *BolC.MSD1* = Manganese superoxide dismutase 1, *BolC.CSD2* = Copper/Zinc superoxide dismutase 2, *BolC.GSTF2* = Phi 2 glutathione transferase, *BolC.GSTU19* = Tau 19 glutathione transferase a, *BolC.GSTU5* = Tau 5 glutathione transferase b, *BolC.GSTT1* = Theta 1 glutathione transferase, *BolC.GSTZ1* = Zeta 1 glutathione transferase, *BolC.PRXCB* = Peroxidase CB, *BolC.GR2* = Chloroplastic glutathione reductase, *BolC.GR1* = Cytosolic glutathione reductase, *BolC.tAPX* = Thylakoidal bound ascorbate peroxidase, *BolC.APX1* = Ascorbate peroxidase 1, *BolC.CAT2* = Catalase 2, *BolC.GPX7* = Glutathione peroxidase 7, *BolC.MTIC* = Metallothionein 1C.

Figure 1: Accumulation of Cd and Pb in *T. repens* exposed to Cd- and Pb-spiked soils. (A): Cd accumulation in *T. repens* exposed to Cd-spiked soils. (B): Pb accumulation in *T. repens* exposed to Pb-spiked soils. (C): Cd accumulation in *T. repens* exposed to Cd/Pb mix-spiked soils.

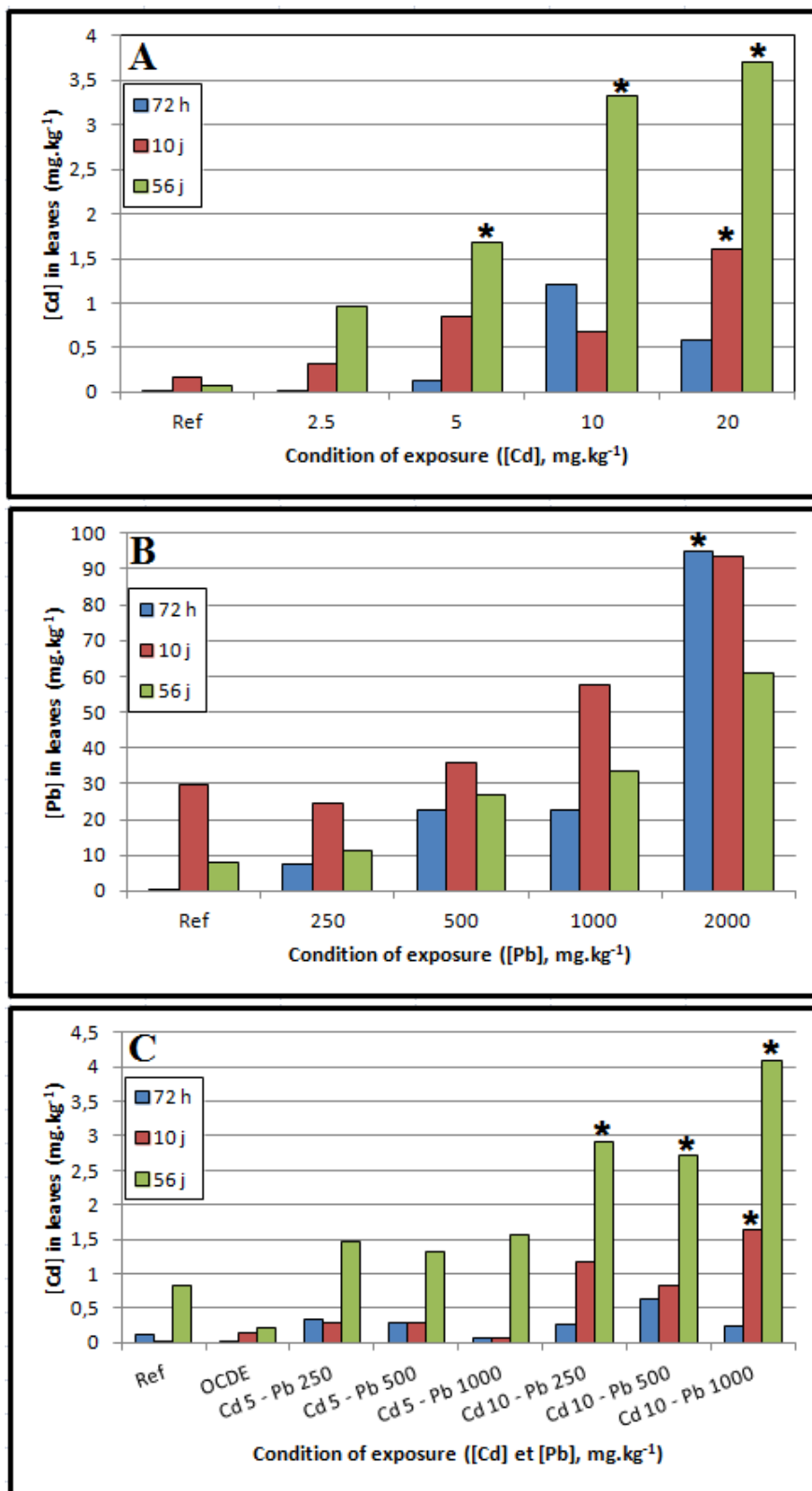


Figure 2: Accumulation of Cd in *B. oleracea* exposed to (A) Cd-spiked soils and to (B) Cd/Pb mix-spiked soils.

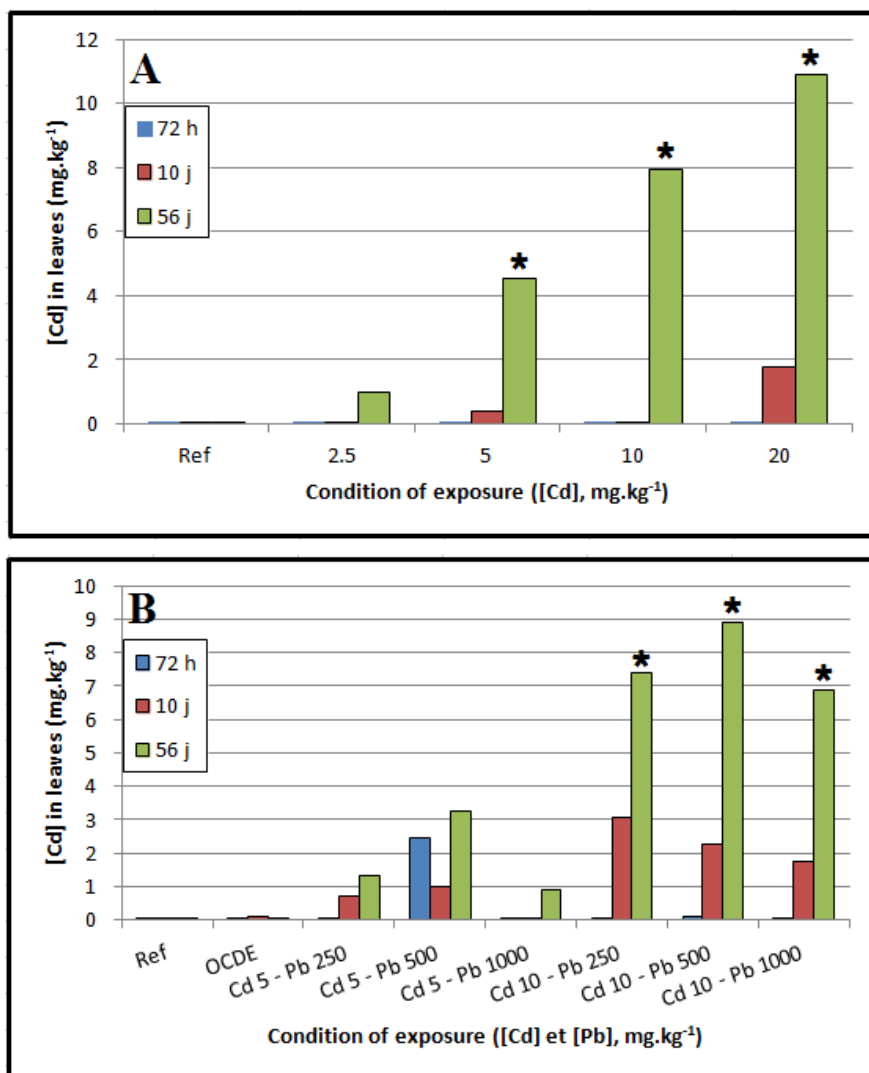


Figure 3: Relative fold expression of (A) *TrAPX1* and (B) *TrMT1B* in *T. repens* exposed to Cd.

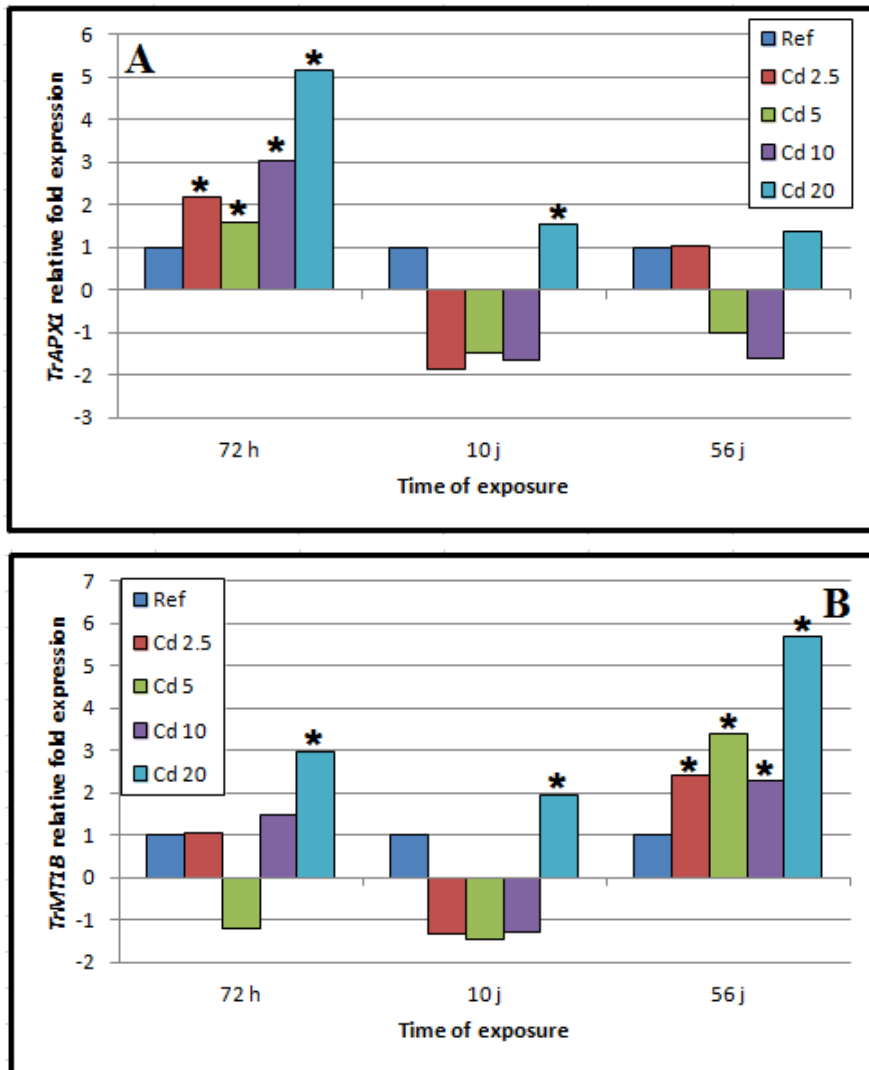
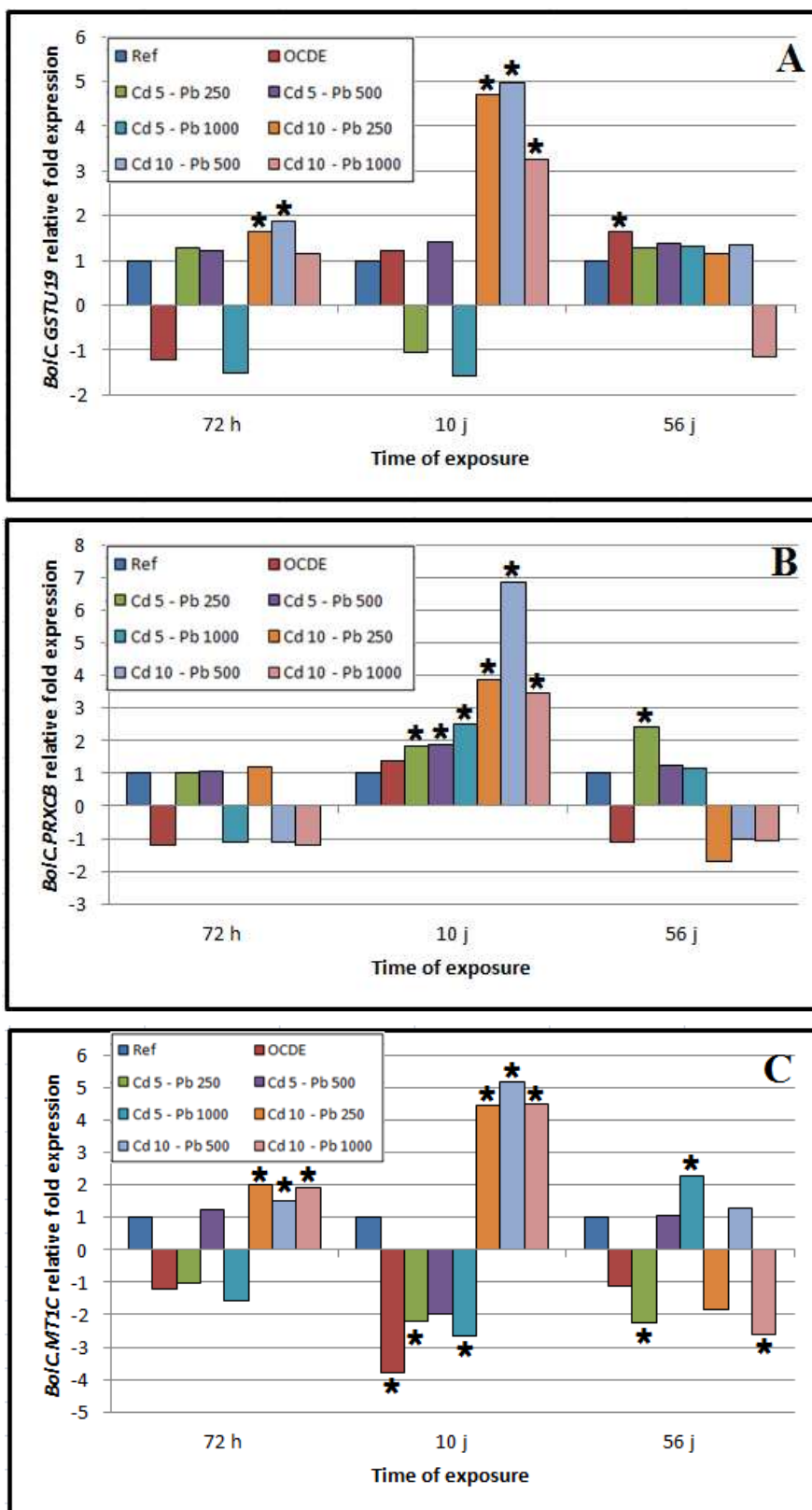


Figure 4: Relative fold expression of (A) *BolC.GSTU19*, (B) *BolC.PRXCB* and (C) *BolC.MT1C* in *B. olercea* exposed to Cd/Pb mix-spiked soils.



II.3) Utilisation du test des comètes afin d'évaluer les dommages à l'ADN chez *Trifolium repens* exposé à des éléments traces métalliques (Cd et Pb).

Les niveaux d'expression de gènes codant les principales protéines impliquées dans le stress oxydatif ont été mesurés et les résultats obtenus ont été présentés dans la Publication 3. Selon la littérature, le stress oxydatif serait l'un des principaux facteurs entraînant des effets génotoxiques lors d'une exposition à des contaminants métalliques. Par conséquent, nous avons effectué à la fois des mesures d'activité globale d'enzymes impliquées dans le stress oxydatif (APOX et GPOX) et l'évaluation des dommages à l'ADN grâce au test des comètes. En effet, un de nos objectifs est de proposer une surveillance environnementale du potentiel génotoxique d'un sol contaminé par des métaux lourds au travers de l'évaluation des dommages à l'ADN chez *T. repens* par le biais du test des comètes. Cette espèce est tolérante aux métaux et a été récemment proposée pour effectuer une surveillance environnementale par le biais de l'utilisation du test des comètes (Manier *et al.*, 2012; Bhat *et al.*, 2011). De plus, l'objectif de ce travail est également d'approfondir les connaissances actuelles concernant la génotoxicité des métaux étudiés (Cd et Pb) et de déterminer s'il y a un lien entre génotoxicité et stress oxydatif. Pour cela, *T. repens* a été exposé dans des microcosmes contenant un sol de référence artificiellement contaminé par du Cd et Pb, seuls ou en mélange pendant, 3, 10 et 56 jours.

Le test des comètes a été appliqué sur des noyaux provenant des cellules foliaires. Lors des expositions aux différentes conditions de Pb (0-2000 mg.kg⁻¹), aucun dommage à l'ADN n'a été observé quel que soit le temps d'exposition. En revanche, lors des expositions aux différentes conditions de Cd (0-20 mg.kg⁻¹) pendant 3 et 10 jours, les dommages à l'ADN augmentent en fonction de la concentration en Cd présente dans le sol. Par contre, après 56 jours d'exposition, aucun dommage à l'ADN n'a été observé quel que soit la concentration en Cd dans le sol. Ceci peut s'expliquer par une mise place de mécanismes de réparation et/ou de

protection de l'ADN, limitant ainsi les dommages persistants au sein du génome lors de l'exposition chronique ou bien par une séquestration efficace des métaux lourds pouvant mener ainsi à une baisse de l'accès à l'ADN. En ce qui concerne les plantes exposées aux sols contaminés par les mélanges de Cd et de Pb, les pourcentages des dommages à l'ADN sont plus faibles que ceux observés chez les plantes exposées au sol contaminé par le Cd mais sont cependant proches de ceux observés chez les trèfles exposés au sol contaminé par le Pb. Le Pb semble influencer le caractère génotoxique du Cd lorsque ces 2 métaux sont présents dans le même mélange.

DNA damage, Ascorbate and Guaiacol peroxidase activities in *Trifolium repens* in response to Cd and/or Pb spiked field soil exposures

Lanier C^{a,d}, Bernard F^{a,b}, Dumez S^a, Leclercq J^a, Lemièrre S^b, Vandebulcke F^b, Nesslany F^c, Platel A^c, Devred I^a, Cuny D^a, Deram A^{a,d*}.

^a Laboratoire des Sciences végétales et fongiques (EA 4483), Université Lille 2, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, 3 rue du Professeur Laguesse BP83, F-59006 Lille Cedex, France

^b LGCgE (EA 4515), Université Lille Nord de France (Univ. Lille 1), EcoNum-Ecotox, Cité scientifique, bâtiment SN3-Rdc, F-59655 Villeneuve d'Ascq, France

^c Laboratoire de Toxicologie Génétique (EA 4483), Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Pr Calmette BP245, F-59019 Lille Cedex, France

^d Faculté Ingénierie et Management de la santé (EA 4483), Université Lille 2, 42 rue Ambroise Paré, F-59120 Loos, France

* Corresponding author: Annabelle DERAM

Université Lille 2

Faculté d'ingénierie et de management de la santé EA 4483

42 rue Ambroise Paré

59120 Loos, France

tel : + 33 3 20 62 37 34; fax: +33 3 20 62 37 38

annabelle.deram@univ-lille2.fr

Running title: DNA damage and oxidative stress in *T. repens*

Key words: *Trifolium repens*, oxidative stress, APOX, GPOX, bioaccumulation, comet assay, Cd, Pb.

Abstract

The mechanisms of DNA damage induction are often associated with oxidative stress. Information on the relationship between the toxic effects of reactive oxygen species (ROS) and genotoxicity is rather limited in plants. The present study was design to investigate the relationship between DNA strand-breaks and peroxidases activity in white clover (*Trifolium repens*), an ecotoxicologically important species. For this purpose, *T. repens* was exposed to spiked soils (2.5 - 20 mg.kg⁻¹ Cadmium (Cd), 250-2000 mg.kg⁻¹ lead (Pb) and a mixture of these two heavy metals) for 3, 10 and 56 days. The resulting DNA damage (comet assay), peroxidase activities (APOX and GPOX) and bioaccumulation of Cd and Pb were subsequently determined in each sample of aerial parts. Exposure to Pb led to a small increase in peroxidases activity after short-term exposure, accompanied by an absence of DNA damage, for all exposure conditions. In return, DNA damage increased with the concentration of Cd added to the soil after very short-term exposure periods (3 and 10 days). Conversely, no DNA damage was detected using comet assay, after a long-term exposure (56 days). The APOX and GPOX activities did not vary significantly, whatever the Cd exposure. Moreover, when *T. repens* is exposed to a Cd/Pb mixture, the percentage of DNA damage was lower than when the plant is exposed to Cd monometallic. DNA damage was close to that observed in Pb monometallic exposure. Peroxidases activity could not be associated with DNA damage under these experimental conditions. These observations highlight the fact that the exposure time is a determinant factor in experiments designed to measure the influence of heavy metals exposure.

1. Introduction

Soil contamination by heavy metals is a well known consequence of anthropogenic activities, such as those associated with metallurgical industries. Furthermore, lead (Pb) and cadmium (Cd) are major environmental metallic pollutants, resulting from waste incineration, sludge deposition, use of pesticides, and vehicle exhausts emission (White & Claxton, 2004; Basol, 2012).

In plant models, Cd and Pb are considered to be non-essential elements, which have a negative influence on plant growth and development. The toxicity of these heavy metals appears to be related to a modified equilibrium between the production and elimination of reactive oxygen species, ROS (Cuypers et al., 2010).

Despite present knowledge of the origins of ROS, knowledge of the relationship between the toxic effects of ROS and genotoxicity is rather limited in plants when compared to that in humans and animals. A systematic relationship is often established on the basis of observations in plant growth but on hydroponics: *Arabidopsis thaliana* (Cuypers et al., 2011), *Vicia faba* (Shahid et al., 2011; Pourrut et al., 2011; Lin et al., 2007), *Allium cepa* (Herrero et al., 2012). Only a small number of *in vivo* studies has investigated the ROS-mediated genotoxicity in more realistic plant models, i.e. grown in contaminated soils. In this context, the current study explores this paradigm in plants, *via* their exposure to two heavy metals, Cd and Pb. Cd is known to have a direct and indirect genotoxic action (IARC, 2012). On the one hand, Cd could generate covalent bonds with DNA and on the other hand, it seems to be able to inhibit antioxidant systems and interact with proteins implicated in transcription, replication or repair mechanisms of DNA. Pb is thought to be an indirect genotoxic agent, whose action would be mediated by ROS. A comet assay (alkaline version) was selected to explore the genotoxic potential of these two metals, because it allows the quantitative assessment of primary DNA damage (single and double DNA breaks and alkali-labile sites) at the level of individual cells. Protocol was adapted from Koppen and Verschaeve (1996) who were the first authors to apply comet assay to *Vicia faba* root cells under alkaline conditions. *Trifolium repens* (White clover) has been used to a smaller extent (Manier et al., 2012; Mohsin Bhat et al., 2012). The results obtained with the latter model, which is widely distributed in the environment, appear to be strongly correlated with the mobile Cd fraction. *T. repens* can form root nodules with soil bacteria (*Rhizobium leguminosarum* *bv.* *trifolii*). This symbiotic association, which is essential for N₂ fixation and the subsequent fertilization of soils, makes *T. repens* an important species for environmental studies (Chaudri et al., 1993;

Chen et al., 2003; Manier et al., 2009). Realistic conditions are less frequently studied by taking into account (i) the plant growth in contaminated soil, (ii) the periods of exposure compatible with the lifetime of the plant, (iii) the time of occurrence of the genotoxic events and their long-term consequences. To the best of our knowledge, very little validated data has been recorded under these conditions dealing with genotoxicity in *T. repens* used in soil biomonitoring (White and Claxton, 2004; Aina et al., 2006; Bidar et al. 2007, 2009; Manier et al., 2012).

It was chosen to evaluate the oxidative stress by measuring two peroxidase activities in aerial part of *T. repens*. The enzymes selected for this study are: one Class I peroxidase (ascorbate peroxidase, APOX), and one Class III peroxidase (guaiacol peroxidase, GPOX). The main cellular function of Class I peroxidase is its ability to scavenge excess H₂O₂, whereas class III peroxidases are involved in a broad range of physiological processes such as plant defence reactions, cell elongation, ROS production and lignin and suberin formation (Cesarino et al., 2013). When oxidative stress increases, APOX implication occurs early (Halliweel-Asada pathway or ascorbate-glutathione cycle): according to Karuppanapandian et al. (2011), APOX activity rapidly increases to trap ROS when the balance between the production and elimination of ROS is disturbed. APOX has cytosolic and chloroplastic forms which have roles in H₂O₂ scavenging, quantum efficiency modulation and electron transport (Foyer and Noctor, 2005). In chloroplasts, the APOX enzyme exists in both soluble (sAPX) and thylakoid-bound (tbAPX) forms. GPOX is another antioxidant enzyme, but is not specific to oxidative stress and appears to be involved in lignin biosynthesis, plant growing and organogenesis (Cosio and Dunand, 2009). It can be considered as a “physiological well-being” indicator. The toxic potential of ROS should not hide the fact that these entities can also play such a key current signalling role in cells (Mittler et al., 2011).

The aim of the present study was (i) to present the results produced by biomonitoring the genotoxic potential of a soil contaminated by heavy metals, *via* a validated comet assay in plants, (ii) to improve current knowledge on the genotoxicity and oxidative stress relationship through the examples provided by Cd and Pb. Furthermore, as Cd and Pb often contaminate the same soils, the potential synergistic or antagonistic effects were also investigated with a Cd/Pb mixture.

2. Materiel and methods

2.1. Experiment design

Commercially-available dried seeds of *T. repens* biovar. Haifa (Australia) were used in this study. The seeds (4 g in 5 kg of soil) were sown directly onto the surface of 5 kg of compost, in growing bins (L 26 cm; l 32 cm; d 15 cm), then gently mixed down to a depth of one centimeter. The bins were placed in a ventilated greenhouse, stabilized at 20 °C. The plants were watered daily to avoid water stress. A 10-week period is needed to produce adult clover with nodules (Manier et al., 2009; Kreuzer et al., 2004). *T. repens* were then transferred to natural suburban soil, artificially contaminated with CdCl₂, Pb acetate or a mix of these compounds. The Cd-contaminated soils were prepared according to the following range of concentrations: 0; 2.5 [C1]; 5[C2]; 10 [C3] and 20 [C4] mg.kg⁻¹. The experimental contamination with Pb was carried out using the following range of concentrations: 0; 250 [C1]; 500 [C2]; 1000 [C3] and 2000 [C4] mg.kg⁻¹. Two series of soils contaminated with both Cd and Pb were prepared by combining the following concentrations of Cd: 5 or 10 mg.kg⁻¹ with the following concentrations of Pb: 250; 1000 and 2000 mg.kg⁻¹. As a control, the total Cd and Pb concentrations in the contaminated soils were then measured by an accredited soil analysis laboratory, the Laboratory of Soil Analysis (L.A.S., INRA, Arras, France). Results for Cd were [C1] = 2.75 mg.kg⁻¹, [C2] = 5.08 mg.kg⁻¹, [C3] = 8.98 mg.kg⁻¹ Cd, [C4] = 19.2 mg.kg⁻¹. Results for Pb were [C1] = 316 mg.kg⁻¹ Pb, [C2] = 552 mg.kg⁻¹ Pb, [C3] = 1150 mg.kg⁻¹ Pb, [C4] = 2080 mg.kg⁻¹ Pb. This confirms that the spiking procedure doping is effective to prepare contaminated soils with heavy metals. We retain the theoretical concentrations in graphics for understanding.

After 10 weeks of growth in compost, *T. repens* were transplanted into 9 pots for each of the aforementioned contamination conditions (144 pots). Samples were then collected from 3 of these pots after 3, 10 and 56 days of exposure.

2.2. Collecting and sampling

Following contamination exposure, 2 x 50 mg of fresh leaflets were collected from each pot for the comet assay. A further 100 mg of leaflets were collected from each pot, frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for the antioxidant enzyme assays. The remaining shoots were used for bioaccumulation measurements.

2.3. Bioaccumulation

In order to determine the Cd and Pb concentrations in their aerial parts of *T. repens*, shoot samples were dried at 40°C at constant weight and then ground. The dried shoot subsamples (150 ± 20 mg) and a blank were digested overnight in 1 mL HNO₃ in PTFE beakers, and then heated at 130°C in a sand bath for two hours, with a PTFE cap placed over each beaker. The beakers were removed from the sand bath to lower their temperature, following which 1mL of a mixture of HNO₃: H₂SO₄: HClO₄ (10: 2: 3, v/v/v) was added to the beakers, which were then heated to 180°C until perchloric acids fumes could be observed. The digests were then cooled and diluted to 20 mL with milliQ water. Following filtration (Whatman n°42 ashless filter paper), the samples were stored in polyethylene bottles. Cd and Pb concentrations were determined by plasma emission spectrometry (ICP-AES: Varian Vista Pro CCD Simultaneous ICP-AES, Varian SA, France), at the Géosystèmes laboratory (UMR CNRS 8157, France).

2.4. Comet assay

Primary DNA lesions were determined by adapting the alkaline comet assay protocols established by Singh et al. (1988) and Gichner et al. (2004) to *T. repens*. All of the protocol steps were carried out on a bed of ice and protected from direct light. For each sample, 2 x 50 mg of fresh plant material were collected, and cut using a razor blade into 2 x 100 µL of a Tris-HCl extraction buffer (pH 7.5 at 4 ° C). 150 µL of each nuclei-containing sample was added to 150 µL of LMPA agar gel (1%). Seventy-five µL of this mixture was deposited onto a slide prepared with agar gel (NA 1%), and then covered with a coverslip. The slides were maintained at 4°C for 15 minutes. A final layer of agar was then applied to protect the layer containing the nuclei. Unwinding and denaturation of the DNA as well as electrophoresis are described in Manier et al. (2012). The slides were observed in accordance with the procedure described in Koppen et al. (1999). On each slide, 30 nuclei were analysed. The comets were examined by means of a camera (Hitachi KP-M1EK/KINIEM) connected to an image-analysis system, including image analysis software (Komet 4.0 - Kinetic Imaging, Liverpool, England). The Tail Intensity (TI) variable was used to monitor DNA fragmentation.

2.5. Antioxidant enzyme assays

The protocol was adapted from the method described by Manier et al. (2012). Briefly, frozen *T. repens* leaves were ground in liquid nitrogen. The antioxidant enzymes were extracted by adding 500 µl of an ice-cold Tris-HCl buffer to 100 mg FW of powdered *T. repens* leaves. The

Tris-HCl buffer (pH 7) contained 2 mM EDTA, 1 mM dithiothreitol and 0.1 M tris(hydroxymethyl)aminomethane. After mixing with a vortex mixer, the homogenate was centrifuged twice at 20 000 g and 4°C for 10 min. The supernatant was used for the enzyme activity determination, measured *in vitro* under non-limiting reaction conditions. The measurement was performed at ambient temperature using an UV/visible microplate spectrophotometer (multiskan spectrum, ThermoScientific, Rockford, IL, USA). The data was acquired using the SkanIt software package (ThermoScientific).

Guaiacol peroxidase (GPOX, EC 1.11.1.7) uses guaiacol as a hydrogen donor to break down H₂O₂ thereby forming H₂O and tetraguaiacol. GPOX activity was measured by monitoring the increase in tetraguaiacol concentration at 436 nm for 3 min. The reaction mixture (150 µl) contained 5 µl of supernatant, a potassium phosphate buffer (0.077 M, pH 7), guaiacol (2.7 x 10⁻⁴ M), and H₂O₂ (8 x 10⁻⁴ M).

Ascorbate peroxidase (APOX, EC 1.11.1.11) uses ascorbate as a hydrogen donor to break down H₂O₂ thereby forming H₂O and monodehydroascorbate. APOX activity was measured by monitoring the decrease in Na-L-ascorbate concentration at 298 nm for 5 min. The reaction mixture (300 µl) contained 10 µl of supernatant, a HEPES-EDTA buffer (0.087 M, pH 7), Na-L-ascorbate (2.02 x 10⁻³ M), and H₂O₂ (6.7 x 10⁻⁴ M).

2.6. Data analysis

Since the results [tail intensity (TI)] of the comet assay do not have a Gaussian distribution (Bauer et al., 1998), non-parametric Kruskal–Wallis tests were used. The statistical significance of the difference between exposed groups was determined using post-hoc Dunn tests.

APOX and GPOX enzyme activities were calculated using the molar extinction coefficient (ϵ) equal to 2.8 mM⁻¹.cm⁻¹ for ascorbate and 26.6 mM⁻¹.cm⁻¹ for tetraguaiacol. Results are expressed as mean \pm standard deviation, calculated (for the 3 prepared samples) in nanokatal per gram of recovered biomass after grinding (nkat.g⁻¹ FW). After verifying that the conditions of normality (Kolmogorov–Smirnov's test) and homogeneity of the variances (Levene test) were respected, a one-way ANOVA, followed by post-hoc Tukey tests, was carried out for the above parameters. In all other cases, the non-parametric Kruskal–Wallis test was carried out.

These statistical tests, together with the descriptive statistics used to study the bioaccumulation data, were made using the software program XLSTAT (Version 2010.5.02; Addinsoft, France, Paris, 2010).

3. Results

3.1. Bioaccumulation in *T. repens*

Globally, the Cd concentration in the aerial parts of *T. repens* is weak (Figure 1A). Therefore, concentrations observed in the shoots of *T. repens* are statistically different at 3 and 10 days ($p=0.0301$), and much higher at 56 days ($p=0.001$). After 3 days of exposure, there is a slight but non-significant increase in Cd concentration in the shoots when Cd concentration in soil increases. At 10 and 56 days, the Cd concentrations are significantly higher than at 3 days, in Cd-spiked reference soil. After 56 days, accumulated concentration is generally greater than or equal to that observed after 72 hours of exposure.

Like Cd, the concentration of Pb in the aerial parts of *T. repens* increases following the addition of Pb acetate to the reference soil (Figure 1B). The accumulation of Pb is greatest and statistically significant, when the soil is spiked with 2000 mg/kg of Pb. On the other hand, influence of the time is relatively low, i.e. an increased time of exposure does not lead to more significant Pb concentrations in the shoots of *T. repens*.

In the case of Cd exposure, the two parameters, exposure time and concentration in soil, influence accumulation while in the case of Pb exposure, the concentration in soil seems to be the main factor.

When plant are exposed to Cd/Pb mixtures, the accumulation of Cd in the aerial parts of *T. repens* is similar to that obtained with Cd alone, in terms of concentration. With 5 mg/kg concentrations of Cd and Pb added to the reference soil (Figure 2A), the accumulated levels of contamination are statistically higher after 56 days than after 3 and 10 days of exposure ($p=0.0002$ and $p=0.0001$, respectively). Moreover, there is neither statistical difference between the reference soil and other soils, nor any significant difference in accumulation between *T. repens* exposed to Cd alone and *T. repens* exposed to a Cd/Pb combination.

In the case of co-exposure with Pb and 10 mg/kg of Cd (Figure 2B), the resulting Cd concentration in the shoots of *T. repens* is similar that those found following exposure to Cd alone. Significant differences in contamination were revealed for different exposure times ($3d \neq 10d$, $p=0.0041$; $10d \neq 56d$, $p=0.0001$). There is no significant difference in Cd accumulation between *T. repens* exposed to Cd alone, and *T. repens* exposed to Cd mixed with Pb.

3.2. DNA damage

An increase level of DNA damage (Figure 3A) is observable after 72 hours and 10 days, depending on the quantity of Cd added to the reference soil, whereas the tail intensity is weak

at 56 days. After 10 days of exposure, there are statistically significant differences between the reference soil and the highest concentrations, i.e. 10 and 20 mg.kg⁻¹ of Cd added to the reference soil (p<0.001).

In the case of Pb (Figure 3B), the DNA breaks measured following exposure are weak, and statically comparable with the break percentage determined for the reference soil. These results do not lead us to the conclusion that there are genotoxic effects, such as DNA double-strand breaks, with this heavy metal. This observed characteristic of Pb, i.e. that it is not genotoxic in leaves, is in agreement with other results published in the literature (Gichner et al., 2008).

In the case of co-exposure with 5 mg.kg⁻¹ Cd (Figure 4A), after 3 days of exposure or 10 days of exposure, the level of DNA damage appears lower than for the case when *T. repens* was exposed to Cd alone. In the case of 10/1000 mg.kg⁻¹ Cd/Pb co-exposure (Figure 4B), the tail intensity is less significant than in the case of exposure to less contaminated soils. The very damaged nuclei (i.e. ghost cells) were not taken in to account for analysis. The detection of these comets without distinct head can be considered indicative the sensitivity of the comet assay, although it can sometimes complicate the interpretation of results.

These results on the genotoxicity of heavy metals must to be compared with the results of bioaccumulation. In the case of monometallic exposures, accumulated concentrations of Pb are weak as TI. It is difficult in this case to conclude on the genotoxicity of Pb since Pb phytodisponibility is weak. It highlights the fact that bioaccumulation parameters must be controlled to a correct interpretation of genotoxic potential studied in a comet assay. Nevertheless, bioaccumulation cannot be the single factor explaining differences in TI. In the case of Cd, the accumulation is not strictly related to the percentage of DNA breaks. This is especially noticeable after 56 days of exposure: the bioaccumulation is the strongest while the rate of DNA breaks is low. The mechanisms leading to DNA breaks are complex, with for example the involvement of repair mechanisms. A real correlation between the rate of DNA damage and bioaccumulation cannot be considered.

3.3. APOX and GPOX activities

APOX activity is not modified by Cd exposure, for all of the exposure times used in the present study (Figure 5A). After 10 and 56 days of Cd exposure, a decrease in GPOX activity is noted for the addition of 2.5, 5 and 10 mg.kg⁻¹ Cd to the soil (p-value = 0.002 and < 0.001, respectively). When plants were exposed to the highest concentration of Pb, an increase in APOX activity was observed at 72 hours (p-value (reference vs 2000 mg.kg⁻¹) = 0.001). No

similar effect is revealed after 10 or 56 days of exposure (figure 5B). With the shortest exposure time, the increase in GPOX activity is correlated with the increasing quantities of Pb added to the reference soil (p-value (reference vs 2000 mg.kg⁻¹) = 0.001). With longer exposure times, the GPOX activity is at approximately 25 nkat.g⁻¹. A significant decrease in activity at 10 days (p-value = 0.001) is noted for 250 mg.kg⁻¹.

Co-exposure to Cd and Pb (Figure 6A and 6B) does not produce a significant change in APOX activity, except in the case of 10 days of co-exposure involving 5 mg.kg⁻¹ Cd and 1000 mg.kg⁻¹ Pb (p-value = 0.003). Co-exposure does not lead to a significant change in GPOX activity, whatever the Pb and Cd concentrations..

4. Discussion

In our plant model, the DNA damage observed following Pb exposure is close to that observed in non-contaminated soil. Lead is not found to have genotoxic characteristics under the experimental conditions described above. However, Rucińska et al. (2004) and Shahid et al. (2011) demonstrate that Pb could cause breaks in DNA single- and double-strands in *Lupin* root cells (150 and 350 mg.l⁻¹) and in *Vicia faba* roots (5 µM). The latter conclusions could be explained by the different conditions of exposure used in these studies, since *Lupin* and *Vicia* seedlings were exposed to a Pb(NO₃)₂ solution for a shorter period of time (48 h and 6 h, respectively). Moreover, most genotoxicity studies are carried out in the plant roots, which are more strongly bioaccumulative than the aerial parts of these plants. In our experiments, whereas accumulation in the aerial parts of *T. repens* increases with the soil concentration of Pb, accumulation in shoots is weak (up to 90 mg.kg⁻¹). In similar contaminated soils (1222 mg.kg⁻¹ Pb), Bidar et al. (2007) measured a same level of bioaccumulation in shoots of *T. repens* (about 40 mg.kg⁻¹) 6 months after the sowing. In addition, a gap, especially visible after 3 and 10 days of exposure, exists between the bioaccumulation measured after exposure to slightly or moderately contaminated soils (40 mg.kg⁻¹ Pb in shoots) and after exposure to a heavily contaminated soil (90 mg.kg⁻¹ Pb in aerial parts). This difference could point out a beginning of Pb toxicity on the plant. This hypothesis is supported by the fact that the same decrease of tolerance is highlighted on morphological parameters historically followed in this type of study (Manier et al., 2012). For example, a decrease of the number of nodules was observed among individuals exposed to 2000 mg.kg⁻¹ Pb compared to the reference (10 and 30 nodules respectively; data not shown). Moreover, the APOX and GPOX activities measured in the present study increased after 72 hours of exposure. This may be an indication of H₂O₂ accumulation in plant cells (Stavreva and Gichner, 2002), related to the translocation

of Pb to the aerial parts of the plants. Pourrut et al. (2011) proposed that Pb genotoxicity could be mediated by ROS production, but no consensus exists on the precise nature of the radicals involved in this process. Under the experimental conditions of the present study, peroxidases activity remains weak (the greatest level of activity resulting from exposure to 2000 mg.kg⁻¹ Pb corresponds to only twice the basal level of activity), and does not indicate massive production of ROS. Since the measured DNA damage is not greater than the basal percentage, the ROS concentration may not be sufficient to cause DNA breaks. The ROS may therefore be neutralized before reaching DNA. The differences between the study of Pourrut et al. (2011) and the results presented here could be explained by the method used to highlight ROS implication. The former authors used vitamin E, a scavenger of ROS, whereas in the present study, the peroxidases activity was measured. Direct measurements of ROS (e.g., H₂O₂) or of antioxidant enzymes activities (SOD, CAT...) could contribute to an improved understanding of these phenomena (Li and Yi, 2012).

When exposed to mono-metallic Cd contamination, DNA damage in *T. repens* increases with Cd concentration in the trials of shortest duration (3 and 10 days). Our results, demonstrating the genotoxicity of Cd in plants, are consistent with one other publication (Manier et al., 2012). In the case of long term monitoring (56 days), DNA damage was not detectable in our comet assay. This observation could not be explained by a decrease in the bioaccumulation of Cd, since our results show that this phenomenon increases as a function of time. An explanation for the lack of genotoxicity observed in our long term study could be proposed through the possible presence of DNA repair and/or protection mechanisms, preventing persistent damage to the genome in the presence of chronic exposure. For example, Irfan et al. (2013) recently described an efficient sequestration of heavy metals, diminishing DNA access. Majority of Cd entered appears to be channelized to the root vacuoles or of older leaves thanks to Zn and Mn transporters. Many authors have established a relationship between ROS and DNA damage. In the experiments described here, some Cd is present in the plant, such that the hypothesis of a correlation between peroxidases activity and Cd bioaccumulation could be proposed. However, APOX and GPOX activities were not found to vary significantly, whatever the Cd concentration, as also described by Romero-Puertas et al. (2007) in *Pisum*. Thus, the increase in former DNA damage observed in the current study may not result from ROS supported by APOX/GPOX systems in *T. repens* cells. Moreover, this relationship between ROS and DNA damage is difficult to prove, because these two phenomena do not occur at the same time. ROS appear and disappear quickly after stress

whereas DNA damage can be persistent. The monitoring of gene expression profiles (e.g., ligase genes to explore DNA damage repair or proteins involved in cations transport to explore competitive phenomena) may provide greater insight into the mechanisms of genotoxicity observed in Cd and multi-metallic exposure.

Concerning co-exposure studies, potential genotoxic effects of a soil contaminated by a Cd and Pb mixture are scarce. The genotoxic profile is the same as that found in the case of a mono-metallic exposure, close to that of Pb. According to these results, *T. repens* exposed to the Cd/Pb mixture presents a DNA damage percentage which is lower than that measured when it is exposed to monometallic Cd contamination. This suggests that the influence of Pb on the genotoxic effects of Cd cannot be excluded, in particular for the smallest tested concentration (5 mg.kg^{-1} Cd), regardless of the Pb concentration. In order to highlight the role of Pb, we explored ROS induction and bioaccumulation in the aerial parts of *T. repens*, and observed the same trends as those measured in the case of monometallic exposure. APOX and GPOX activities did not vary significantly, whatever the exposure, except following 10 days of exposure to a 5 mg.kg^{-1} Cd / 1000 mg.kg^{-1} Pb mixture. In the bioaccumulation study, there is no difference in Cd accumulation, when *T. repens* is exposed to Cd alone, or Cd/Pb mixture. A potential effect of Pb exposure could follow from the formation of DNA-DNA and/or DNA-protein cross-links (Woźniak & Blasiak, 2003), decreasing access opportunities for Cd.

In plants, only very limited data are available concerning the effects of Pb on genetic material, and DNA interaction mechanisms. Our study highlights the importance of studying the genotoxic mechanisms of Pb, in order to investigate: (i) the contradiction concerning its own genotoxicity, and (ii) the fact that it possibly affects the genotoxic character of Cd during co-exposure. However, further experiments could be carried out in plants, which accumulate greater quantities of Pb, and are useful in genotoxicity studies. Such experiments could also improve current knowledge of the interaction mechanisms in metallic mixtures; Cd genotoxicity, but not Cd bioaccumulation, is influenced by the presence of Pb in contaminated soil.

5. Conclusions

The aim of this study was to investigate genotoxicity, using comet assays in an ecotoxicologically important test species under realistic conditions. This approach was combined with two elements of explanation: bioaccumulation measurements and the

monitoring of peroxidases activity. All of these aspects were investigated in a field soil spiked with Pb or Cd or a mixture of both of these metals, for three different periods of time (3, 10 and 56 days). This study demonstrates the effectiveness of the comet assay for the detection of DNA damage in our studied species (*T. repens*) exposed to realistic concentrations of heavy metals. Cd genotoxicity in plants is confirmed. The increase in former DNA damage, observed following Cd exposure, may not result from ROS supported by APOX/GPOX systems in *T. repens* cells. In the case of Pb, the absence of a consensus on the genotoxic potential of Pb should encourage further studies in plant models. Furthermore, less DNA damage occurs during co-exposure than during exposure to Cd alone, under the experimental conditions of our study. Since the influence of Pb in co-exposure conditions cannot be excluded, further research is needed in this field. In particular, studies carried out under environmental conditions with field-collected contaminated soils, which respect the plants' metabolism (lifetime, growth in soil), should provide greater insight into these effects. Future work should be accompanied by a study of the bioaccumulation of metals, designed to verify the penetration of toxic substances in the plant. This type of investigation is quite rare in current studies. Finally, experimental genomic studies will be needed, in order to gain an improved understanding of genotoxicity and protection.

Acknowledgements

The present study was supported by a grant from ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) and Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Fabien B. was supported by a doctoral fellowship from ADEME and Région Nord/Pas-de-Calais. The authors gratefully thank Dr Franck Marot from ADEME for his financial support and helpful discussions.

References

Aina, R., Palin L., Citterio S., 2006. Molecular evidence for benzo[a]pyrene and naphthalene genotoxicity in *Trifolium repens* L. *Chemosphere*. 65(4), 666-673.

BASOL, 2012. Base de données BASOL sur les sites et sols pollués (ou potentiellement pollués) appelant une action des pouvoirs publics, à titre préventif ou curative, Ministère de l'écologie, du développement durable et de l'énergie, Paris, France. Available from: <http://basol.environnement.gouv.fr/tableaux/home.htm#nature%20polluants>.

- Bauer, E., Recknagel, R.D., Fiedler, U., Wollweber, L., Bock, C., Greulich, K.O., 1998. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (comet assay) obeys a chi-square (χ^2) not a gaussian distribution. *Mutat. Res.* 398, 101–110.
- Bidar, G., Garçon, G., Pruvot, C., Dewaele, D., Cazier, F., Douay, F., Shirali, P., 2007. Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environ. Pollut.* 147 (3), 546-553.
- Bidar, G., Pruvot, C., Garçon, G., Verdin, A., Shirali, P., Douay, F., 2009. Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 16(1), 42-53.
- Cesarino, I., Araújo, P., Paes Leme, A.F., Creste, S., Mazzafera, P., 2013. Suspension cell culture as a tool for the characterization of class III peroxidases in sugarcane. *Plant Physiol. Biochem.* 62, 1-10.
- Chaudri, A.M., McGrath, S.P., Giller, K.E., Rietz, E., Sauerbeck, D.R., 1993. Enumeration of indigenous *Rhizobium leguminosarum* biovar *Trifolii* in soils previously treated with metal-contaminated sewage sludge. *Soil Biol. Biochem.* 25(3), 301-309.
- Chen, Y.X., He, Y.F., Yang, Y., Yu, Y.L., Zheng, S.J., Tian, G.M., Luo, Y.M., Wong M.H., 2003. Effect of cadmium on nodulation and N₂-fixation of soybean in contaminated soils. *Chemosphere.* 50(6), 781-787.
- Cosio, C., Dunand, C., 2009. Specific functions of individual class III peroxidase genes. *J. Exp. Bot.* 60(2), 391–408.
- Cuypers, A., Plusquin, M., Remans, T., Jozefczak, M., Keunen, E., Gielen, H., Opdenakker, K., Nair, A.R., Munters, E., Artois, T.J., Nawrot, T., Vangronsveld, J., Smeets, K., 2010. Cadmium stress: an oxidative challenge. *Biometals.* 23, 927–940.
- Cuypers, A., Smeets, K., Ruytinx, J., Opdenakker, K., Keunen, E., Remans, T., Horemans, N., Vanhoudt, N., Van Sanden, S., Van Belleghem, F., Guisez, Y., Colpaert, J., Vangronsveld, J., 2011. The cellular redox state as a modulator in cadmium and copper responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *J. Plant Physiol.* 168 (4), 309-316.

- Foyer, C.H., Noctor, G., 2005. Redox homeostasis and antioxidant signaling: A metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell*. 17, 1866–1875.
- 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. *Mutat. Res.* 559(1-2), 49-57.
- Gichner, T., Žnidar, I., Száková, J., 2008. Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants. *Mutat. Res.* 652, 186-190.
- Herrero, O., Pérez Martín, J.M., Fernández Freire, P., Carvajal López, L., Peropadre, A., Hazen, M.J., 2012. Toxicological evaluation of three contaminants of emerging concern by use of the *Allium cepa* test. *Mutat. Res.* 743 (1–2), 20-24.
- IARC (International Agency for Research on Cancer), 2012. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts, Cadmium and Cadmium compounds. Volume 100C. pp. 121-145. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/>
- Irfan, M., Hayat, S., Ahmad, A., Alyemeni, M.N., 2013. Soil cadmium enrichment: Allocation and plant physiological manifestations. *Saudi J. Biol. Sc.* 20, 1-10.
- Karuppanapandian, T., Wang, H.W., Prabakaran, N., Jeyalakshmi, K., Kwon, M., Manoharan, K., Kim, W., 2011. 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-induced leaf senescence in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilczek) and senescence inhibition by co-treatment with silver nanoparticles. *Plant Physiol. Biochem.* 49(2), 168-177.
- Koppen, G., Verschaeve, L., 1996. The alkaline Comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells. *Mutat. Res.* 360, 193–200.
- Koppen, G., Toncelli, L.M., Triest, L., Verschaeve, L., 1999. The comet assay: a tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. *Mech. Ageing Dev.* 110(1-2), 13-24.
- Kreuzer, L., Bonkowski, M., Langel, R., Scheu, S., 2004. Decomposer animals (*Lumbricidae*, *Collembola*) and organic matter distribution affect the performance of *Lolium perenne* (*Poaceae*) and *Trifolium repens* (*Fabaceae*). *Soil Biol. Biochem.* 36(12), 2005-2011.

- Li, L., Yi, H., 2012. Effect of sulfur dioxide on ROS production, gene expression and antioxidant enzyme activity in Arabidopsis plants. *Plant Physiol. Biochem.* 58, 46-53.
- Lin, A.J., Zhang, X.H., Chen, M.M., Cao, Q., 2007. Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *J. Environ. Sci.* 19(5), 596-602.
- Manier, N., Deram, A., Broos, K., Denayer, F.O., Van Haluwyn, C., 2009. White Clover nodulation index in heavy metal contaminated soils a potential bioindicator. *J. Environ. Qual.* 38, 685-692.
- Manier, N., Brulle, F., Le Curieux, F., Vandebulcke, F., Deram, A., 2012. Biomarker measurements in *Trifolium repens* and *Eisenia fetida* to assess the toxicity of soil contaminated with landfill leachate: a microcosm study. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 80(1), 339-348.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F., 2011. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16(6), 300-309.
- Mohsin Bhat, T., Ansari MYK., Choudhary S., Aslam R., 2011. Synergistic cytotoxic stress and DNA damage in Clover (*Trifolium repens*) exposed to heavy metal soil from automobile refining shops in Kashmir-Himalaya. *ISRN Toxicol.* 1-7.
- Pourrut B., Jean S., Silvestre, J., Pinelli, E., 2011. Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: Potential involvement of oxidative stress. *Mut. Res.* 726, 123– 128.
- Romero-Puertas, M.C., Corpas, F.J., Rodriguez-Serrano, M., Gómez, M., del Río L.A., Sandalio, L.M., 2007. Differential expression and regulation of antioxidative enzymes by cadmium in pea plants. *J. Plant Physiol.* 164, 1346-1357.
- Rucińska, R., Sobkowiak, R., Gwóźdź, E.A., 2004. Genotoxicity of Pb in lupin root cells as evaluated by the comet assay. *Cell Mol. Biol. Lett.* 9(3), 519-528.
- Shahid, M., Pinelli, E., Pourrut, B., Silvestre, J., Dumat, C., 2011. Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74 (1), 78-84.

Singh, N.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. *Exp. Cell Res.* 175(1), 184-191.

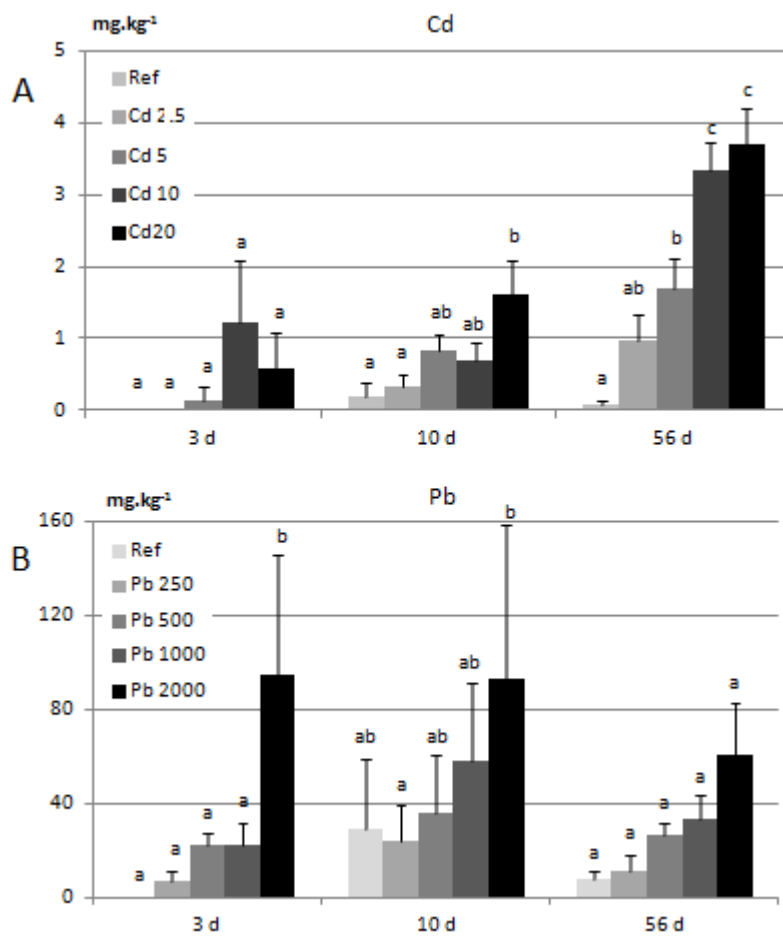
Stavreva, D.A., Gichner, T., 2002. DNA damage induced by hydrogen peroxide in cultured tobacco cells is dependent on the cell growth stage. *Mutat. Res.* 514(1-2),147-152.

White, P.A., Claxton, L.D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mut. Res.* 567, 227-345.

Woźniak, K., Blasiak, J., 2003. In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double DNA strand breakx and DNA-protein cross-links. *Mut. Res.* 535, 127-139.

Figure captions

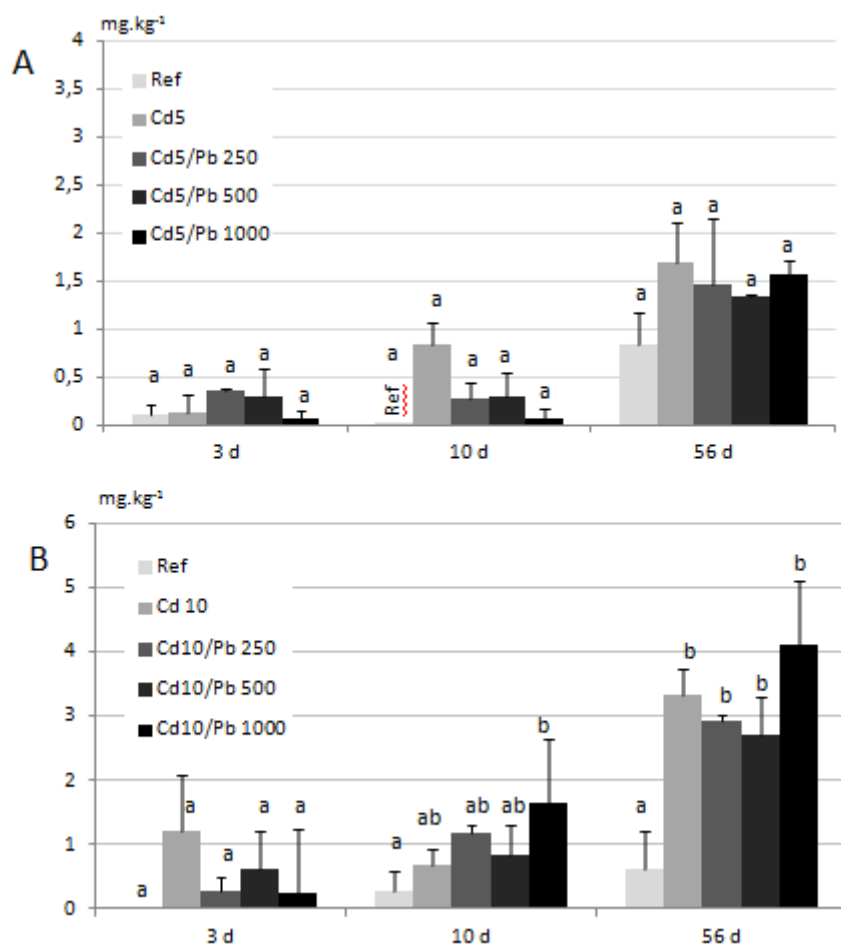
Figure 1



Pb and Cd bioaccumulation (mg.kg^{-1}) in shoots of *T. repens* ($n=3$) after 3, 10 and 56 days of exposure in the reference soil (0.54 mg.kg^{-1} Cd; 94.6 mg.kg^{-1} Pb) and in soils contaminated with Cd (Fig. 1A) or Pb (Fig. 1B) in various proportions.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

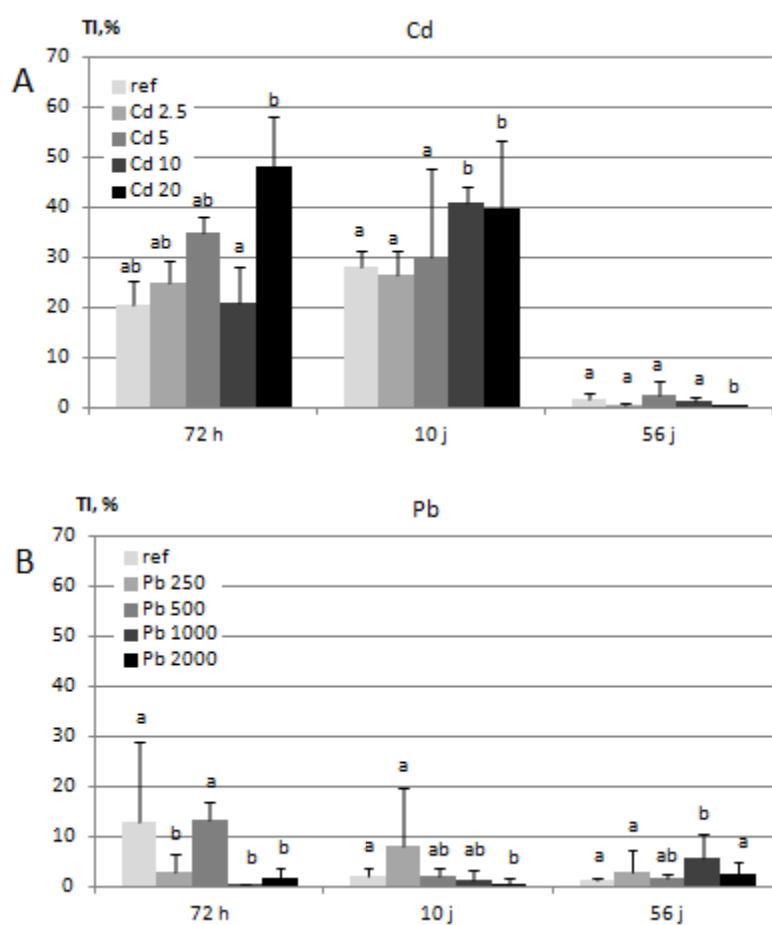
Figure 2



Cd bioaccumulation (mg.kg⁻¹) in shoots of *T. repens* (n=3) after 3, 10 and 56 days of exposure in the reference soil, soils contaminated with 5 mg.kg⁻¹ Cd (Fig. 2A) or 10 mg.kg⁻¹ Cd (Fig. 2B) and soils contaminated with both Pb and Cd in various proportions.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

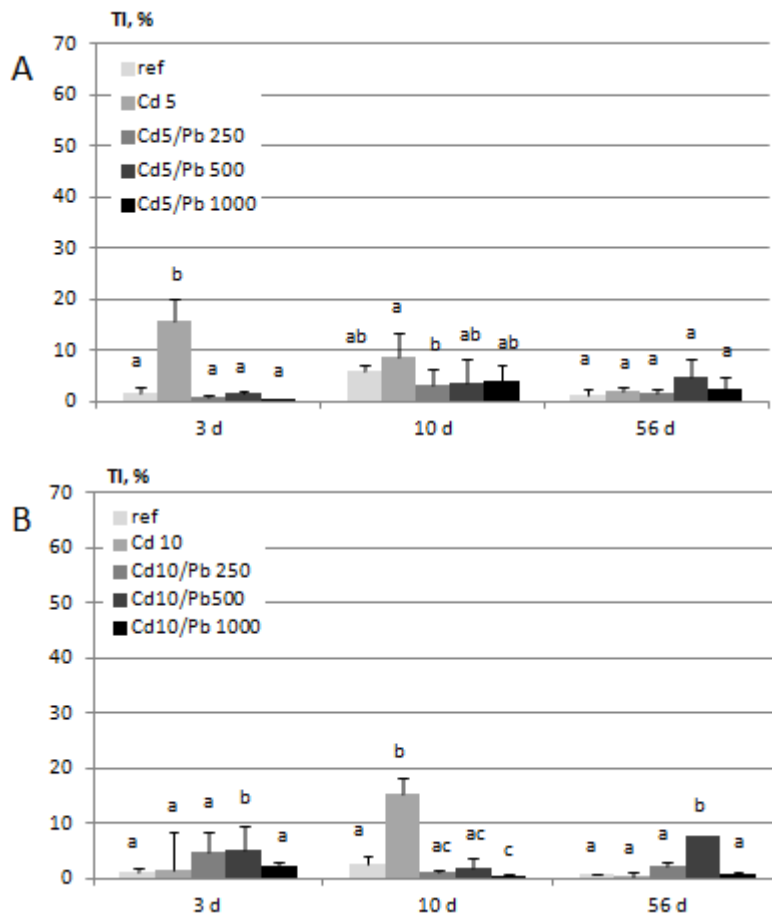
Figure 3



Induction of DNA damage evaluated by median Comet tail intensity (median percentage +/- standard deviation (n=3)) in *T. repens* after 3, 10 and 56 days of exposure in the reference soil and soils contaminated with Cd (Fig. 3A) or/and Pb (Fig. 3B) in various proportions.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

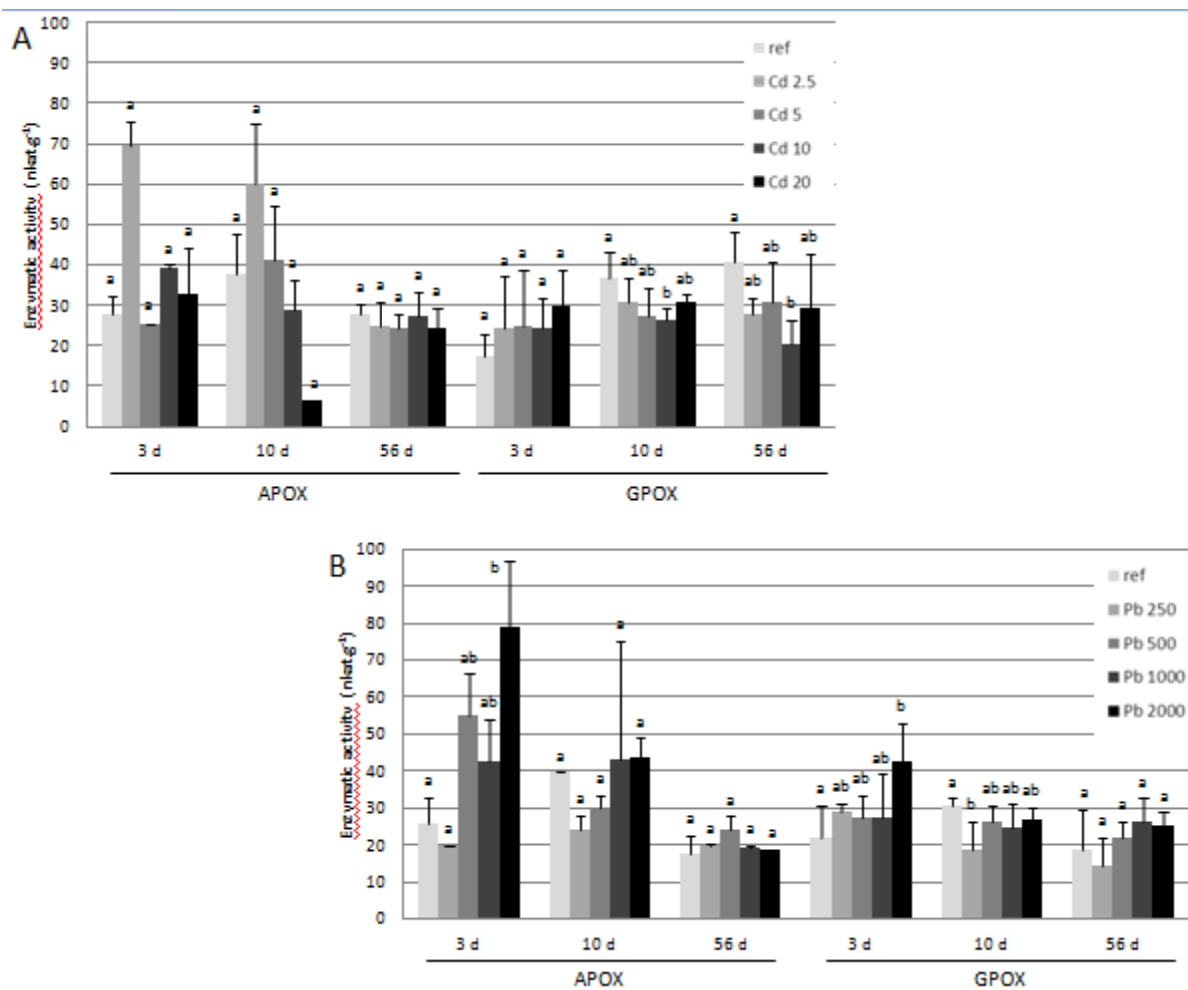
Figure 4



Induction of DNA damage evaluated by median Comet tail intensity (median percentage \pm standard deviation ($n=3$)) in *T. repens* after 3, 10 and 56 days of exposure in the reference soil and soils contaminated with a mix of Cd (Fig. 4A, 5 ppm or Fig. 4B, 10 ppm) and Pb in various proportions.

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$.

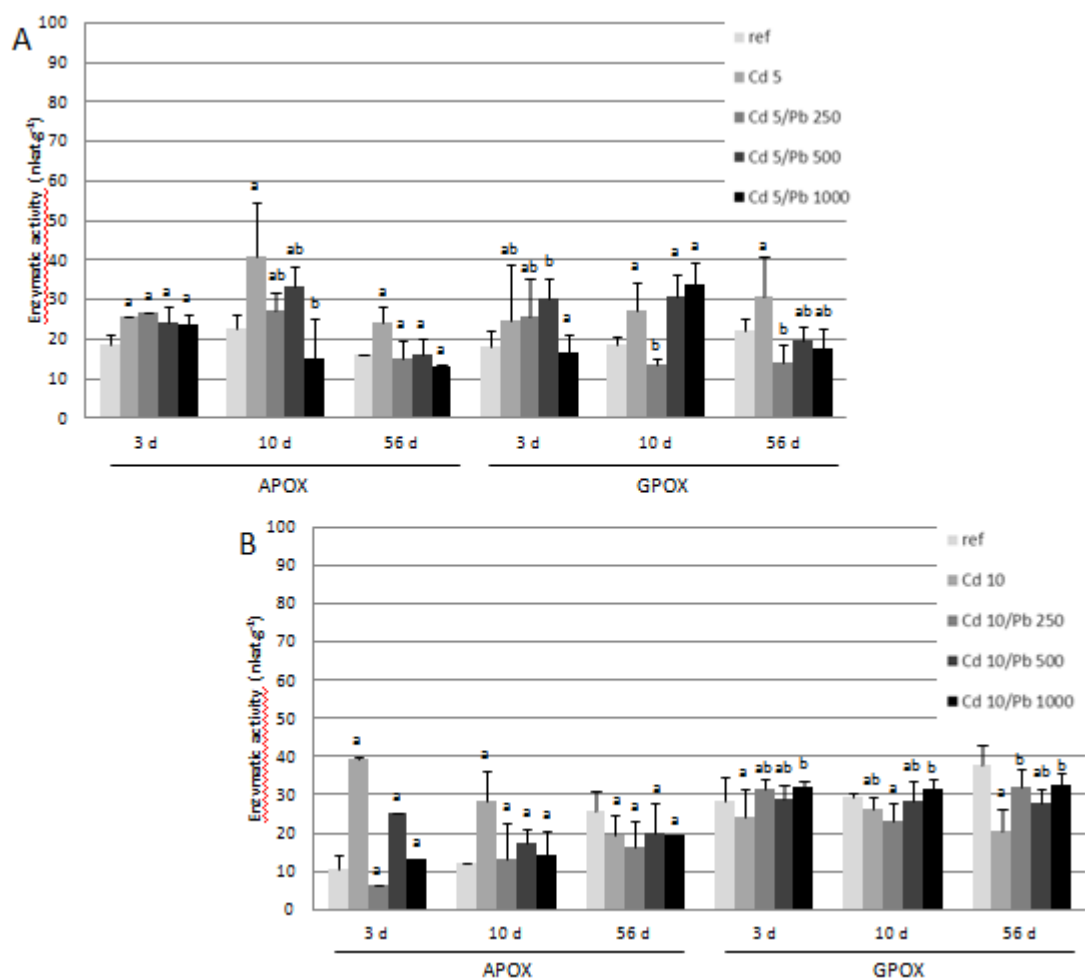
Figure 5



APOX and GPOX activities (nkat.g⁻¹) in shoots of *T. repens* (n=3) after 3, 10 and 56 days of exposure in the reference soil and in soils contaminated with Cd alone (Fig. 5A) and Pb alone (Fig. 5B).

Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ (comparison between soil reference and contamination with Cd or Pb).

Figure 6



APOX and GPOX activities (nkat.g⁻¹) in shoots of *T. repens* (n=3) after 3, 10 and 56 days of exposure in the reference soil and in soils contaminated with both Cd and Pb (Fig. 6A. 5 mg.kg⁻¹ Cd / Pb; Fig. 6B. 10 mg.kg⁻¹ / Pb).

Values with different letters are significantly different at p < 0.05 (comparison between contamination with Cd alone and contamination with the Cd/Pb mixture).

Les publications 3 et 4 ont montré les résultats obtenus chez *T. repens* en ce qui concerne l'analyse des niveaux d'expression génique de candidats impliqués dans le stress oxydatif ainsi que l'évaluation des dommages à l'ADN grâce au test des comètes. Les mêmes outils ont été utilisés chez *E. fetida* et font l'objet de la publication 5 (section II-4 de ce manuscrit).

II.4) Etude au niveau transcriptionnel de protéines impliquées dans le stress oxydatif et évaluation des dommages à l'ADN (test des comètes) chez *Eisenia fetida* exposé à du Cd et du Pb

Cette partie du travail est centrée sur l'analyse de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif ainsi que sur la détermination des dommages à l'ADN grâce au test des comètes. L'utilisation d'approches de biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'écotoxicologie permet une meilleure compréhension des modes d'action des contaminants chez les organismes vivants. En effet, les profils d'expression éclaircissent le(s) effet(s) des stress environnementaux sur le génome. L'analyse des variations des niveaux d'expression génique est donc un outil puissant pour (1) diagnostiquer l'existence d'un stress et (2) pour analyser d'un point de vue mécanistique la réponse à un stress. Le test des comètes, quant à lui, est potentiellement utile (1) comme test de sélection à haut débit pour les agents nocifs pour l'ADN, (2) dans les études de mécanisme pour distinguer les dommages génotoxiques et cytotoxiques causés aux chromosomes, (3) dans les études *in vivo* pour distinguer les carcinogènes génotoxiques et non génotoxiques (Tice *et al.*, 2000). Le test des comètes appliqué chez les vers de terre a déjà été utilisé dans des études antérieures pour explorer la génotoxicité de sols artificiels ou naturels contaminés par les dioxines (Verschaeve *et al.*, 1993), les ETMs (Manerikar *et al.*, 2008), les pesticides (Casabé *et al.*, 2007) ou les HAPs (Zhu *et al.*, 2006).

Publication 5 (Rédaction en anglais en cours)

Title: DNA damage and oxidative stress molecular analysis in *Eisenia fetida* exposed to Cd and Pb.

Authors: Lemièrre S.^{1,2}, Bernard F.^{1,2,3}, Brulle F.^{1,3}, Dumez S.^{1,3}, Platel A.^{1,4}, Nesslany F.^{1,4}, Cuny D.^{1,3}, Deram A.^{1,3,5} et Vandebulcke F.^{1,2}

¹ Université Lille Nord de France, F-59000 Lille, France

² Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement – Université de Lille 1, Ecologie Numérique et Ecotoxicologie, F-59650 Villeneuve d’Ascq, France

³ Laboratoire des Sciences Végétales et Fongiques – Université de Lille 2, EA4483, 59006 Lille Cedex, France

⁴ Laboratoire de Toxicologie – Institut Pasteur de Lille, EA 4483, 59800 Lille, France

⁵ Faculté de Management de la Santé (ILIS) - Université de Lille 2, EA4483, F-59120 Loos, France

* Corresponding author : Franck Vandebulcke

Université Lille Nord de France-Lille 1

Laboratoire de Génie Civil et géo-Environnement EA4515

F-59655 Villeneuve d’Ascq, France

tel : + 33 3 20 33 59 99

franck.vandebulcke@univ-lille1.fr

Abstract

L’objectif est d’identifier chez *Eisenia fetida* des indicateurs de stress répondant à une pollution métallique. Des mesures des niveaux d’expression de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif et le test des comètes ont été mis en œuvre chez des vers exposés en microcosme dans un sol de référence contaminé par du Cd et du Pb, seuls ou en mélanges pendant 3, 10 et 56 jours à des concentrations réalistes. Ces deux approches sont

associées afin d'essayer de comprendre s'il existe un lien entre stress oxydatif et dommages à l'ADN. Des dommages significatifs à l'ADN suite aux expositions au cadmium seul sont constatés après 3 et 10 jours d'exposition. Les résultats obtenus après 56 jours témoignent de la mise en place de mécanismes de réparation. Suite aux expositions au sol contaminé par la gamme de Pb, aucune différence significative avec le témoin n'est observée. Le Pb n'est donc pas reconnu comme génotoxique. Les dommages observés suite aux expositions *in vivo* aux différents mélanges Cd et Pb sont intermédiaires entre les cassures reportées chez les vers exposés aux contaminations monométalliques (plus élevée que dans le cas du Pb seul, et légèrement inférieure, parfois équivalente, aux résultats obtenus avec le Cd seul). En ce qui concerne les résultats des mesures d'expression génique, seul le gène *Cd-mt*, codant la Cd-MT, montre une induction de son niveau d'expression lors des expositions au Cd seul ou aux mélanges. Il semble donc utilisable comme biomarqueur d'exposition au Cd. Le travail n'a pas permis d'établir un lien entre stress oxydatif et dommages à l'ADN.

Keywords: *Eisenia fetida*, oxidative stress, comet assay, DNA damage, gene expression, metal accumulation, cadmium, lead.

1) Introduction

En écotoxicologie terrestre, un des groupes zoologiques les plus étudiés est celui des Annélides Oligochètes. Ces vers de terre peuvent représenter de 60 à 80% de la biomasse du sol et jouent un rôle clé dans la plupart des écosystèmes continentaux, notamment en entretenant la structure et la fertilité des sols. La pollution par les éléments traces métalliques (ETMs) et les composés chimiques, tels que les pesticides et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs), sont toxiques pour les organismes du sol, y compris les vers de terre (Labrot et al., 1996; Brown et al., 2004). En ingérant de grandes quantités de sol, les annélides

peuvent immédiatement accumuler des ETMs (Lanno et al., 2004) qui sont principalement concentrés dans le tissu chloragène situé autour du tube digestif (Stürzenbaum et al., 2001). Malgré cela, les annélides oligochètes ont montré une forte tolérance face à une pollution métallique (Morgan & Morgan, 1998) et ont été rapportés comme organismes bioindicateurs pour l'évaluation de la pollution métallique (Van Hook, 1974). Les vers de terre sont distribués partout dans le monde, leur cycle de vie est court, ils possèdent une large gamme de tolérance aux variations de température et d'humidité et ce sont des organismes robustes qui peuvent être immédiatement manipulés (Dominguez, 2004). Parmi ces annélides, *Eisenia fetida* est l'une des espèces les plus utilisées en écotoxicologie et est recommandée depuis 1984 par l'OCDE pour les tests de polluants (OCDE, 1984).

Les vers de terre exposés aux ETMs peuvent présenter des perturbations physiologiques telles que le retard de la maturation sexuelle (Spurgeon & Hopkin, 1996), une croissance ralentie (Spurgeon & Hopkin, 1999) et une modification d'activités enzymatiques (Łaszczyca et al., 2004), de la capacité phagocytaire (Brousseau et al., 1997; Sauvé & Fournier, 2005) et de l'expression des gènes (Brulle et al., 2006; 2007; Ricketts et al., 2004). Parmi les ETMs, le cadmium (Cd) et le plomb (Pb) font tous les deux partie des contaminants les plus toxiques pour les organismes vivants. Le Cd peut être trouvé dans l'air, l'eau et le sol. Il est relâché dans l'environnement par le trafic routier, les industries métallurgiques, l'exploitation minière et comme produit dérivé des engrais minéraux. Il peut induire un stress oxydatif par le biais de l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène tels les radicaux superoxydes ($O_2^{\cdot-}$), les radicaux hydroxyls ($OH\cdot$) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ainsi que des adduits à l'ADN (Bertin & Averbeck, 2006; Henkler et al., 2010). Le Pb est connu pour présenter un danger significatif chez l'Homme, les animaux et les plantes (Sharma & Dubey, 2005; Schell et al., 2010). C'est un ETM toxique émis dans l'environnement par de nombreuses activités

humaines telles que l'exploitation minière, l'agriculture et les activités industrielles (Sharma & Dubey, 2005).

Le travail présenté ici se centre sur l'analyse de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif ainsi que sur la détermination des dommages à l'ADN grâce au test des comètes. L'utilisation de méthodes de biologie cellulaire et moléculaire appliquée à l'écotoxicologie permet une meilleure compréhension des modes d'action des contaminants chez les organismes vivants. En effet, les profils d'expression éclaircissent le(s) effet(s) des stress environnementaux sur le génome. L'analyse des variations des niveaux d'expression génique est donc un outil puissant pour (1) diagnostiquer l'existence d'un stress et (2) pour analyser d'un point de vue mécanistique la réponse à un stress. Le test des comètes est potentiellement utile (1) comme test de sélection pour les agents nocifs pour l'ADN, (2) dans les études de mécanisme pour distinguer les dommages génotoxiques et cytotoxiques causés aux chromosomes, (3) dans les études *in vivo* pour distinguer les carcinogènes génotoxiques et non génotoxiques (Tice et al., 2000). C'est une méthode très répandue pour les études de surveillance environnementale grâce à sa sensibilité, son protocole relativement simple et son adaptabilité pour détecter les dommages à l'ADN dans une grande variété de cellules eucaryotes. Le test des comètes appliqué chez les vers de terre a déjà été utilisé dans des études antérieures pour explorer la génotoxicité de sols artificiels ou naturels contaminés par les dioxines (Verschaeve et al., 1993), les ETMs (Manerikar et al., 2008), les pesticides (Casabé et al., 2007) ou les HAPs (c).

L'objectif de l'étude est de déterminer des indicateurs de stress répondant à une pollution métallique composée de Cd et de Pb à des concentrations réalistes. Les niveaux d'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif ont été mesurés par PCR en temps réel. Le test des comètes, qui permet la mise en évidence de potentiels dommages causés à l'ADN par ces deux ETMs, est également utilisé. Ces deux méthodes sont associées

afin d'essayer de comprendre s'il existe un lien entre stress oxydatif et dommages à l'ADN. Ainsi, il est nécessaire de déterminer si les effets des contaminants sont précoces ou non et s'il y a mise en place de mécanismes de réparation de l'ADN. Pour cela, *E. fetida* a été exposé dans des microcosmes contenant un sol de référence contaminé par du Cd et du Pb, seuls ou en mélanges pendant 3, 10 et 56 jours.

2) Matériel & Méthodes

2.1) Modèle biologique

Les conditions optimales de croissance pour *Eisenia fetida* se situent entre 20 et 25°C, avec un taux d'humidité de 75 à 85% et un pH compris entre 6,5 et 8. Les vers étudiés sont issus de l'élevage et maintenus depuis plusieurs générations (plus de 10 ans) au laboratoire de l'Université de Lille 1. Ces vers épigés pèsent environ 500 mg à l'âge adulte et ont été caractérisés par la méthode d'Albani et al. (2003). Le substrat utilisé est un lombricompost d'origine biologique (marque TONUSOL™). Le pH est maintenu à une valeur optimale de 6,5 par ajout de CaCO₃, le degré d'humidité est d'environ 70% par rapport à la capacité de rétention maximale du substrat. L'élevage est maintenu à une température de 20°C ± 2°C, à l'abri du bruit, sous un éclairage nycthéméral 12h jour / 12h nuit. La nourriture des vers est apportée une fois par mois par le dépôt en surface de 1 L de bouse de vache non contaminée par les métaux, préalablement congelée.

2.2) Dispositif expérimental

Le sol de référence utilisé lors des expositions est un sol agricole provenant d'une friche urbaine (ville de Loos, Nord, France) et a été utilisé lors d'études antérieures (Manier et al., 2009; 2012). Les propriétés physico-chimiques et pédologiques du sol sont représentatives du fond pédo-géochimique de la plupart des sols du Nord/Pas-de-Calais. Au cours de cette étude,

le sol a été artificiellement contaminé par des sels de chlorure de cadmium (CdCl_2) et d'acétate de plomb ($[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2, 3\text{H}_2\text{O}]$), seuls ou en mélange. Au total, 5 sols contaminés par des sels de Cd (0, 2,5, 5, 10 et 20 mg.kg^{-1} de Cd), 5 sols contaminés par des sels de Pb (0, 250, 500, 1000 et 2000 mg.kg^{-1} de Pb) et 8 sols contaminés par des mélanges de sels de Cd et de Pb (Cd0/Pb0, Cd5/Pb250, Cd5/Pb500, Cd5/Pb1000 et Cd0/Pb0, Cd10/Pb250, Cd10/Pb500, Cd10/Pb1000) ont été utilisés. Un sol OCDE a également été utilisé comme témoin artificiel.

Le dispositif expérimental est constitué de pots (d:12 x h:9 cm) dans lesquels les vers sont exposés aux sols contaminés pendant 3, 10 et 56 jours. Pour chaque condition et chaque temps d'exposition, 15 vers ont été collectés pour l'analyse des niveaux d'expression génique, 3 groupes de 4 vers pour les mesures d'accumulation des métaux et 4 vers pour l'évaluation des dommages à l'ADN grâce au test des comètes.

2.3) Accumulation des métaux

Les contenus en Cd, Pb, zinc (Zn), cuivre (Cu), fer (Fe) manganèse (Mn) et calcium (Ca) ont été quantifiés sur des triplicats de 4 vers pour chaque condition et chaque temps d'exposition grâce à la spectroscopie d'émission atomique (ICP-AES) (Varian Liberty Series II axial view, Varian S.A., Les Ulis, France) (adapté de Demuynck et al., 2007). La calibration a été effectuée avec des standards pour chaque métal (Cd: 0,01; 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5 mg.L^{-1} ; Pb: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,5; 0,5 mg.L^{-1} ; Zn: 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2; 2 mg.L^{-1}) préparés dans de l'acide nitrique à 500 mmol.L^{-1} (65% Suprapur, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) avec une solution stock commerciale standard de Titrisol (VWR) à 1 g.L^{-1} de Cd, Pb et Zn. Les contenus en Cd, Pb et Zn dans les animaux entiers ont été déterminés après une digestion acide. Brièvement, les vers ont été lyophilisés puis digérés pendant 12 h à température ambiante avec 1 mL d'acide nitrique à 65% pour 100 mg de masse sèche. La digestion a été

réalisée par chauffage progressif à 120°C jusqu'à évaporation de la moitié du volume total et après retrait des vapeurs nitriques. Après refroidissement, 1 mL de solution analytique composée d'acides nitrique, sulfurique et perchlorique (10, 2, 3 V respectivement) a été ajouté aux échantillons et un chauffage à 180°C a été poursuivi pour réduire le volume. Les échantillons ont ensuite été filtrés et le volume a été ajusté à 20 mL avec de l'eau ultrapure (Milli-Q water, Millipore, Molsheim, France).

2.4) Test des comètes

Afin de procéder au test des comètes, les vers sont d'abord collectés dans chaque microcosme puis rincés dans la solution physiologique Earthworm Ringer. Les suspensions cellulaires sont alors immédiatement prélevées: les vers sont immergés dans 1,2 mL de solution d'extrusion glacée (Ice-cold anticoagulant Ringer solution : earthworm Ringer solution supplémentée par 20 mM d'EDTA et 30 mM de citrate, (pH 7,4)), à laquelle 1% de DMSO (Diméthylsulfoxyde) a été ajouté extemporanément, et stimulés électriquement pendant 1 minute (courant alternatif, 9V). Les suspensions sont ensuite conservés à -80°C jusqu'à réalisation des essais comètes, après congélation progressive (1h à 4°C, 4h à -20°C puis -80°C) et addition de 10% de DMSO comme cryoprotecteur.

En début d'essai, la décongélation des suspensions est rapide; 500 µL sont prélevés et centrifugés (750 rpm, 10 min à 4°C) afin d'obtenir une suspension cellulaire utilisable, après reprise du culot dans du Ringer froid et ajustement à la concentration de $5,25 \cdot 10^5$ cellules/mL. Le bleu trypan (solution de travail à 0,1% préparée à partir d'une solution stock à 0,4%, mélange 1:3 (v:v) avec la suspension cellulaire), colorant d'exclusion, est utilisé pour évaluer la viabilité des cellules *via* un comptage en cellule de Malassez en microscopie optique.

Le test des comètes a été réalisé à l'aveugle, avec codage aléatoire, de manière individuelle avec trois réplicats par échantillon. 10 échantillons sont traités par essai. Un standard interne

a été utilisé: il a consisté en une suspension du type cellulaire considéré, exposée au peroxyde d'hydrogène (250 μ M, 1h à 4°C), aliquotée et analysée dans chaque test. Le protocole se déroule en chambre noire, sous lumière inactinique pour éviter d'induire des dommages artefactuels à l'ADN.

Les solutions d'agarose LMP (low melting point) sont maintenues à 37°C à l'aide d'un bain-marie. Les gels sont déposés sur les lames dans l'ordre suivant: la 1^{ère} couche constituée de 90 μ L d'agarose normal (0,8% dans du PBS (0,01 M)) est étalée la veille du test à l'aide d'un cône de micropipette (polymérisation à température ambiante), la 2^è couche constituée de 75 μ L d'un mélange à volume égal, d'une suspension cellulaire (obtenue selon le protocole décrit précédemment) et d'agarose LMP (bas point de fusion) à 1 % dans du PBS (0.01 M) est déposée et recouverte d'une lamelle (polymérisation à 4°C pendant 10 minutes, la lamelle est retirée délicatement) et la 3^è couche composée de 75 μ L d'un gel d'agarose LMP 0.5 % est déposée, recouverte d'une lamelle et laissée à polymériser pendant 10 minutes à 4°C (la lamelle est retirée délicatement).

Ensuite, les lames sont plongées pendant 2 h dans une solution de lyse (2,5 M de NaCl, 0,1 M de Na₂EDTA, 0,1 M de Tris (pH ajusté à 10 avec NaOH), 1% de *N*-laurylsarcosinate, auxquels sont ajoutés extemporanément 1% de Triton X100 et 10% de DMSO), maintenue à 4°C, qui permet la destruction de la matrice extracellulaire et de la membrane nucléaire. Puis, les lames sont rincées dans le tampon d'électrophorèse suite à l'étape de lyse et déposées dans la cuve électrophorétique. Le déroulement de l'ADN a lieu dans le tampon d'électrophorèse (0,3 M NaOH – 0,01 M Na₂EDTA, pH>13) durant 25 minutes, 300 mA, 20V (soit 1V/cm). Le pH élevé du tampon permet la visualisation des coupures simple-brin et l'expression des sites alcali-labiles, des conditions neutres ne permettant que la détection des lésions double-brin.

Après l'électrophorèse, les lames sont plongées dans une solution de Tris (0,4 M ; pH 7,5) pendant 10 minutes. L'opération est renouvelée une fois. Cette étape de neutralisation est importante pour la lecture des lames car elle permet de rétablir des appariements ponctuels des brins d'ADN et d'éliminer les alcalins ainsi que les détergents susceptibles d'interférer avec la fixation au bromure d'éthidium, l'agent intercalant utilisé. La déshydratation des lames se fait pendant 10 minutes dans un bain d'éthanol absolu. Les lames sont ensuite conservées à l'abri de la lumière et de la poussière jusqu'à l'étape de lecture. Lors de celle-ci, les noyaux sont colorés par 22 µL d'une solution à 20 µg/mL de bromure d'éthidium puis une lamelle est déposée sur la lame qui est lue à l'aide d'un microscope à épifluorescence, équipé d'un filtre dichroïque DM570 (filtre d'excitation: BP 510-550 nm; filtre barrière: BA 590 nm), relié par une caméra digitale EMCCD à l'analyseur d'image Komet 6.0 (Andor Technology, Belfast, Ireland). 3 répliquats par individu et de 25 à 50 cellules sur chaque lame sont analysées. Les lames codées ont été lues aléatoirement sur la partie centrale du gel.

Parmi les paramètres proposés par l'analyseur d'image, le pourcentage d'ADN dans la queue est le paramètre qui a été choisi pour exprimer le degré des dommages à l'ADN. Il est classiquement utilisé avec des invertébrés et présente l'avantage de présenter une faible variabilité inter-électrophorèse, permettant ainsi les comparaisons intra-expériences et intra-spécifiques (Lemière, 2004). Les médianes, quartiles, maxima, minima et les percentiles sont déterminés sur les distributions de ce paramètre au sein des différentes populations cellulaires analysées et sont utilisés pour les analyses statistiques ainsi que pour les représentations graphiques.

2.5) Expression génique

Les analyses des niveaux d'expression génique ont été réalisées sur l'ARN total extrait de cœlomocytes de groupes de 15 vers par condition et par temps d'exposition en utilisant le Tri-

Reagent[®] (Molecular Research Center, Inc. Cincinnati, U.S.A.) selon les instructions du fournisseur. La pureté et l'intégrité des ARNs ont été réalisées selon des procédures déjà publiées (Brulle et al., 2006; **publication 2**). La transcription inverse a été effectuée grâce au Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, Illkirch, France) selon les instructions du fournisseur. 1,5 µg d'ARN de chaque échantillon sont utilisés pour obtenir les cDNAs qui sont dilués au 1/50^{ème} pour la PCR en temps réel.

2.5.1) PCR en temps réel

Les niveaux d'expression des principaux gènes impliqués dans le stress oxydatif chez *E. fetida* sont étudiés. Ainsi, six gènes clonés et séquencés par Brulle et al., 2006 sont disponibles dans GenBank[™]: ils codent des protéines cytosoliques (une cadmium-métallothionéine (*Cd-mt*, DQ286714), une phytochélatine synthase (*pcs*, EF433776), une catalase (*cat*, DQ286713), une superoxyde dismutase Cu/Zn (*CuZnsod*, DQ286712), une glutathion peroxydase (*gpx*, EH672188) et une glutathion transférase pi (*gstp*, HQ693699)). Ils ont été quantifiés par PCR en temps réel. Les réactions de RT-PCR ont été effectuées avec un thermocycleur de type LightCycler[®] 480 (Roche Molecular Biochemicals, Germany) selon des procédures précédemment décrites (Bernard et al., soumis). Les amorces utilisées pour les différents candidats sont présentées dans le tableau 1. Pour chaque réaction, le crossing point (CP) a été déterminé en utilisant le logiciel du LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics). Les réactions de PCR ont été réalisées en duplicats techniques et la valeur moyenne des CPs a été calculée.

Tableau 1: Séquences des amorces utilisées chez *Eisenia fetida* lors de la PCR en temps réel

Gene	Amplicon size (pb)	Efficiency	Forward	Reverse	Accession number
<i>contig2471</i>	376	1.99	<u>ACTACATTGTTTCAGCCG</u>	<u>GGCCATTTGGCAACTC</u>	GenBank: KF682228
<i>contig1517</i>	403	1.97	<u>TAACAGGTCTAGCTGGTTG</u>	<u>CCGCGTTAGAGATCACT</u>	GenBank: KF682227
<i>β act</i>	148	2.00	<u>GTACGATGAGTCCGGG</u>	<u>GCATGTGTGTGGTGTC</u>	GenBank: DQ286722
<i>cat</i>	266	2.00	<u>CGGAGAAGCTGTGTACT</u>	<u>GTCCCACTGGAATCAGAG</u>	GenBank: DQ286713
<i>gpx</i>	285	1.99	<u>GAGGTACAACGGAGTTGG</u>	<u>TGAGACGTTTGTCTGTT</u>	GenBank: EH672188
<i>gstp</i>	462	1.99	<u>GGATAAATATGTTGGCGAGC</u>	<u>GTCACGTGTTCATGGTTG</u>	GenBank: HQ693699
<i>Cd-mt</i>	421	1.99	<u>GATGCGAAGAAACGTGT</u>	<u>GTTACGCAGTATCCTTCAGA</u>	GenBank: DQ286714
<i>pcs</i>	223	1.91	<u>TCATGGTCCTGAACACG</u>	<u>CACAAGCTGCCGAAACTC</u>	GenBank: EF433776
<i>Cu/Zn-sod</i>	198	2.00	<u>GGCGATAACACAAATGGT</u>	<u>CGTGCGTCCAATGATTGAA</u>	GenBank: DQ286712

Abbreviations: *contig2471* = phosphodiesterase 4B, *contig1517* = predicted protein, *β -act* = Beta actin, *cat* = Catalase, *gpx* = Glutathione peroxidase, *gstp* = Pi glutathione transferase, *Cd-mt* = Cadmium metallothionein, *pcs* = Phytochelatin synthase, *Cu/Zn-sod* = Copper/Zinc superoxide dismutase.

2.5.2) Quantification relative des niveaux d'expression

Les niveaux d'expression et les efficacités (E) des amplifications de chaque gène de référence (Rg) et des gènes cibles (Tg) ont été déterminés selon des procédures décrites précédemment (Brulle et al., 2006; soumis). Brièvement, pour chaque échantillon, les niveaux d'expressions des gènes cibles sont comparés à celui des gènes de référence, qui sont exprimés de manière constitutive dans nos conditions expérimentales. Ainsi, l'actine bêta (*β -act*, DQ286722), le *contig1517* (*contig1517*, KF682227) et le *contig2471* (*contig2471*, KF682228) sont utilisés comme gènes de référence (Bernard et al., soumis). Le niveau d'expression est calculé selon la formule $R = (E_{Tg})^{CPTg} / (\text{moyenne géométrique } ((E_{\beta-act})^{CP\beta-act}; (E_{contig1517})^{CPcontig1517}; (E_{contig2471})^{CPcontig2471}))$ et permet le calcul de l'expression absolue des gènes cibles.

La quantification relative peut être aussi calculée. Pour un gène donné, cela correspond au ratio entre l'expression absolue chez les individus exposés et celle mesurée chez les individus témoins. Dans ce cas, l'expression absolue peut être définie comme la concentration (C) du

gène: $C = E^{C_{Pcont. \text{ moyen}} - C_{Péch. \text{ moyen}}}$. L'expression relative (RFE, Relative Fold Expression) est calculée selon la formule $RFE = C_{Tg} / (\text{moyenne géométrique } (C_{\beta-act}; C_{contig1517}; C_{contig2471}))$.

2.6) Analyses statistiques

Pour l'analyse des résultats portant sur les mesures d'accumulation des métaux et sur le test des comètes, des tests de Kruskal-Wallis suivis de tests de comparaisons multiples par paires de Dunn ont été privilégiés. Les calculs statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel XLSTAT Version 2010.5.02 (Addinsoft, France, Paris, 2010) pour les statistiques descriptives de l'ensemble des paramètres et pour les dommages à l'ADN. Le seuil de rejet des hypothèses des tests statistiques est fixé à 5% pour l'ensemble des tests réalisés, sauf pour les tests post-hoc où des seuils de significations corrigés sont utilisés.

En ce qui concerne les résultats portant sur les mesures d'expressions, des analyses de variances suivies d'un test post-hoc de Tukey ont été réalisées sous le logiciel Statistica (version 5.1, StatSoft Inc., Tulsa, Oklahoma, US). La normalité de chaque distribution a été vérifiée par le test de Kolmogorov-Smirnov et l'homogénéité des variances par le test de Levene. Le seuil de rejet des hypothèses des tests statistiques est fixé à 5% pour l'ensemble des tests réalisés.

3) Résultats

3.1) Accumulation des métaux

Le tableau 2 présente les concentrations moyennes mesurées dans les vers témoins d'élevage pour les différents éléments analysés. Trois séries ont été analysées avec des vers prélevés dans l'élevage du laboratoire respectivement au premier semestre 2011, au second semestre de cette même année et au premier semestre de l'année 2012. Ces concentrations sont très faibles voire nulles (inférieures à la limite de quantification) pour les métaux non

essentiels (Pb) et proches des valeurs habituellement observées pour les métaux essentiels (Cu, Fe, Zn, ...).

Les variabilités inter-individuelles, pour ces témoins, diffèrent pour chaque élément: elles sont faibles pour Zn, plus élevées pour Cu, Fe et Mn, et atteignent les valeurs les plus élevées pour le Cd et le Ca.

Tableau 2: concentrations internes dans les témoins d'élevage (en mg/kg de masse sèche dans les tissus d'*Eisenia fetida*, concentration moyenne \pm écart-type) des 7 éléments mesurés simultanément par ICP-AES.

Ca	Cd	Cu	Fe	Mn	Pb	Zn
4042.84 \pm 1824.80	1.53 \pm 0.70	10.18 \pm 2.48	383.51 \pm 84.73	4.42 \pm 0.97	< 1	119.42 \pm 12.97

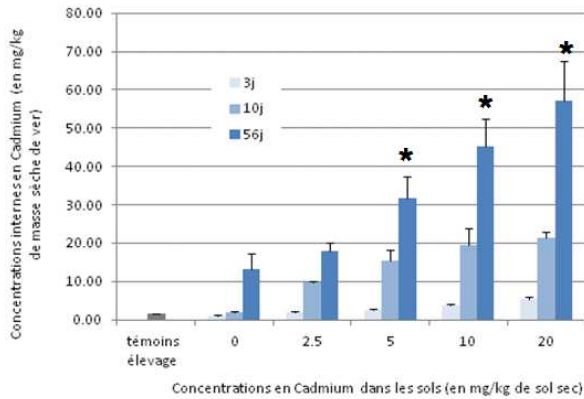
3.1.1) Sols contaminés par le Cd

Concernant les concentrations mesurées dans les vers exposés au sol de référence contaminé par le Cd, les concentrations internes en Cd et en Zn sont présentées sur la figure 1, parties a et b respectivement. Les résultats pour le Pb ne sont pas présentés car seulement un lot de ver analysé dépassait la limite de quantification pour ce métal (1 mg/kg masse sèche): ce lot correspondait à des vers exposés 56 jours à la concentration de 5 mg de Cd par kg de sol sec et la concentration interne estimée était faible et d'environ 10 mg de Pb par kg de masse sèche de ver.

Pour le Cd, les concentrations internes sont comprises entre 1 et 60 mg/kg (masse sèche). On observe une augmentation de ces concentrations avec la durée d'exposition. Les valeurs les plus élevées sont observées pour 56 jours d'exposition. Les concentrations dans les vers augmentent également avec les concentrations dans les sols. Après 56 jours d'exposition, des différences significatives existent comparativement au témoin (sol de référence) dès la concentration de 5 mg.kg⁻¹ de Cd dans le sol. Les valeurs absolues mesurées sont importantes

et sont probablement dues à l'exposition longue durée mais cela ne signifie pas que les concentrations ont particulièrement augmenté.

(a)



(b)

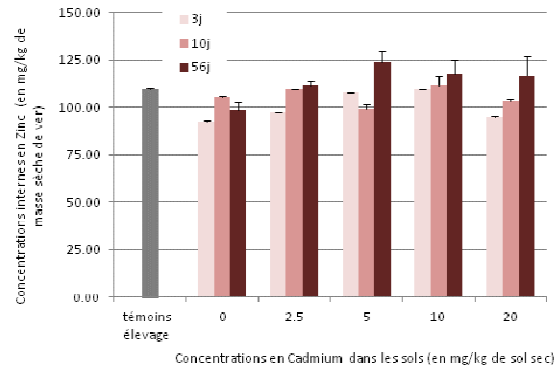


Figure 1: concentrations internes en Cd (a) et en Zn (b) (mg/kg) de masse sèche *d'Eisenia fetida* dans les vers exposés pendant 3, 10 et 56 jours au sol de référence artificiellement contaminé par le Cd (moyennes \pm écarts-types de la moyenne, n=4 lots de vers).

Nous avons calculé les facteurs de bioaccumulation (BAF) dans les tissus de ver (sans correction: dans ce calcul, nous n'avons pas tenu compte du fond pédogéochimique naturel du sol de référence; Tableau 3). Pour le Cd, les plus importants sont observés à 56 jours pour les 2 concentrations de Cd dans le sol les plus faibles (2,5 et 5 mg/kg sol sec). Le BAF augmente avec le temps d'exposition et diminue en fonction de l'augmentation de la concentration en Cd dans le sol (Tableau 3). Le BAF des vers exposés pendant 3 j est inférieur à 1. A partir de 10 jours d'exposition, le BAF est supérieur à 1.

Tableau 3: facteurs de bioaccumulation (BAF) du Cd par *Eisenia fetida* pour les vers exposés pendant 3, 10 et 56 jours au sol de référence artificiellement contaminé par le Cd

	Durée d'exposition (en jours)			
		3	10	56
	2.5	0.76	3.87	7.16
Concentrations en cadmium dans le sol	5	0.52	3.11	6.35
(en mg/kg de sol sec)	10	0.37	1.93	4.54
	20	0.27	1.08	2.86

Concernant le Zn, les valeurs mesurées sont comprises entre 90 et 125 mg/kg, mais aucune différence significative n'a pu être observée. Les concentrations internes dans les vers ne varient ni avec la durée d'exposition, ni avec les concentrations de cadmium dans le sol. Cela semble indiquer que ce métal est régulé par les vers et que cette régulation n'est pas perturbée par la présence de Cd dans le sol. Ceci est en accord avec des observations antérieures (Demuyne et al., 2007; Bernard et al., 2010). On peut cependant noter que les concentrations les plus élevées sont observées pour les vers exposés le plus longtemps, tout en restant proche des valeurs observées pour les témoins d'élevage.

3.1.2) Sols contaminés par le Pb

Concernant les concentrations mesurées dans les vers exposés au sol de référence contaminé par le Pb, les concentrations internes en Cd, en Zn et en Pb sont présentées sur la figure 2 parties a, b et c respectivement.

Pour le Cd, les concentrations internes sont faibles et comprises entre 1,4 et 5,2 mg/kg (masse sèche). Cela reste proche des valeurs mesurées dans les vers exposés aux différents sols témoins. Une légère augmentation des concentrations internes est observée avec la durée d'exposition, quelle que soit la concentration de Pb dans le sol, mais celle-ci n'est jamais significative (tests de Kruskal-Wallis; $p > 0.05$). Aucune différence n'est également observée,

à chaque temps d'exposition entre les vers exposés aux différentes concentrations de Pb dans le sol.

Pour le Zn, les observations sont similaires à celles des vers exposés au sol contaminé par la gamme de Cd. Les concentrations internes dans les vers ne varient ni avec la durée d'exposition, ni avec les concentrations de Pb dans le sol.

Les observations notées pour Cd et Zn sont cohérentes puisque seul du Pb a été ajouté dans ce sol.

Pour le Pb, la limite de quantification est inférieure à 1 pour la plupart des conditions d'exposition. Il n'a pu être quantifié que pour la durée d'exposition la plus longue (56 jours) dès 250 mg/kg dans le sol et pour les concentrations les plus fortes (1000 et 2000 mg/kg) après 10 jours et 3 jours respectivement. Les concentrations mesurées sont comprises entre 10 et 120 mg/kg de plomb dans les tissus d'*Eisenia fetida*. Il semble que l'augmentation des concentrations internes dans les vers soit concentration-dépendante mais également temps-dépendante.

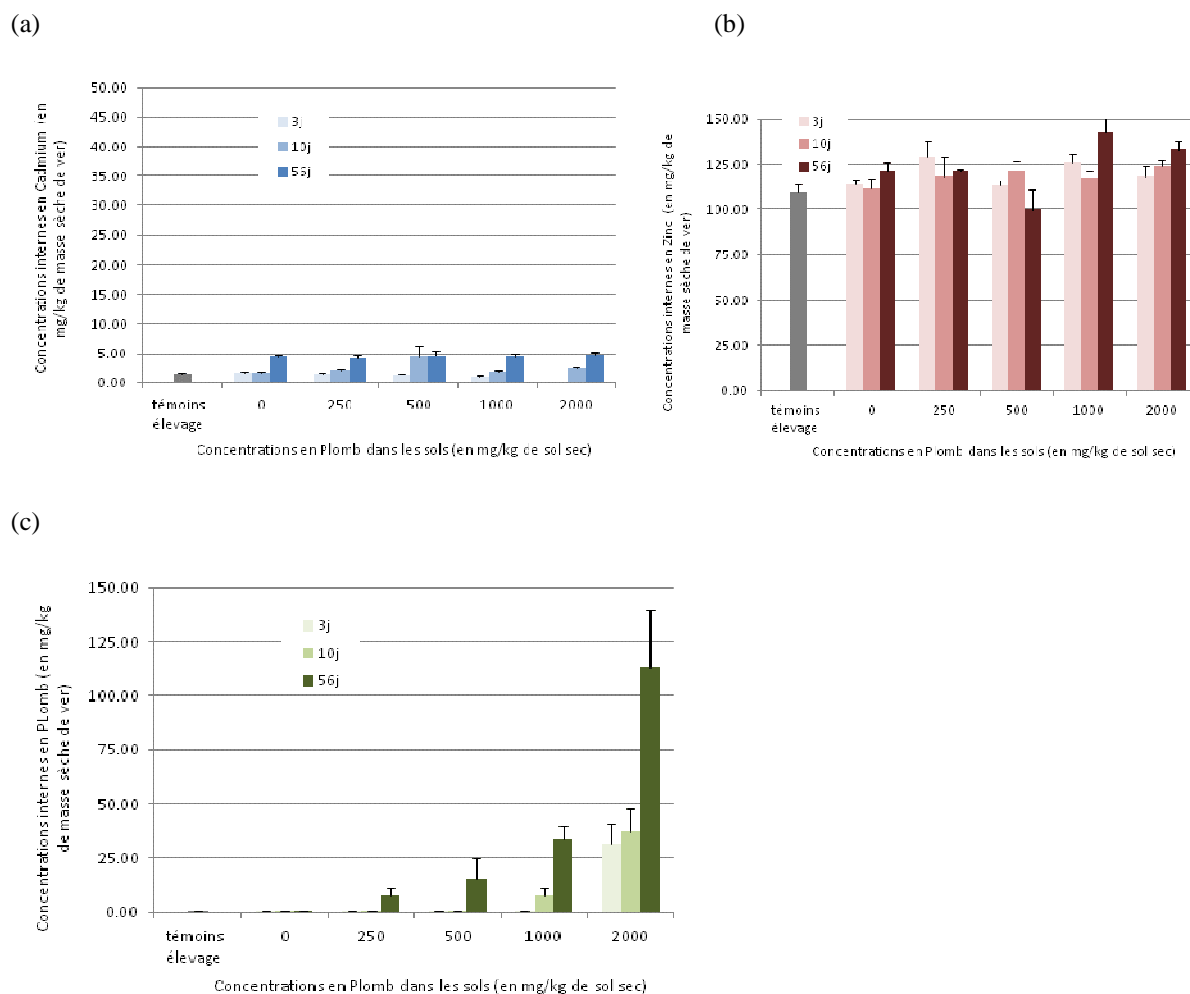


Figure 2: concentrations internes en Cd (a), Zn (b) et Pb (c) (exprimées en mg/kg de masse sèche d'*Eisenia fetida*) dans les vers exposés pendant 3, 10 et 56 jours au sol de référence artificiellement contaminé par le Pb (moyennes \pm écart-types de la moyenne, n=4 lots de vers)

3.1.3) Sols contaminés par les mélanges de Cd et de Pb

Concernant les concentrations mesurées dans les vers exposés au sol de référence contaminé par les mélanges de Cd et de Pb, les concentrations internes en Cd, en Zn et en Pb sont présentées sur les figures 3, 4 et 5 respectivement. Dans cette expérimentation, une modalité supplémentaire a été ajoutée, en exposant des vers pour les 3 durées d'exposition au sol artificiel OCDE non contaminé.

Pour le Cd, concernant les mélanges réalisés avec 5 mg/kg de Cd dans le sol (Figure 3 première moitié), les résultats d'accumulation du Cd sont identiques à ceux obtenus avec ce

métal seul dans le sol, c'est-à-dire une augmentation temps-dépendante. Le Pb ne semble pas influencer les concentrations internes en Cd quand il est en association avec ce métal, et ce quelle que soit la concentration de Pb ajoutée dans le sol.

Concernant les mélanges réalisés avec 10 mg/kg de Cd dans le sol (Figure 3 partie droite), les résultats ne sont plus identiques à ceux obtenus avec ce métal seul à la même concentration (Cd 10, Figure 1a). On observe toujours une augmentation temps-dépendante mais pas dépendante de la concentration de Pb dans le sol. A la concentration de 10 mg/kg de Cd dans les sols, le Pb semble diminuer l'accumulation du Cd par les vers.

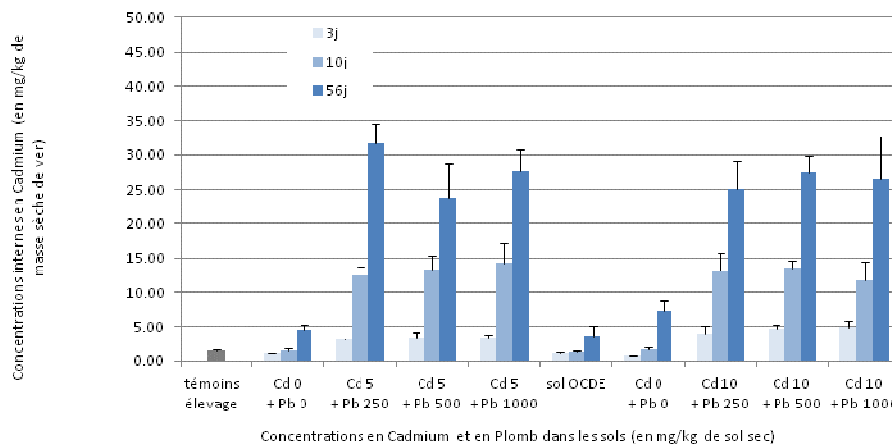


Figure 3: concentrations internes en Cd (mg/kg de masse sèche d'*Eisenia fetida*) dans les vers exposés pendant 3, 10 et 56 jours au sol de référence artificiellement contaminé par les mélanges de Cd et de Pb: première moitié: mélanges avec 5 mg/kg de Cd et partie droite du graphique avec 10 mg/kg de Cd dans les sols (moyennes \pm écart-types de la moyenne, n=4 lots de vers)

Les BAF pour le Cd montrent une tendance similaire à celle observées pour les contaminations mono-métalliques. Quand le Cd est présent dans le sol à la plus faible concentration (5 mg/kg), la présence de Pb en association ne semble pas modifier la bioaccumulation du Cd par les vers, sauf peut-être avec les deux concentrations de Pb les plus fortes: 500 et 1000 mg/kg de sol sec après 56 jours d'exposition pour lesquels les facteurs de bioaccumulation sont diminués (4.77 et 5.53 mg/kg Cd respectivement contre 6.35 mg/kg Cd lors des contaminations mono-métalliques).

Quand le Cd à une concentration de 10 mg/kg (sol sec), est présent en association avec du Pb, l'accumulation du Cd est plus faible comparativement aux résultats obtenus en condition monométallique d'exposition et ce après 10 jours d'exposition (1.33, 1.35 et 1.18 mg/kg Cd contre 1.93 mg/ kg Cd lors des contaminations mono-métalliques) mais également après 56 jours (2.52, 2.76 et 2.76 mg/kg Cd contre 4.54 mg/ kg Cd lors des contaminations mono-métalliques).

Tableau 4: facteurs de bioaccumulation du Cd par *Eisenia fetida* pour les vers exposés pendant 3, 10 et 56 jours au sol de référence artificiellement contaminé par les mélanges de Cd et de Pb (dans les lignes grisées sont rappelées les valeurs obtenues avec le Cd seul ; ces valeurs ne sont pas corrigées par le fond pédogéochimique naturel du sol de référence)

Concentration de cadmium dans le sol (mg/kg de sol sec)	Concentration de plomb dans le sol (mg/kg de sol sec)	Durée d'exposition (en jours)		
		3	10	56
5	0	0.52	3.11	6.35
5	250	0.63	2.51	6.34
5	500	0.71	2.66	4.77
5	1000	0.71	2.86	5.53
10	0	0.37	1.93	4.54
10	250	0.41	1.33	2.52
10	500	0.48	1.35	2.76
10	1000	0.50	1.18	2.66

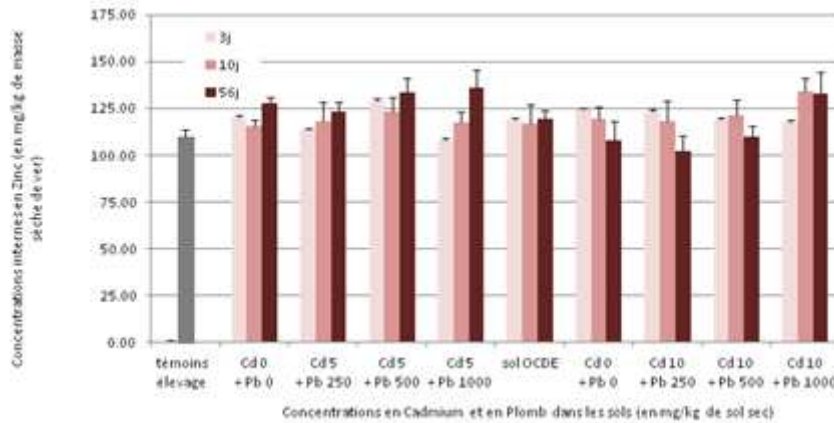


Figure 4: concentrations internes en Zn (mg/kg de masse sèche d'*Eisenia fetida*) dans les vers exposés pendant 3, 10 et 56 jours au sol de référence artificiellement contaminé par les mélanges de Cd et de Pb: première moitié: mélanges avec 5 mg/kg de Cd et partie droite du graphique avec 10 mg/kg de Cd dans les sols (moyennes \pm écart-types de la moyenne, n=4 lots de vers)

Concernant le Zn, les observations sont similaires aux précédentes (Figure 4). Les concentrations internes dans les vers ne varient ni avec le durée d'exposition, ni avec les concentrations de Pb et de Cd dans le sol. Ce métal apparaît comme régulé par les vers de terre, et cette régulation est maintenue, sans être perturbée sur toute la durée de l'exposition quelle que soit la concentration en Cd et en Pb dans le sol. Aucune différence significative n'est jamais observée.

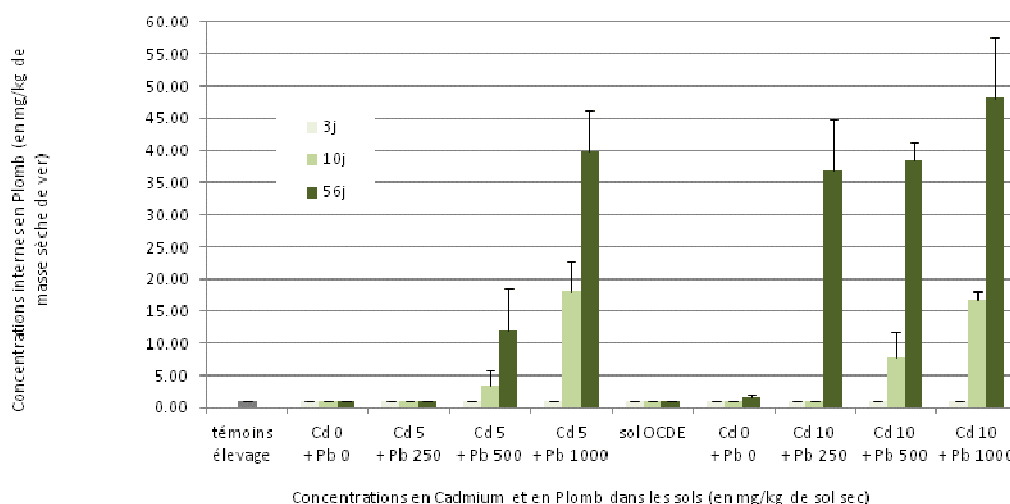


Figure 5: concentrations internes en Pb (mg/kg de masse sèche *Eisenia fetida*) dans les vers exposés pendant 3, 10 et 56 jours au sol de référence artificiellement contaminé par les mélanges de Cd et de Pb: première moitié: mélanges avec 5 mg/kg de Cd et partie droite du graphique avec 10 mg/kg de Cd dans les sols (moyennes \pm écart-types de la moyenne, n=4 lots de vers)

Le Pb n'a pu être quantifié que pour les durées d'exposition les plus longues (10 et 56 jours dès 500 mg/kg dans le sol) quand les mélanges contiennent 5 mg/kg de Cd dans le sol (première moitié de la figure 5). Concernant les vers exposés aux mélanges avec 10 mg/kg de Cd dans le sol, le Pb est quantifiable pour tous les mélanges seulement après 56 jours (Figure 5 seconde moitié). Après 10 jours, seuls les vers exposés aux mélanges avec le plus de Pb (500 et 1000 mg/kg) accumulent du Pb dans leurs tissus. Il semble que l'accumulation du Pb par les vers soit différente, quand ce métal est en association dans le sol avec 5 mg/kg ou 10 mg/kg de Cd. Globalement, les concentrations internes en Pb sont moins élevées pour les mélanges avec 5 mg/kg de Cd dans le sol (Figure 5 première moitié).

3.2) Test des comètes

Le paramètre suivi permettant d'évaluer la fragmentation de l'ADN est le pourcentage d'ADN médian dans la queue des comètes. Celui-ci est déterminé pour chaque individu pour 75 cellules (3 lames, soit 3 réplicats analytiques) et de 4 (pour la plupart des conditions) à 9 individus (notamment pour le témoin d'élevage) par conditions ont été exposés. La figure 6 présente les moyennes des pourcentages médians d'ADN dans la queue (\pm SEM) observés chez *E. fetida* exposé aux sols contaminés par le Cd pendant 3, 10 et 56 jours en fonction de la concentration de cadmium dans le sol (Figure 6a) et en fonction de la durée d'exposition (Figure 6b).

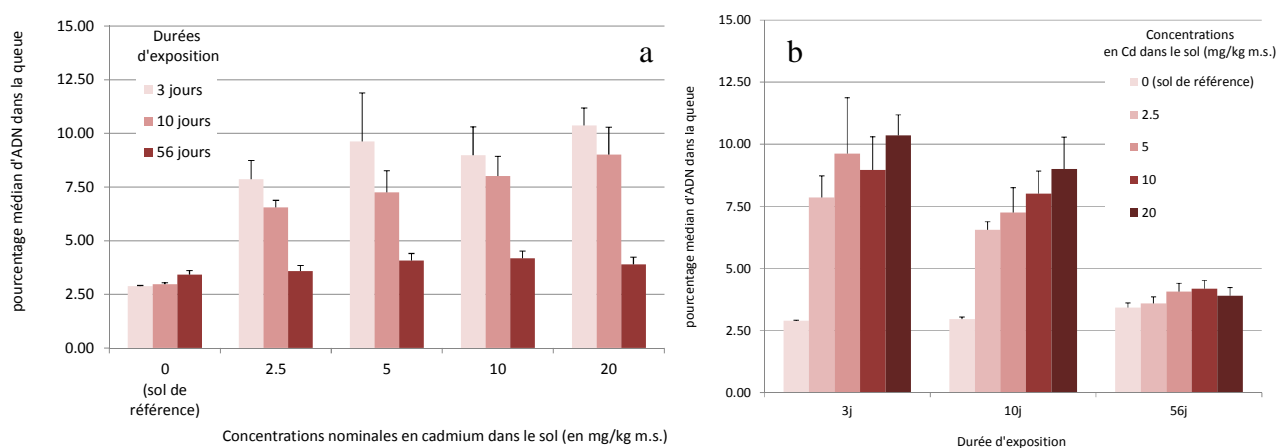


Figure 6: Dommages à l'ADN moyens chez *E. fetida* observés après expositions de 3, 10 et 56 jours au sol de référence contaminé artificiellement au cadmium (moyennes des pourcentages d'ADN médians dans la queue des comètes \pm SEM ; a: présentation en fonction de la contamination du sol, b: présentation en fonction de la durée d'exposition)

Globalement, une augmentation des dommages à l'ADN est observée suite aux expositions au Cd dans les sols, comparativement aux témoins (sols de référence et témoins élevage) pour les deux premiers temps d'expositions (3 et 10 jours). Les dommages à l'ADN sont ainsi significatifs dès 2,5 mg/kg de Cd dans le sol après 3 jours d'exposition. Les niveaux mesurés sont globalement les mêmes entre les deux premiers temps d'exposition (pas de différence significative). Cela semble indiquer l'installation d'un équilibre entre la génération des dommages et leurs mécanismes de réparation. Cet équilibre apparaît parfois en faveur de la

réparation, même si les différences observées pour une même concentration de Cd dans le sol entre 3 et 10 jours d'exposition ne sont pas significatives.

Les niveaux les plus élevés de dommages sont observés pour l'exposition de 3 jours au sol contaminé avec 20 mg/kg de Cd ($10,36 \pm 0,82$ % d'ADN dans la queue). Une relation dose-effet semble exister entre le niveau de contamination du sol et les dommages à l'ADN pour les deux premiers temps d'exposition, cette relation, même si elle n'est pas significative se dessine particulièrement pour 10 jours d'exposition (figure 6b).

Concernant la durée d'exposition de 56 jours, les niveaux de dommages mesurés quelle que soit la concentration de Cd ajouté dans le sol, ne sont plus différents du niveau mesuré chez les vers maintenus pour cette durée dans le sol de référence; ils sont compris entre 3 et 4,5% d'ADN dans la queue. Il apparaît qu'entre 10 jours et 56 jours, une réparation des dommages à l'ADN se met en place. Chez les témoins, pour ce temps d'exposition, le niveau basal mesuré est légèrement plus élevé que pour les premiers temps d'exposition et que ceux mesurés dans le sol de référence.

La figure 7 présente les moyennes des pourcentages médians d'ADN dans la queue (\pm SEM) observés après les expositions d'*E. fetida* en fonction de la concentration de Pb dans le sol (Figure 7a) et en fonction de la durée d'exposition (Figure 7b).

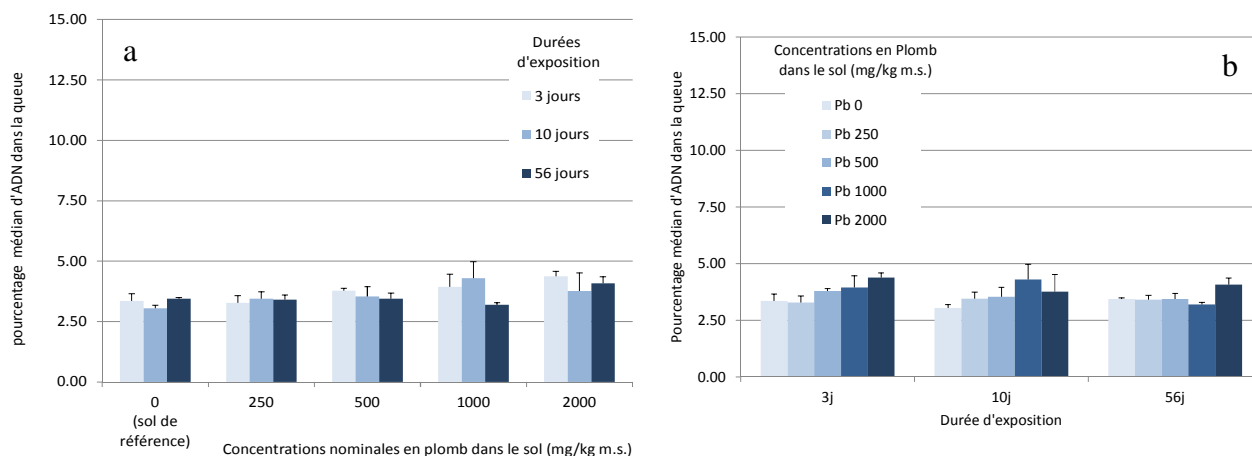


Figure 8: Dommages à l'ADN moyens chez *E. fetida* observés après expositions de 3, 10 et 56 jours au sol de référence contaminé artificiellement au Pb (moyennes des pourcentages d'ADN médians dans la queue des comètes \pm SEM ; a: présentation en fonction de la contamination du sol, b: présentation en fonction de la durée d'exposition)

Globalement, une très légère augmentation des dommages à l'ADN est observée suite à cette exposition, comparativement au témoin. Mais cette augmentation n'est jamais significative et nous ne pouvons conclure à un effet génotoxique du Pb pour *E. fetida*, même pour la concentration la plus élevée dans le sol (2000 mg/kg) suite aux expositions réalisées. Entre les trois durées des expositions (figure 7a), les résultats sont similaires.

Enfin, les figures 8 et 9 présentent les moyennes des pourcentages médians d'ADN dans la queue (\pm SEM) après expositions (3, 10 et 56 jours) d'*E. fetida* aux différentes concentrations de Pb et de Cd en mélange (respectivement les mélanges avec 5 mg/kg de Cd, figure 8 et 10 mg/kg de Cd, figure 9).

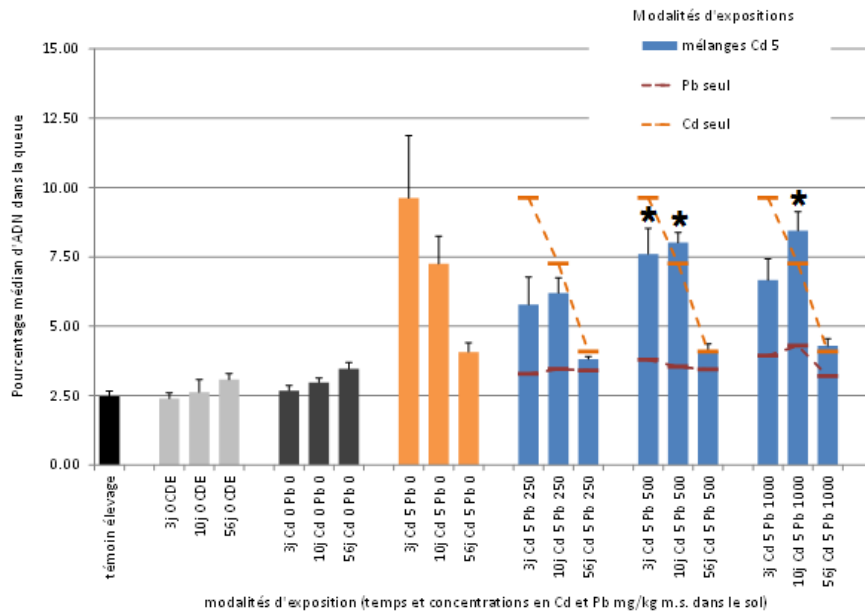


Figure 8: Dommages à l'ADN moyens chez *E. fetida* observés après expositions de 3, 10 et 56 jours au sol de référence contaminé artificiellement par le Cd et le Pb en mélange (mélanges réalisés avec 5 mg/kg de Cd; moyennes des pourcentages d'ADN médians dans la queue des comètes ± SEM)

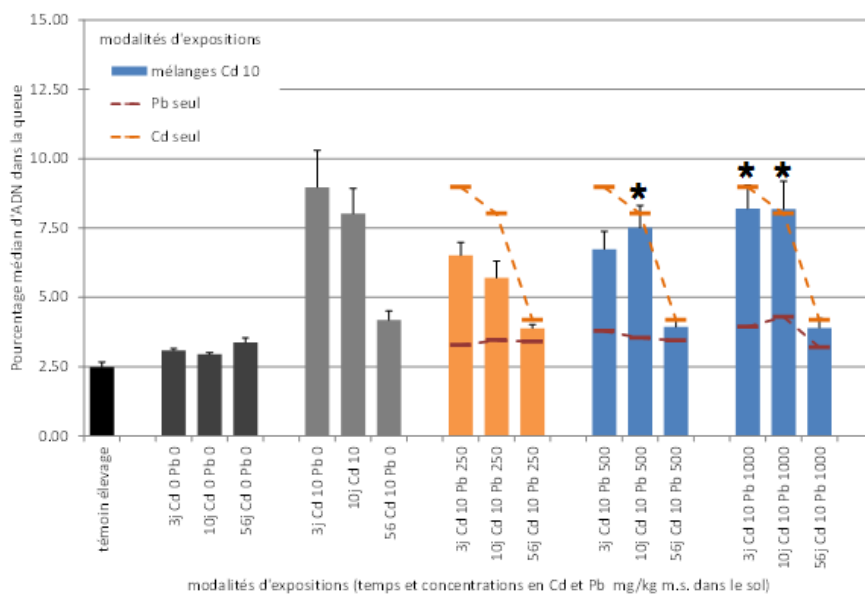


Figure 9: Dommages à l'ADN moyens chez *E. fetida* observés après expositions de 3, 10 et 56 jours au sol de référence contaminé artificiellement par le Cd et le Pb en mélange (mélanges réalisés avec 10 mg/kg de Cd; moyennes des pourcentages d'ADN médians dans la queue des comètes ± SEM)

Les observations suite aux expositions aux différents mélanges représentent une situation intermédiaire entre les deux cas précédents. Comme pour le Cd, une augmentation des

dommages à l'ADN est observée suite aux expositions aux différents mélanges Cd/Pb dans les sols, comparativement aux témoins (sol de référence et témoins élevage) pour les deux premières durées d'exposition (3 et 10 jours). Un retour est également observé vers le niveau basal de dommages après 56 jours d'exposition.

Les augmentations observées sont significatives pour les mélanges réalisés avec 5 mg/kg de Cd après 3 jours d'exposition pour 500 mg/kg de Pb et 10 jours d'exposition pour 500 et 1000 mg/kg de Pb (tests de Dunn, $p < 5.10^{-4}$) ainsi que pour les mélanges réalisés avec 10 mg/kg de Cd, après 3 jours d'exposition pour 1000 mg/kg de Pb ajouté dans le sol et après 10 jours 500 et 1000 mg/kg de Pb (tests de Dunn, $p < 8.10^{-4}$). Entre les deux premières durées des expositions, les résultats sont très similaires, un effet du temps d'exposition n'est observé qu'après 56 jours d'exposition où un retour vers les valeurs de dommages basales mesurées chez les témoins est observé. Tous les niveaux mesurés à cette date ne sont pas différents de ceux mesurés chez les témoins (tests de Dunn, $p > 0.0005$ pour les mélanges réalisés avec 5 mg/kg de Cd et $p > 0.0008$ pour ceux réalisés avec 10 mg/kg de Cd).

Lors des co-expositions, les effets clastogènes du Cd semblent très légèrement atténués, peut-être suite à la mise en place de mécanismes de défense contre les effets toxiques du Pb, ou des effets autres que clastogènes du Pb qui masquerait la génotoxicité du Cd.

3.3) Expression génique

Pour chaque graphique de chaque figure, 2 témoins sont présentés en compagnie des différents sols contaminés: un groupe d'individus issu de l'élevage et un groupe exposé au sol de référence. Les mesures pour chaque condition et chaque temps ont été effectuées en duplicats techniques. Les gènes de référence utilisés sont *β -act*, *contig2471* et *contig1517*. Les écart-types sur les histogrammes représentent la qualité des duplicats; plus les écart-types sont petits, meilleurs sont les duplicats. La ligne rouge représente le niveau d'expression relative

d'un effecteur donné mesuré chez les individus exposés au sol de référence. Les différences significatives ($p < 0,05$) sont représentées par le symbole « * ».

Enfin, pour certains candidats, le niveau de l'expression génique n'a pu être mesuré (molécules présentes mais en très faible quantité). La mention «<L.Q.» (inférieur à la limite de quantification) a été indiquée pour ces mesures.

3.3.1) *Cd-mt*

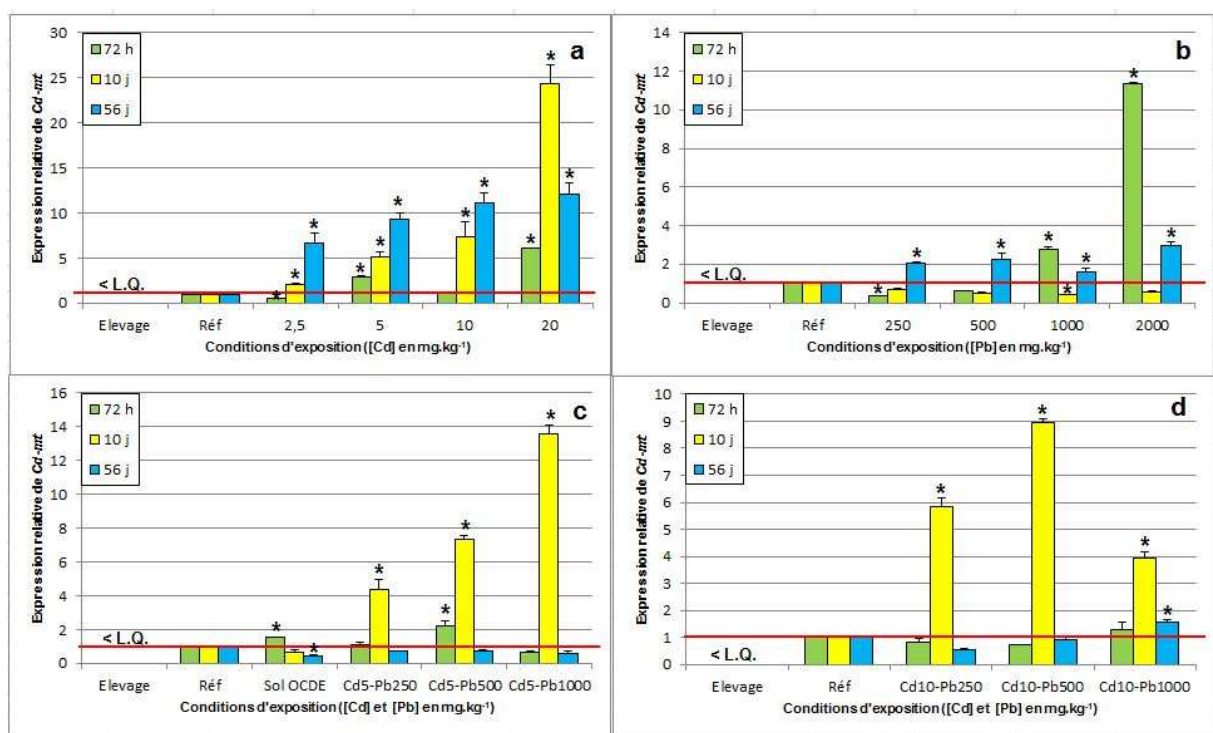


Figure 10: niveau de l'expression génique de la cadmium-métallothionéine (*Cd-mt*) mesuré chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

Légende : L.Q.: Limite de quantification

Lorsqu'*E. fetida* est exposé à des sols contaminés en cadmium (Cd) (Figure 10a), plus la concentration en Cd dans le sol est élevée, plus le niveau d'expression de *Cd-mt* est élevé. On peut aussi remarquer que plus la durée d'exposition à ces sols est longue, plus le niveau d'expression de *Cd-mt* est élevé. Une relation dose et temps dépendant semble être mise en

évidence pour l'expression génique de la *Cd-mt* lors d'expositions d'*E. fetida* à des sols contaminés en Cd (Tableau 5).

Lors d'exposition à des sols contaminés en plomb (Pb) (Figure 10b), les individus exposés pendant 72 heures à des concentrations de 1000 et 2000 mg.kg⁻¹ de Pb dans le sol montrent un niveau d'expression de *Cd-mt* élevé. Ceci pourrait se traduire par la présence importante de Pb dans le sol. Après 10 jours d'exposition, les niveaux d'expression de *Cd-mt* reviennent à un niveau basal suggérant ainsi une acclimatation des individus à la dose de Pb présente dans le sol. Après 56 jours d'exposition, *Cd-mt* est de nouveau induit quelle que soit la concentration en Cd dans le sol (Figure 10b).

Enfin, après 72 heures et 10 jours d'exposition au sol OCDE, le niveau d'induction de *Cd-mt* chez les individus est bas (Tableau 5). Cependant, une répression de *Cd-mt* peut être observée après 56 jours d'exposition à ce sol. Lorsque les individus sont exposés pendant 10 jours d'exposition à des sols contaminés par des mélanges en Cd et en Pb (Figures 10c et 10d), on peut observer le même motif d'expression de *Cd-mt* que lorsque les individus sont exposés à des sols contaminés par du Cd. L'ajout de concentrations de plus en plus élevées de Pb dans le sol aurait un effet similaire à l'augmentation de la concentration en Cd seul dans le sol. Le niveau d'expression de *Cd-mt* est plus élevé chez les individus exposés pendant 10 jours que celui des individus exposés pendant 72 heures.

Tableau 5: niveau de l'expression relative de la cadmium-métallothionéine (*Cd-mt*) chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

		Expression relative		
		72 h	10 j	56 j
[métaux], mg.kg ⁻¹				
Elevage				
Cd	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	2,5	↓ 0,47	↑ 2,02	↑ 6,72
	5	↑ 2,90	↑ 5,06	↑ 9,35
	10	↗ 1,22	↑ 7,40	↑ 11,13
	20	↑ 6,10	↑ 24,28	↑ 12,13
Pb	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	250	↓ 0,35	↘ 0,69	↑ 2,08
	500	↘ 0,65	↘ 0,53	↑ 2,24
	1000	↑ 2,78	↓ 0,43	↑ 1,61
	2000	↑ 11,33	↘ 0,59	↑ 2,99
Cd-Pb	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	Sol OCDE	↑ 1,53	↘ 0,68	↓ 0,43
	Cd5-Pb250	⇒ 1,11	↑ 4,35	↘ 0,71
	Cd5-Pb500	↑ 2,24	↑ 7,34	↘ 0,73
	Cd5-Pb1000	↘ 0,67	↑ 13,56	↘ 0,61
	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	Cd10-Pb250	↘ 0,81	↑ 5,83	↘ 0,57
	Cd10-Pb500	↘ 0,73	↑ 8,93	⇒ 0,92
Cd10-Pb1000	↗ 1,29	↑ 3,95	↑ 1,56	

Légende:

- ↑ Induction
- ↗ Légère induction
- ⇒ Stable
- ↘ Légère répression
- ↓ Répression

3.3.2) *pcs*

La figure 11 présente les résultats obtenus pour la mesure de l'expression de *pcs* chez les individus exposés aux différents sols contaminés. Globalement, on peut remarquer que plus le temps d'exposition est court et plus la concentration en métaux est faible, plus le niveau d'expression de *pcs* est élevé. Les individus exposés pendant 10 jours au sol OCDE (contrôle artificiel) montrent le niveau d'expression de *pcs* le plus élevé. Une répression de *pcs* peut être observée chez les individus exposés pendant 72 heures et 56 jours à ce sol (Tableau 6).

Cependant, il faudra être prudent lors de l'interprétation des résultats. En effet, les niveaux d'expression de *pcs* lors de ces expositions sont relativement faibles et sont donc peu informatifs d'un point de vue biologique.

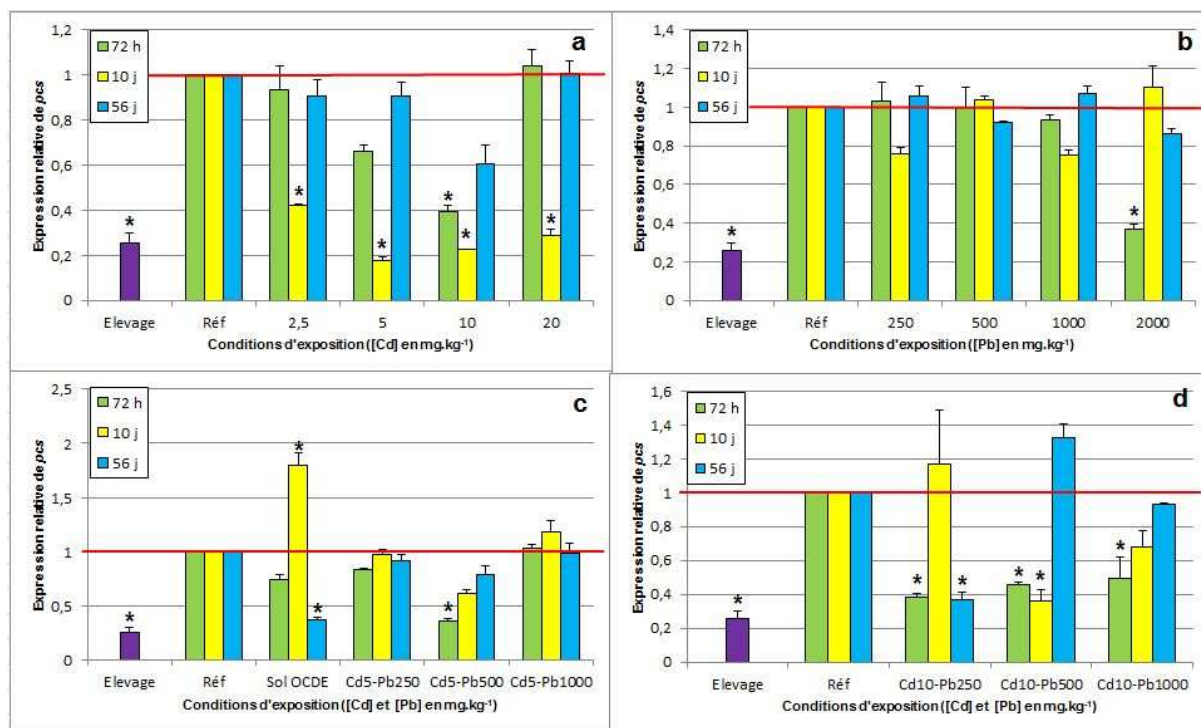


Figure 11: niveau de l'expression génique de la phytochélatine synthase (*pcs*) mesuré chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

Tableau 6: niveau de l'expression relative de la phytochélatine synthase (*pcs*) chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

		Expression relative			
		[métaux], mg.kg ⁻¹	72 h	10 j	56 j
Elevage				↓ 0,26	
Cd	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00	
	2,5	⇒ 0,94	↓ 0,42	⇒ 0,91	
	5	⇒ 0,66	↓ 0,18	⇒ 0,91	
	10	↓ 0,40	↓ 0,23	⇒ 0,61	
	20	⇒ 1,04	↓ 0,29	⇒ 1,01	
Pb	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00	
	250	⇒ 1,03	⇒ 0,76	⇒ 1,06	
	500	⇒ 1,00	⇒ 1,04	⇒ 0,92	
	1000	⇒ 0,93	⇒ 0,75	⇒ 1,07	
	2000	↓ 0,37	⇒ 1,10	⇒ 0,86	
Cd-Pb	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00	
	Sol OCDE	⇒ 0,74	↑ 1,80	↓ 0,37	
	Cd5-Pb250	⇒ 0,84	⇒ 0,97	⇒ 0,91	
	Cd5-Pb500	↓ 0,36	⇒ 0,61	⇒ 0,78	
	Cd5-Pb1000	⇒ 1,04	⇒ 1,18	⇒ 0,98	
	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00	
	Cd10-Pb250	↓ 0,39	⇒ 1,17	↓ 0,37	
	Cd10-Pb500	↓ 0,46	↓ 0,36	⇒ 1,33	
Cd10-Pb1000	↓ 0,49	⇒ 0,68	⇒ 0,94		

Légende:

- ↑ Induction
- ↗ Légère induction
- ⇒ Stable
- ↘ Légère répression
- ↓ Répression

3.3.3) cat

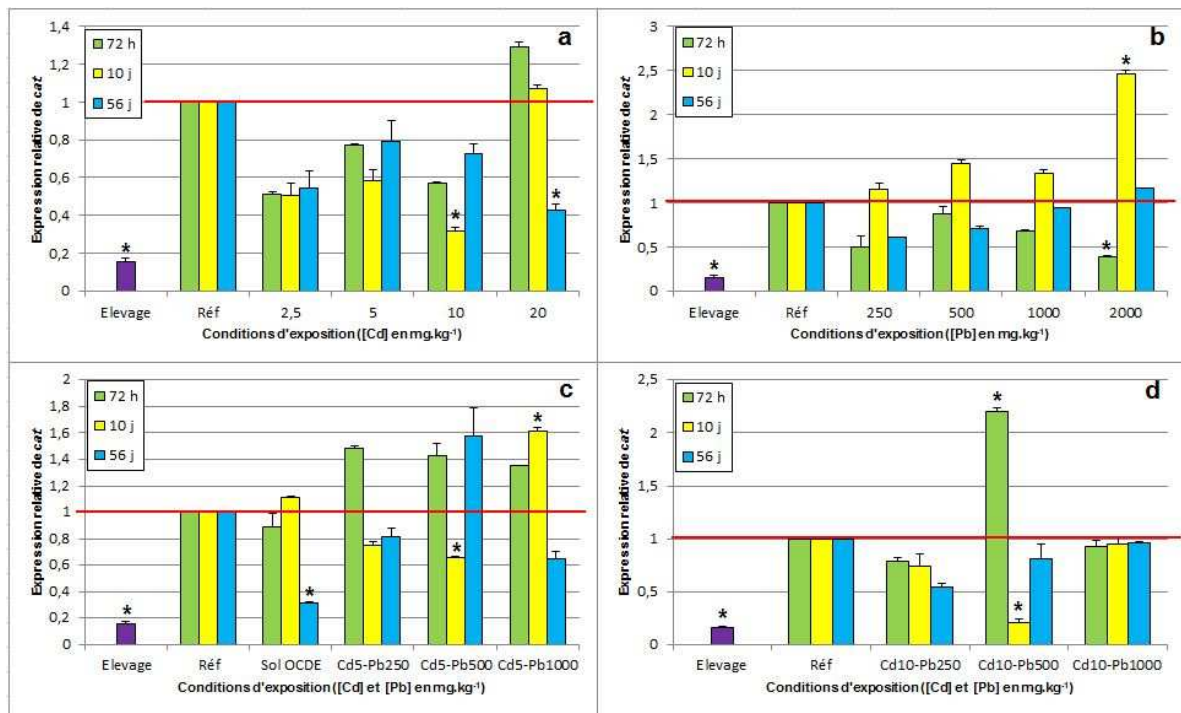


Figure 12: niveau de l'expression génique d'une catalase (*cat*) mesuré chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

Tableau 7: niveau de l'expression relative d'une catalase (*cat*) chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

		Expression relative			
		[métaux], mg.kg ⁻¹	72 h	10 j	56 j
		Eleavage		↓ 0,16	
Cd	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00	
	2,5	⇒ 0,51	⇒ 0,51	⇒ 0,55	
	5	⇒ 0,77	⇒ 0,59	⇒ 0,79	
	10	⇒ 0,57	↓ 0,32	⇒ 0,72	
	20	⇒ 1,29	⇒ 1,07	↓ 0,43	
Pb	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00	
	250	⇒ 0,50	⇒ 1,15	⇒ 0,61	
	500	⇒ 0,87	⇒ 1,45	⇒ 0,70	
	1000	⇒ 0,67	⇒ 1,34	⇒ 0,94	
	2000	↓ 0,39	↑ 2,46	⇒ 1,16	
Cd-Pb	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00	
	Sol OCDE	⇒ 0,89	⇒ 1,11	↓ 0,31	
	Cd5-Pb250	⇒ 1,49	⇒ 0,75	⇒ 0,82	
	Cd5-Pb500	⇒ 1,43	⇒ 0,65	↑ 1,58	
	Cd5-Pb1000	⇒ 1,35	↑ 1,61	⇒ 0,65	
	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00	
	Cd10-Pb250	⇒ 0,79	⇒ 0,74	⇒ 0,54	
	Cd10-Pb500	↑ 2,20	↓ 0,21	⇒ 0,81	
Cd10-Pb1000	⇒ 0,93	⇒ 0,95	⇒ 0,96		

Légende:

- ↑ Induction
- ↗ Légère induction
- ⇒ Stable
- ↘ Légère répression
- ↓ Répression

La figure 12 présente les résultats obtenus pour la mesure de l'expression de *cat* chez les individus exposés aux différents sols contaminés. Lorsque les animaux sont exposés aux sols contaminés au Cd (Figure 12a), le niveau d'expression de *cat* est proche de celui des individus exposés au sol de référence après 72 h et 10 j. Après 56 j d'exposition, le niveau d'expression est plus faible chez les individus exposés aux sols contaminés.

En ce qui concerne les individus exposés aux sols contaminés en Pb (Figure 12b), les individus exposés pendant 10 jours au sol le plus contaminé (2000 mg.kg⁻¹) montrent le niveau d'expression de *cat* le plus élevé (2,46 fois; $p = 1,82.10^{-4}$). Aucune tendance particulière ne peut être constatée pour les individus exposés aux sols contaminés par les mélanges de Cd et de Pb (Figures 12c et 12d). Cependant, *cat* est significativement induit après 72 heures d'exposition au sol contaminé par le mélange Cd10/Pb500 (2,20 fois; $p = 3,63.10^{-4}$). Enfin, après 72 heures et 10 jours d'exposition au sol OCDE, le niveau d'induction de *Cd-mt* chez les individus est bas (Tableau 7). Cependant, une répression significative de *cat* peut être observée après 56 jours d'exposition à ce sol ($p = 1,82.10^{-4}$).

3.3.4) *CuZnsod*

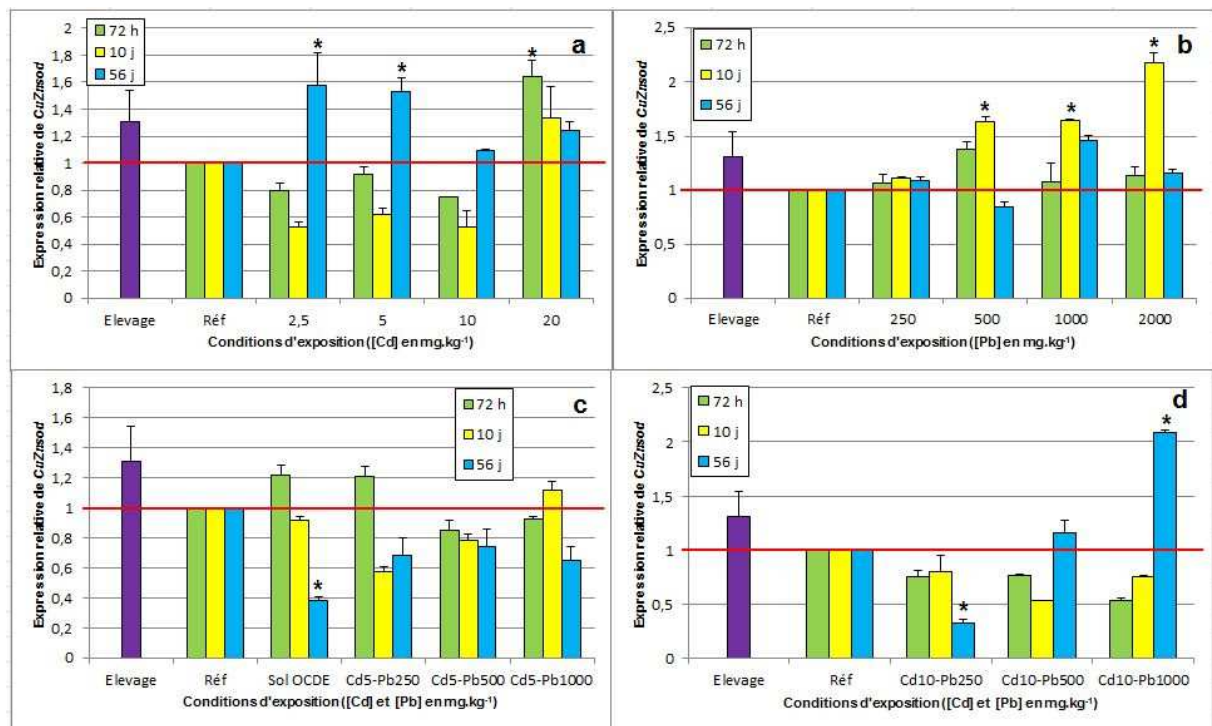


Figure 13: niveau de l'expression génique de la superoxyde dismutase Cu/Zn (*Cu/Zn sod*) mesuré chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

La figure 13 montre les résultats obtenus pour la mesure de l'expression de *Cu/Znsod* chez les individus exposés aux différents sols contaminés. Lors des expositions aux sols contaminés par le Cd, *Cu/Znsod* est significativement induit chez les individus exposés pendant 72 heures au sol contaminé par 20 mg.kg⁻¹ de Cd (1,64 fois; $p = 1,25.10^{-3}$) et chez ceux exposés pendant 56 jours aux sols contaminés par 2,5 et 5 mg.kg⁻¹ de Cd (1,58 fois; $p = 4,98.10^{-2}$ et 1,53 fois; $p = 6,02.10^{-3}$ respectivement).

Chez les individus exposés aux sols contaminés par le Pb, seuls ceux exposés pendant 10 jours montrent des variations significatives du niveau d'expression de *Cu/Znsod* (Tableau 8).

Lors des expositions aux sols contaminés par des mélanges de Cd et de Pb, aucune tendance particulière n'est observée. Seuls les individus exposés aux sols OCDE, contaminé par le mélange Cd10/Pb250 et contaminé par le mélange Cd10/Pb1000 montrent des variations significatives du niveau d'expression de *Cu/Znsod* ($p = 1,31.10^{-2}$, $p = 1,31.10^{-3}$ et $p = 3,39.10^{-3}$ respectivement).

Tableau 8: niveau de l'expression relative de la superoxyde dismutase Cu/Zn (*Cu/Zn sod*) chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

		Expression relative			
		[métaux], mg.kg ⁻¹	72 h	10 j	56 j
Elevage			↗	↗ 1,31	↗
Cd	Réf		⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	2,5		↘ 0,80	↘ 0,53	↑ 1,58
	5		⇒ 0,91	↘ 0,62	↑ 1,53
	10		↘ 0,75	↘ 0,52	⇒ 1,09
	20		↑ 1,64	↗ 1,33	↗ 1,24
Pb	Réf		⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	250		⇒ 1,07	⇒ 1,11	⇒ 1,08
	500		↗ 1,38	↑ 1,63	↘ 0,84
	1000		⇒ 1,08	↑ 1,64	↗ 1,46
	2000		⇒ 1,13	↑ 2,17	↗ 1,16
Cd-Pb	Réf		⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	SoI OCDE		↗ 1,22	⇒ 0,92	↓ 0,38
	Cd5-Pb250		↗ 1,21	↘ 0,58	↘ 0,68
	Cd5-Pb500		↘ 0,85	↘ 0,78	↘ 0,74
	Cd5-Pb1000		⇒ 0,93	⇒ 1,12	↘ 0,65
	Réf		⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	Cd10-Pb250		↘ 0,76	↘ 0,80	↓ 0,32
	Cd10-Pb500		↘ 0,76	↘ 0,53	⇒ 1,16
	Cd10-Pb1000		↘ 0,53	↘ 0,76	↑ 2,08

Légende:
 ↑ Induction
 ↗ Légère induction
 ⇒ Stable
 ↘ Légère répression
 ↓ Répression

3.3.5) *gstp*

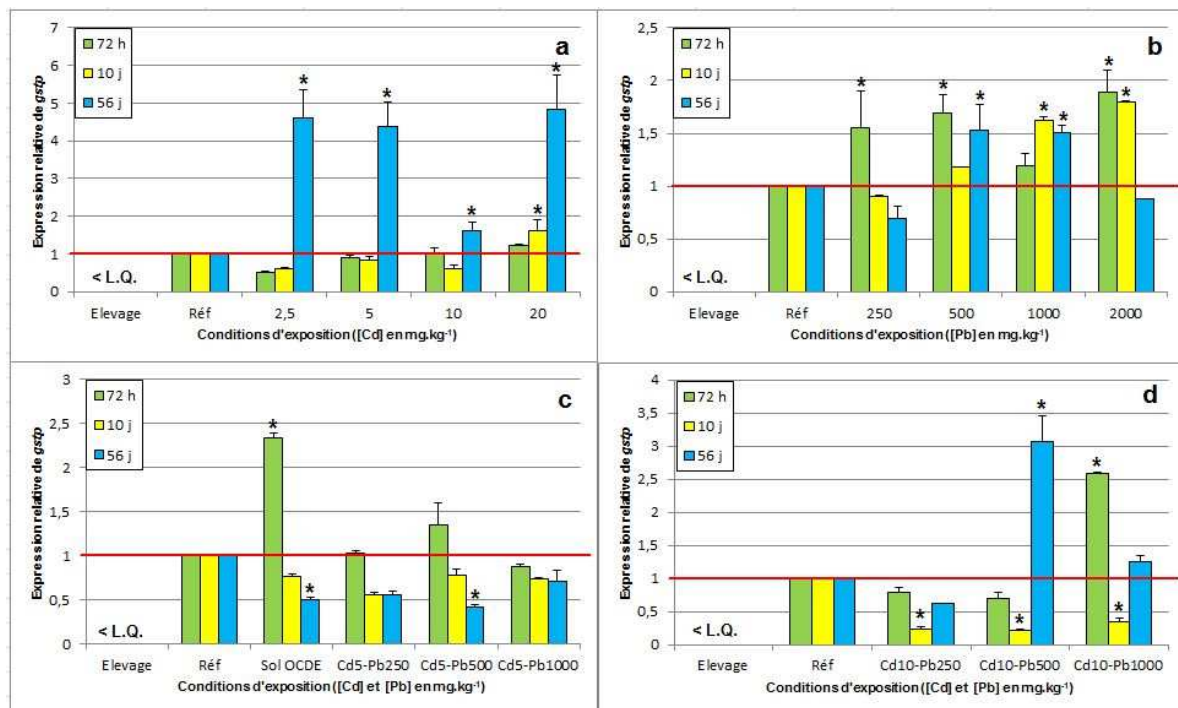


Figure 14: niveau de l'expression génique de la glutathion transférase Pi (*gstp*) mesuré chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

Légende : L.Q.: Limite de quantification

La figure 14 montre les résultats obtenus pour la mesure de l'expression de *gstp* chez les individus exposés aux différents sols contaminés. Le niveau d'expression de *gstp* est faible quelle que soit la condition d'exposition (en moyenne 10^{-3}).

Tableau 9: niveau de l'expression relative de la glutathion transférase Pi (*gstp*) chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

	[métaux], mg.kg ⁻¹	Expression relative		
		72 h	10 j	56 j
	Elevage			
Cd	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	2,5	↘ 0,52	↘ 0,61	↑ 4,61
	5	⇒ 0,92	↘ 0,84	↑ 4,39
	10	⇒ 1,03	↘ 0,63	↑ 1,62
	20	↗ 1,22	↑ 1,62	↑ 4,82
Pb	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	250	↑ 1,56	⇒ 0,90	↘ 0,69
	500	↑ 1,69	⇒ 1,18	↑ 1,53
	1000	⇒ 1,20	↑ 1,62	↑ 1,51
	2000	↑ 1,89	↑ 1,80	⇒ 0,88
Cd-Pb	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	Soil OCDE	↑ 2,33	↘ 0,76	↓ 0,49
	Cd5-Pb250	⇒ 1,03	↘ 0,55	↘ 0,56
	Cd5-Pb500	↗ 1,34	↘ 0,78	↓ 0,42
	Cd5-Pb1000	⇒ 0,88	↘ 0,74	↘ 0,70
	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	Cd10-Pb250	↘ 0,80	↓ 0,24	↘ 0,62
	Cd10-Pb500	↘ 0,71	↓ 0,23	↑ 3,09
	Cd10-Pb1000	↑ 2,60	↓ 0,35	↗ 1,26

Légende:
 ↑ Induction
 ↗ Légère induction
 ⇒ Stable
 ↘ Légère répression
 ↓ Répression

3.3.6) *gpx*

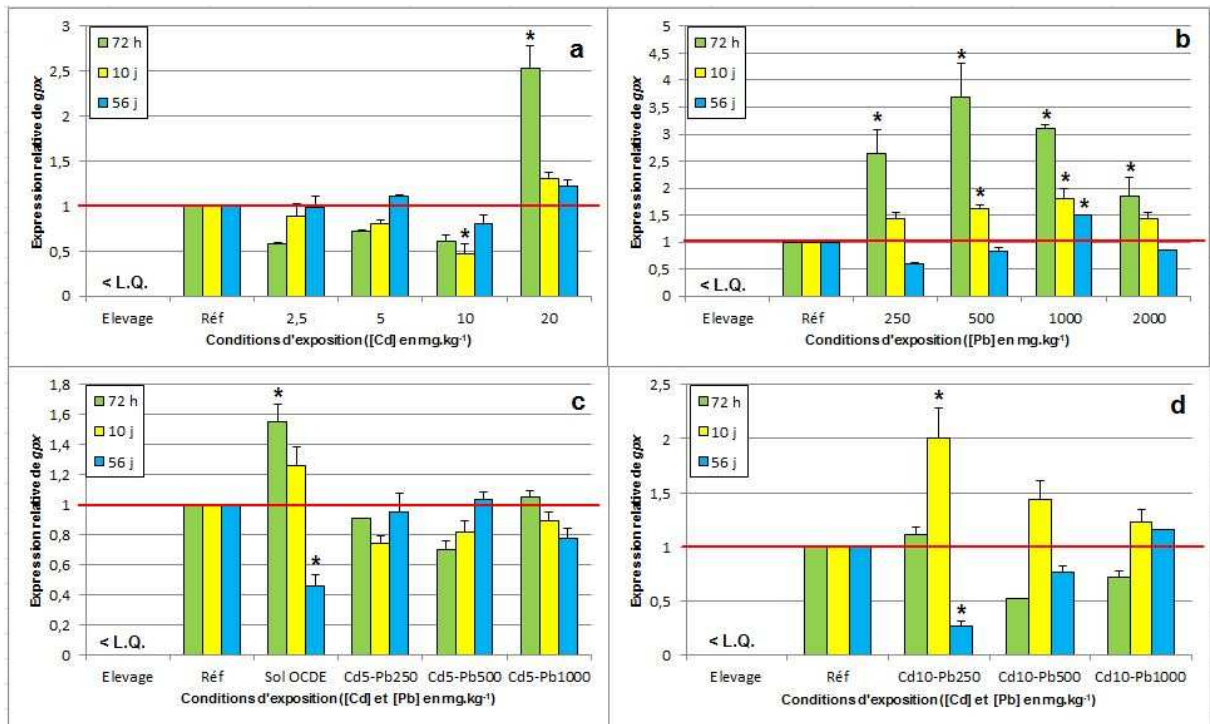


Figure 15: niveau de l'expression génique d'une glutathion peroxydase (*gpx*) mesuré chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

Légende : L.Q.: Limite de quantification

La figure 15 nous montre les résultats obtenus pour la mesure de l'expression de *gpx* chez les individus exposés aux différents sols contaminés. Le niveau d'expression de *gpx* est très faible quelle que soit la condition d'exposition (en moyenne $4 \cdot 10^{-4}$). Chez les individus exposés au sol contaminé par le mélange constitué de 10 mg/kg de Cd et 500 mg/kg de Pb, le niveau d'expression est plus élevé mais reste très faible ($1,2 \cdot 10^{-3}$ et $1,6 \cdot 10^{-3}$ après 72 h et 10 j d'exposition respectivement).

Tableau 10: niveau de l'expression relative d'une glutathion peroxydase (*gpx*) chez *E. fetida* (groupes de 15 individus par condition)

		Expression relative		
[métaux], mg.kg ⁻¹		72 h	10 j	56 j
Elevage				
Cd	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	2,5	↘ 0,58	⇒ 0,88	⇒ 0,98
	5	↘ 0,72	↘ 0,80	⇒ 1,11
	10	↘ 0,61	↓ 0,48	↘ 0,81
	20	↑ 2,53	↗ 1,30	↗ 1,23
Pb	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	250	↑ 2,63	↗ 1,43	↘ 0,59
	500	↑ 3,68	↑ 1,61	↘ 0,84
	1000	↑ 3,10	↑ 1,81	↑ 1,51
	2000	↑ 1,84	↗ 1,44	⇒ 0,85
Cd-Pb	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	Sol OCDE	↑ 1,55	↗ 1,26	↓ 0,46
	Cd5-Pb250	⇒ 0,91	↘ 0,74	⇒ 0,95
	Cd5-Pb500	↘ 0,70	↘ 0,82	⇒ 1,04
	Cd5-Pb1000	⇒ 1,05	⇒ 0,90	↘ 0,77
	Réf	⇒ 1,00	⇒ 1,00	⇒ 1,00
	Cd10-Pb250	⇒ 1,12	↑ 2,01	↓ 0,27
	Cd10-Pb500	↘ 0,52	↗ 1,44	↘ 0,76
	Cd10-Pb1000	↘ 0,71	↗ 1,22	⇒ 1,15

Légende:

- ↑ Induction
- ↗ Légère induction
- ⇒ Stable
- ↘ Légère répression
- ↓ Répression

4) Discussion

Les annélides oligochètes sont connus pour accumuler certains éléments traces métalliques à des fortes concentrations lorsqu'ils sont exposés à des sols contaminés (Morgan & Morgan, 1988). Nos résultats indiquent que l'invertébré terrestre *Eisenia fetida* accumule le Cd et dans une moindre mesure le Pb dès qu'il est exposé à des sols contaminés par ces métaux. Cette accumulation est la conséquence de l'ingestion de particules de sol contaminé (voie digestive) et/ou du contact tégumentaire (l'épiderme d'*E. fetida* est fortement vascularisé; cuticule très mince). De plus comme nous avons travaillé avec des sols artificiellement contaminés, le Pb et le Cd sont plus disponibles que dans des sols contaminés issus du terrain.

Les vers de terre accumulent le Cd dans leurs tissus de façon concentration-dépendante. Pour d'autres invertébrés du sol, il a été également reporté une augmentation de la concentration en Cd dans les tissus lorsque les concentrations du sol augmentent (Heikens et al., 2001). Nos résultats confirment que le Cd est fortement accumulé, de manière croissante dans le temps: il

ne semble pas y avoir élimination de ce métal car les concentrations internes en Cd augmentent avec la durée d'exposition (Spurgeon & Hopkin, 1999). En présence de métaux dans le milieu, les vers de terre mettent en œuvre différents mécanismes de défense: compartimentalisation, stockage ou excrétion des ions métalliques au niveau des tissus les plus sensibles (Lukkari et al., 2005). L'excrétion du Cd semble absente, celle du Pb est faible (Bernard et al., 2010). Le Cd et le Pb sont principalement détoxiqués chez les annélides en étant chélatés par des protéines riches en sulfures (Demuyne et al., 2006).

Heikens et al. (2001) ont montré que pour la plupart des invertébrés du sol, la concentration en Zn dans les tissus des organismes est indépendante de la concentration du sol. Pour ce métal, nos résultats sont en accord avec ceux de Lock & Janssen (2001) et Demuyne et al. (2007): la concentration en Zn dans le corps d'*E. fetida* est régulée à un niveau constant de 100-200 mg/kg de Zn quelle que soit la concentration en métaux (Cd et/ou Pb) dans le sol. Le Zn est un métal essentiel au bon fonctionnement des organismes vivants, il peut intervenir dans le maintien de l'architecture cellulaire (croissance, développement et régénération des tissus) (Jeantet et al., 1997 ; Lukkari et al., 2005), il est impliqué dans le fonctionnement de nombreuses enzymes (Liu et al., 1992), il participe au contrôle de la respiration cellulaire (Lukkari et al., 2005). *E. fetida* a une voie spécifique et une capacité de redistribution pour réguler les métaux essentiels tels que le Cu et le Zn en excès dans leur corps, ce qui mène à une balance entre prise et excrétion de ces métaux (Hopkin, 1995; Bernard et al., 2010). Ce mécanisme de régulation ne semble pas être perturbé par la présence de Cd et/ou de Pb artificiellement présents à des concentrations même élevées. Il maintient à un niveau relativement constant les concentrations internes en Zn sur toute la durée des expositions.

Même si il est plus difficile de discuter nos résultats concernant les concentrations internes en Pb, son comportement ressemble à celui du Cd.

Concernant les effets des mélanges, quand le Cd est présent dans le sol à la plus faible concentration (5 mg/kg), la présence de Pb en association ne semble pas modifier la bioaccumulation du Cd et du Pb par les vers. Sauf peut-être avec les deux concentrations de Pb les plus fortes (500 et 1000 mg/kg de sol sec), où après 56 jours d'expositions, l'accumulation du Cd semble moins forte.

Quand le Cd (10 mg/kg sol sec) est présent en association avec du Pb, par contre l'accumulation du Cd est en revanche plus faible comparativement aux résultats obtenus en condition monométallique d'exposition. L'accumulation du Pb par contre semble inchangée. Un tel résultat pourrait s'expliquer par une compétition entre les deux métaux en termes de biodisponibilité pour les vers. Ces résultats obtenus *in vivo* en sol naturel artificiellement contaminé, sont très similaires aux observations faites par Li et al. en 2008, mais ces auteurs avaient réalisées des expositions d'une semaine en milieu liquide d'*E. fetida* au Cd seul (0.5 mg/L), au Pb seul (0,5 mg/L) et au mélange de ses concentrations.

Les résultats obtenus lors du test des comètes illustrent que la mesure des dommages à l'ADN au niveau des cœlomocytes d'*E. fetida* est appropriée pour étudier la génotoxicité d'agents environnementaux. Sur l'ensemble des expérimentations, un faible pourcentage de dommages à l'ADN est toujours observé au niveau des cœlomocytes des vers «témoins d'élevage», «sol de référence» et «sol OCDE». Lors de la lecture de ces lames correspondant aux contrôles négatifs, les noyaux apparaissent sphériques sans traces de migration d'ADN endommagé, excepté quelques noyaux de cellules. Ainsi de faibles dommages à l'ADN persistent; en effet des dommages endogènes existent, mais à un degré faible : ils sont liés au métabolisme cellulaire et donc inévitables. Ces dommages peuvent être engendrés par des erreurs de réplifications, par les mécanismes de réparation et surtout par l'accumulation et la production de métabolites cellulaires réactifs au niveau des mitochondries et du réticulum endoplasmique, notamment d'espèces réactives de l'oxygène (ROS).

Concernant les essais avec le Cd, de récentes études suggèrent qu'il a un haut niveau de mutagénicité, en interférant avec les mécanismes de réparation de l'ADN. Au vu des résultats obtenus, nous pouvons confirmer la génotoxicité du Cd. Effectivement, nous observons des dommages à l'ADN significatifs suite aux expositions au Cd seul pour les deux premiers temps d'expositions (3 et 10 jours) et des relations temps-dépendante ou dose-dépendante semblent se dessiner (sans jamais être significatives). Les résultats du test des comètes correspondent, pour un temps t donné, à un « instantané » des dommages à l'ADN (cassures simple- et double-brins, sites alcali-labiles) qui regroupent les dommages directs mais également les cassures secondaires, transitoires, suite à l'intervention des mécanismes de réparation de l'ADN. Il semble qu'entre les deux durées d'exposition, un équilibre se soit installé entre la génération des dommages à l'ADN et leur réparation incomplète et complète. Les résultats obtenus après 56 jours, illustrent que des mécanismes de réparation se sont mis en place car un retour vers les niveaux mesurés chez les témoins sont observés pour toutes les concentrations de Cd dans le sol, même la plus élevée de 20 mg/kg.

Dans la littérature, nous n'avons pas trouvé de travaux ayant étudié la génotoxicité environnementale avec les cœlomocytes d'*E. fetida* sur des temps aussi longs, la plus longue durée d'exposition étant généralement de 28 jours, comme dans les essais standardisés de reproduction. L'existence d'un mécanisme de réparation efficace des dommages à l'ADN (réparation des bases par excision, BER) a cependant été décrite *in vitro* et *in vivo* chez cette espèce dans l'étude de Hertel-Aas et al. (2011). Ce mécanisme serait d'ailleurs plus efficace dans la réparation des cassures de brins que pour celle des sites reconnus par l'endonucléase FPG et de ce fait l'hypothèse d'une accumulation possible de sites oxydés de l'ADN étaient émise par les auteurs. L'étude de l'expression des gènes de réparation de l'ADN chez *E. fetida* apporterait des éléments intéressants et inédits sur ce sujet.

Le Pb n'est pas reconnu comme génotoxique et nos expérimentations le confirment, du moins biologiquement. Suite aux expositions au Pb, une légère augmentation du niveau de dommages à l'ADN est observée chez les vers exposés, mais celle-ci n'est jamais significative même pour la plus forte concentration (2000 mg/kg) utilisée. Le Pb n'apparaît pas comme un génotoxique, plus précisément comme un agent clastogène pour cette espèce de ver de terre. Cette absence de réponse génotoxique pouvait s'expliquer : (1) parce qu'il n'est pas génotoxique, (2) parce que le tégument du ver de terre constitue une barrière gênant l'entrée du Pb et par conséquent n'engendrerait pas ou peu d'effets génotoxique aux concentrations utilisées (de 250 à 2000 mg/kg de sol m.s.) *in vivo*; la génotoxicité du Pb ne se traduit pas en dommages mesurés par le test des comètes (cassures simples et double brins, sites alcali-labiles) et (3) il est possible que le Pb présent au sein de la cellule n'atteigne pas le noyau (du fait notamment des membranes cellulaires et nucléaires) et donc n'exprime pas son caractère toxique vis-à-vis de l'ADN.

Les dommages observés suite aux expositions *in vivo* aux différents mélanges Cd et Pb sont intermédiaires entre les cassures reportées suite aux deux différentes expositions monométalliques. Comme pour le Cd, une augmentation des dommages à l'ADN est observée (plus élevée que dans le cas du Pb seul, et légèrement inférieure, parfois équivalente, aux résultats obtenus avec le Cd seul). Lors de ces co-expositions, les effets clastogènes du Cd apparaissent un peu atténués.

Globalement, l'ensemble de ces résultats (notamment pour le Cd et le Pb) sont en accord avec les travaux déjà publiés avec *E. fetida* (Di Marzio et al., 2005; Fourié et al., 2007; Li et al., 2009; Wu et al., 2012). Ces deux dernières références sont d'ailleurs les seules directement comparables puisque les expositions se sont faites *in vivo* et en matrice Sol (sol naturel en ce qui nous concerne et sol artificiel OCDE pour ces auteurs). Leurs expositions ont duré 7 jours et les gammes utilisées étaient les suivantes: 0; 0,1; 1 et 10 mg/kg pour le Cd et 0; 5; 50 et 500

mg/kg pour le Pb. Les concentrations utilisées par ces auteurs sont plus faibles que les nôtres et leurs gammes sont de progression géométrique de raison 10 (géométriques de raison 2 dans notre cas), ce qui explique qu'ils aient pu observer concernant le Cd seul une augmentation significative des dommages avec la concentration dans les sols (notamment entre 1 et 10 mg/kg). Nos résultats suggèrent également cette augmentation dose-dépendante mais elle n'est pas significative. L'originalité de notre travail est d'étudier les dommages à l'ADN à trois temps d'exposition différents. Concernant les résultats des expositions au Cd et au Pb en mélange, l'hypothèse des auteurs s'oriente vers des effets de synergie aux faibles concentrations en mélange et ils n'excluent pas des effets d'antagonisme entre les 2 métaux à des concentrations plus élevées, ce que nous observons dans nos expérimentations.

A ces niveaux de concentrations, la présence de Pb entraînerait une diminution de Cd dans le cytoplasme des cellules et donc une diminution des effets toxiques du Cd (cytotoxique et génotoxique). Cette dernière hypothèse est en accord avec les résultats de Li et al. en 2008, avec *E. fetida* et des expositions réalisées en milieu liquide, qui montraient que l'ajout de Pb^{2+} entraînait une réduction significative de la fraction cytosolique du Cd et son augmentation dans la fraction membranaire des cellules. A un niveau plus global (de l'organisme cette fois), nous observons que la présence de Pb semble diminuer l'accumulation de Cd aux plus fortes concentrations.

De l'ensemble de ces résultats nous retiendrons que le Cd est génotoxique pour *E. fetida* et apparemment pas le Pb. Les mécanismes de réparation prennent en charge les dommages à l'ADN induit par le Cd et cette réparation apparait complète après 56 jours d'exposition. Deux mécanismes principaux peuvent généralement expliquer la génotoxicité du Cd: (1) la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via des réactions de type Fenton et Haber-Weiss, (2) l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN. Dans nos travaux cette inhibition n'est pas complète puisque nous n'observons plus de dommages à l'ADN après 56

jours d'exposition. Concernant le Pb, les résultats des travaux portant sur sa génotoxicité sont parfois équivoques et contradictoires. Les données contradictoires existant dans la littérature soulignent cependant que la génotoxicité du Pb dépendait étroitement des conditions expérimentales, des modèles biologiques utilisés, de la présence d'autres contaminants, etc. Cela amène à s'interroger sur la biodisponibilité du Pb dans les sols que nous avons utilisés ainsi que sur le type de dommages (cassures, adduits, pontages ADN-ADN et ADN-protéine) observés suite aux expositions au Pb seul ou en mélange.

Le tableau 11 récapitule l'ensemble des résultats obtenus lors des mesures des variations d'expression géniques chez *E. fetida* exposés aux différents sols. Des résultats obtenus avec les sols témoins, nous pouvons valider l'utilisation du sol de référence comme témoin négatif dans les différentes expérimentations. Certes quelques variations d'expression par rapport aux témoins d'élevage sont observées mais celles-ci restent modérées. Elles traduisent un léger stress lié au transfert vers les sols par rapport aux conditions optimales de l'élevage. Cette observation a déjà été faite par rapport au même sol de référence par Manier et al en 2012 ou par rapport à d'autres sols de référence peu ou pas contaminés (Bernard et al., 2010; Brulle et al., 2011). Concernant le sol OCDE, des variations significatives du niveau d'expression de tous les gènes testés sont observées chez les animaux exposés le plus longtemps (56j d'exposition). Ceci traduit l'existence d'un stress chez les animaux. Même si le sol OCDE est la matrice conseillée pour réaliser les essais d'écotoxicité avec cette espèce, il s'agit d'un sol artificiel, très éloigné du substrat d'élevage ou des litières où vit habituellement *E. fetida*. De plus, les temps préconisés dans les tests d'écotoxicité sont beaucoup plus courts avec un maximum de 28 jours pour le test de reproduction. L'utilisation de ce substrat artificiel est donc à déconseiller pour réaliser des expositions longues. Les études de niveaux d'expression à court terme sont à privilégier (jusqu'à 14 jours).

De l'ensemble des résultats obtenus avec les sols contaminés artificiellement avec du Cd et/ou du Pb, il apparaît clairement que c'est le Cd qui entraîne les modifications d'expression génique les plus significatives dans les cœlomocytes d'*E. fetida*. L'exemple le plus caractéristique concerne l'expression de *Cd-mt* dans le cadre des expositions au Cd.

Tableau 11: Synthèse des résultats de l'étude de l'expression génique réalisée sur les coelomocytes d'*E. fetida* suite aux différentes expositions en conditions contrôlées (sols artificiellement contaminés)

Conditions expérimentales			Expression génique - observations	Commentaires		
Sols témoins	Référence et OCDE	3, 10 et 56 jours	<i>Cd-mt</i>	OCDE ↑ après 3j et ↓ après 56j	1. Le transfert dans ces sols semble entraîner un léger stress chez les vers par rapport aux conditions d'élevage. 2. Le sol OCDE semble induire à long terme un stress chez les vers (56j d'exposition)	
			<i>pcs</i>	↑ par rapport témoin élevage OCDE ↑ après 10j et ↓ après 56j		
			<i>cat</i>	↑ par rapport témoin élevage OCDE ↓ après 56j		
			<i>CuZnsod</i>	↓ par rapport témoin élevage OCDE ↓ après 56j		
			<i>gstp</i>	OCDE ↑ après 3 j et ↓ après 56j		
			<i>gpx</i>	OCDE ↑ après 3 j et ↓ après 56j		
Sols artificiellement contaminés	Expositions mono-métalliques	[Cd] : 0-2,5-5-10-20 mg/kg	<i>Cd-mt</i>	↑ par rapport Réf (Cd5 et Cd20 3j, Cd 10j et Cd 56j) et ↓ Cd 2.5 3j ↑ avec [Cd] dans le sol ↑ avec la durée d'exposition sauf pour Cd 20 56j (< 10j)	1. Les variations significatives sont principalement observées après 10j d'exposition 2. Les réponses ne semblent pas dépendre de la [Cd] mais de la présence de Cd dans le sol (sauf Cd-mt) 3. La Cd-mt représente un « bon » marqueur d'exposition comparable au suivi de la bioaccumulation de Cd par les vers	
			<i>pcs</i>	3j : ↓ par rapport Réf sauf Cd 10 (↓) 10j : ↓ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Cd] 56j : ↓ mais pas de réelle ≠ avec Réf		
			<i>cat</i>	↓ par rapport réf sauf Cd 10 10j et Cd 20 56j(↓) mais celle-ci est constante qq soit [Cd]		
			<i>CuZnsod</i>	3 et 10j : ↓ par rapport Réf (sauf Cd 20 3j ↑) 56j : ↑ par rapport Réf sauf pour Cd 10 et 20		
			<i>gstp</i>	3 et 10j : pas de ≠ avec Réf sauf Cd 20 10j (↑) 56j : ↑ par rapport témoin mais celle-ci est constante qq soit [Cd]		
			<i>gpx</i>	3j, 10j et 56j : pas de ≠ avec Réf sauf Cd 10 10j (↓) et Cd 20 3j (↑)		
	Expositions mono-métalliques	[Pb] : 0-250-500-1000-2000 mg/kg	3, 10 et 56 jours	<i>Cd-mt</i>	3j : ↓ Pb 250 et ↑ Pb 1000 et 2000 10j : pas de ≠ avec Réf sauf Pb 1000 (↓) 56j : ↑ par rapport Réf mais celle-ci est constante qq soit [Pb]	1. Les effets significatifs sont surtout observés pour les concentrations en Pb les + élevées (500 et surtout 1000 et 2000 mg/kg) 2. Pas de profil signé de réponse, les gènes semblent répondre indépendamment 3. Les variations sont surtout observées après 3 et 10j d'exposition
				<i>pcs</i>	pas de ≠ avec Réf sauf Pb 2000 3j (↓) 3j : ↓ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] sauf Pb 2000 (↓) 10j : ↗ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] sauf Pb 2000 (↑) 56j : peu de ≠ avec Réf	
				<i>cat</i>	3j : peu de ≠ avec Réf 10j : ↑ sauf Pb 250 56j : peu de ≠ avec Réf	
				<i>CuZnsod</i>	3j : ↑ sauf pour Pb 1000, pas dépendante de [Pb] 10j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↓ Pb 250 et ↗ Pb 500) 56j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↓ Pb 250 et Pb 2000)	
				<i>gstp</i>	3j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↑ maximale : Pb 500) 10j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↗ pour Pb 250 et Pb 2000) 56j : peu de ≠ avec Réf (↓) sauf Pb 1000 (↑)	
				<i>gpx</i>	3j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↑ maximale : Pb 500) 10j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↗ pour Pb 250 et Pb 2000) 56j : peu de ≠ avec Réf (↓) sauf Pb 1000 (↑)	

Tableau 11 (suite et fin)

Sols contaminés artificiellement	Mélanges Cd + Pb	[Cd] 5 + [Pb] 250-500- 1000 mg/kg	3, 10 et 56 jours	<i>Cd-mt</i>	Mélange avec Cd 5 3 et 56j : peu de ≠ avec Réf (sauf ↑ pour Pb 500 3j)	1. Les effets significatifs sont surtout observés pour les mélanges avec la concentration en Cd la + élevée (10 mg/kg) sauf pour Cd-mt qui est le marqueur biologique dont la réponse est la plus intéressante dans le cadre des expositions aux mélanges Cd 5 et Cd 10	
					Mélange avec Cd 5 10j : ↑ parallèle à ↗ [Pb] dans les mélanges		
					Mélange avec Cd 10 3 et 56j : peu de ≠ avec Réf (sauf ↑ pour Pb 1000 56j)		
					Mélange avec Cd 10 10j : ↗ et parallèle à ↗ [Pb] entre 250 et 500 mg/kg		
					<i>pcs</i>		Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf sauf ↓ pour Pb 500 3j
					Mélange avec Cd 10 3, 10 et 56 j : ↓ pour Pb 250 3j et 56j, Pb 500 3j et 10j et Pb 1000 3j		
					<i>cat</i>		Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf sauf 10j ↓ pour Pb 500 et ↑ Pb 1000
Sols contaminés artificiellement	Mélanges Cd + Pb	[Cd] 10 + [Pb] 250-500- 1000 mg/kg	3, 10 et 56 jours	<i>CuZnsod</i>	Mélange avec Cd 10 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf sauf Pb 500 : ↑ 3j et ↓ 10j	2.	
					<i>gtp</i>		Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : pas de ≠ avec Réf
					Mélange avec Cd 10 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf sauf après 56 j Pb 250 ↓ et Pb 1000 ↑		
					Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf (↘ sauf Pb 500 56j (↓))		
					Mélange avec Cd 10 3 j : peu de ≠ avec Réf (sauf Pb 1000 ↑)		
					Mélange avec Cd 10 10 j : ↓, constante quel que soit [Pb]		
					Mélange avec Cd 10 56 j : peu de ≠ avec Réf (sauf Pb 500 ↑)		
<i>gpx</i>	3, 10 et 56j : peu de ≠ avec Réf sauf Pb 250 (↑ à 10j et ↓ à 56j)						

(Symboles utilisés, abréviations : → (ou =) comparable à ; ↗ induction non significative ; ↑ induction significative ; ↘ répression non significative ; ↓ répression significative ; ↗ augmentation ; ↘ baisse ; ≠ différence ; qq quelque ; tjrs toujours ; Réf référence ; *cat* = Catalase, *gpx* = Glutathione peroxidase, *gtp* = Pi glutathione transferase, *Cd-mt* = Cadmium metallothionein, *pcs* = Phytochelatin synthase, *CuZnsod* = Copper/Zinc superoxide dismutase.)

Brièvement, pour rappel, dans la plupart des organismes, les métallothionéines (MTs) sont des protéines de faible poids moléculaire (4 à 8 kDa) riches en cystéine, dépourvues d'acides aminés aromatiques et qui sont capables de fixer des ions métalliques. Elles sont codées par un gène et celles qui sont inductibles par un stress métallique sont nommées MTs de type II. Elles sont principalement connues pour leurs rôles dans la détoxification des éléments traces métalliques tels que le Cd et dans l'homéostasie d'éléments essentiels tels que le Zn (Palmiter et al., 1998; Klaassen et al., 1999). Les MTs ont été étudiées chez les macroinvertébrés du sol (Gruber et al., 2000; Chabicoovsky et al., 2003; Hendawi et al., 2004; Demuynck et al., 2005; Galay-Burgos et al., 2005; Timmermans et al., 2005; Brulle et al., 2006; Demuynck et al., 2006; Rozen et al., 2006; Morgan et al., 2007; Janssens et al., 2008; Bernard et al., 2010; Liang et al., 2011).

Ainsi, lors des expositions au Cd seul, des relations temps- et dose-dépendantes sont observées pour le gène *Cd-mt* : (1) pour un temps d'exposition donné l'expression de ce gène augmente avec la concentration de Cd et (2) pour une concentration donnée, l'expression du gène augmente avec la durée d'exposition (sauf pour 20 mg/kg de Cd dans le sol, alors une diminution est observée entre 10 et 56 jours d'exposition).

Les profils d'accumulation du Cd et du niveau d'expression de *Cd-mt* sont similaires. Selon Veltman et al. (2007), le Cd serait difficile à excréter chez les vers (travaux réalisés avec *Lumbricus rubellus*, une espèce proche). Le principal mécanisme de défense semble être la séquestration du Cd par la Cd-MT. En absence de mécanisme de détoxification, qui permettrait l'excrétion du Cd, le niveau d'expression de *Cd-mt* resterait élevé afin de chélater ce métal et donc empêcher les effets délétères dus à la présence du Cd libre dans les cellules. Les résultats présentés ici sont en accord avec ceux obtenus précédemment par Brulle et al. (2006 ; 2007) chez *E. fetida*. Ces auteurs avaient travaillé en utilisant le sol OCDE contaminé par une gamme de concentrations de Cd bien plus élevées (8, 80 et 800 mg/kg) et des temps

d'exposition de 6 et 14 jours. Enfin, même si les conditions expérimentales sont plus éloignées (sols naturels contaminés), des observations comparables ont été faites par Bernard et al. (2010) (i.e. *E. fetida* exposés 2 mois à un sol provenant de l'ancien site de Metaleurop (Noyelles-Godault, France) dont les concentrations en Cd étaient aux alentours de 15 mg/kg). Les autres candidats étudiés ne présentent pas le même type de réponse que *Cd-mt*: (1) leur niveau d'expression est très faible (ex: 10^{-3} pour *gstp* et 10^{-4} pour *gpx* et *pcs*) et proche des expressions mesurées chez les témoins (*cat* et *CuZnsod* par exemple). Pour ces deux gènes, Brulle et al. (2006; 2007) avaient obtenu la même réponse ainsi que Bernard et al. (2010) pour *pcs*. En revanche, Brulle et al. (2008a) avaient observé une induction de *pcs* chez *E. fetida* exposés à 8 mg/kg de Cd (sol OCDE contaminé, 2 et 14 jours d'exposition); (2) les variations significatives sont principalement observées après 10j d'exposition (pour *Cd-mt* des variations significatives sont reportées dès 3 jours d'exposition pour la plus faible concentration de cadmium); (3) et les réponses observées ne semblent pas dépendre de la concentration en Cd mais de la présence de Cd dans le sol. En conclusion, à l'opposé de *Cd-mt*, les effecteurs étudiés impliqués dans le stress oxydatif ne semblent pas être de bons indicateurs de stress d'une contamination au Cd à des concentrations environnementales.

Pour les expositions réalisées avec le Pb seul, les profils d'expression obtenus sont plus nuancés et globalement les variations observées sont moins significatives. Généralement, des variations d'expression sont observées pour les concentrations en Pb les plus élevées (500 et surtout 1000 et 2000 mg/kg), sans lien avec la concentration de Pb mais plutôt avec la présence de Pb dans le sol et après les temps d'exposition de 3 et 10 jours. Contrairement aux observations réalisées suite à l'exposition au Cd, il est plus difficile ici de distinguer des relations temps- et dose-dépendantes dans les profils d'expression obtenus. Ainsi pour *Cd-mt*, les inductions de l'expression n'atteignent jamais les niveaux observés suite aux expositions au Cd seul. Le même commentaire pourrait être fait pour le gène *gstp* (glutathion transférase

Pi). Pour ce gène, après 3 jours d'exposition, on observe une induction de l'expression mais entre les vers exposés aux différentes concentrations de Pb, aucune différence significative n'est observée.

Pour les expositions réalisées avec le Cd et le Pb en mélange, des variations d'expressions sont principalement observées pour les vers exposés aux mélanges réalisés avec la concentration de Cd la plus élevée (10 mg/kg). Le gène *Cd-mt* présente sans doute le profil d'expression le plus intéressant à commenter des 6 gènes étudiés: la relation entre concentration de Pb en mélange avec 5mg/kg de Cd dans les sols et induction de ce gène est parallèle après 10 jours d'exposition et les niveaux observés sont plus élevés qu'en conditions monométalliques. Une augmentation de l'expression du gène est également reportée entre 250 et 500 mg/kg de Pb pour les mélanges réalisés avec 10 mg/kg de Cd, toujours après 10 jours d'exposition.

De l'ensemble de ces résultats, le candidat qui montre les variations d'expression génique les plus importantes est donc *Cd-mt* qui présente une induction de son niveau d'expression lors des expositions au Cd seul ou en mélange et pourrait être utilisé comme biomarqueur d'exposition au Cd. Enfin, aucun lien entre variation d'expression de gènes liés aux systèmes antioxydants et génotoxicité ne semble pouvoir être établi dans ce travail sauf pour l'expression de *Cd-mt* qui augmente en fonction de la quantité de Cd accumulé par les vers. Rappelons que les dommages à l'ADN diminuent en fonction du temps malgré cette augmentation croissante de l'accumulation de Cd. Ce qui amène à considérer les deux hypothèses suivantes simultanément: (1) la Cd-MT a un rôle de protection vis-à-vis de la génotoxicité du Cd, probablement en chélatant ce métal qui est alors moins disponible pour exercer ces effets toxiques; (2) les mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place au cours du temps, et une étude au niveau transcriptionnel de ces mécanismes pourrait permettre d'étudier la cinétique de mise en place de ces mécanismes.

5) Conclusion

De l'ensemble de ces résultats nous retiendrons que le Cd est génotoxique pour *E. fetida* et apparemment pas le Pb. Les mécanismes de réparation prennent en charge les dommages à l'ADN induit par le Cd et cette réparation apparaît complète après 56 jours d'exposition. Deux mécanismes principaux peuvent généralement expliquer la génotoxicité du Cd: (1) la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via des réactions de type Fenton et Haber-Weiss, (2) l'inhibition des mécanismes de réparation de l'ADN.

En ce qui concerne les résultats des mesures d'expression génique, les candidats impliqués dans le stress oxydatif montrent peu de variations significatives lors de nos conditions expérimentales. Seul *Cd-mt* montre une induction de son niveau d'expression lors des expositions au Cd seul ou en mélange et peut être utilisé comme biomarqueur d'exposition au Cd. Enfin, aucun lien entre stress oxydatif et dommages à l'ADN n'a pu être mis en évidence dans cette étude. Une étude au niveau transcriptionnel de ce mécanisme pourrait permettre de déterminer l'existence possible d'un lien entre stress oxydatif et dommages à l'ADN.

Remerciements

Cette étude a été subventionnée par un co-financement ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) et Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Fabien B. est subventionné par une bourse doctorale de l'ADEME et du Conseil Régional du Nord/Pas-de-Calais.

References

- Albani J.R., Demuyneck S., Grumiaux F., Leprêtre A. (2003). Fluorescence fingerprintings of *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei*. Photochem. Photobiol. 9:165–173.
- Bernard, F., Brulle, F., Douay, F., Lemièrre, S., Demuyneck, S., Vandebulcke, F. (2010). Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in

Eisenia fetida, using an "exposure/depuration" experimental scheme with field soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73, 1034-1045.

Bernard F., Brulle F., Dumez S., Lemièrè S., Platel A., Nesslany F., Cuny D., Deram A., Vandebulcke F. Identification, cloning and gene expression study of the genes involved in oxidative stress in three soil ecotoxicology important test species. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, submitted.

Bertin G., Averbeck D. (2006). Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 88:1549–1559.

Brousseau P., Fugère N., Bernier J., Coderre D., Nadeau D., Poirier G., Fournier M. (1997). Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biol. Biochem.* 29:681–684.

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 C., Vieau D., Lemièrè S., Leprêtre A., Vandebulcke F. (2006). Cloning and Real-Time PCR testing of 14 potential biomarkers in *Eisenia fetida* following cadmium exposure. *Environ. Sci. Technol.* 40:2844–2850.

Brulle F., Mitta G., Leroux R., Lemièrè S., Leprêtre A., Vandebulcke F. (2007). The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: a trade-off mechanism? *Comp. Biochem. Phys. C.* 144:334–341.

Brulle F., Cocquerelle C., Wamalah A.N. Morgan A.J., Kille P., Leprêtre A., Vandebulcke F. (2008a). cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida; Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. *Ecotox. Environ. Safe.* 71:47–55.

Brulle F., Lemièrè S., Waterlot C., Douay F., Vandebulcke F. (2011). Gene expression analysis of 4 biomarker candidates in *Eisenia fetida* exposed to an environmental metallic trace elements gradient: A microcosm study. *Science of Total Environment.* 409:5470–5482.

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. *J Soils Sediments* 7 (4) 232–239.

Chabicoovsky M., Niederstätter H., Thaler R., Hödl E., Parson W., Rossmannith W., Dallinger R. (2003). Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 190:25-36.

- Demuyneck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Descamps M., Leprêtre A. (2005). Metallothionein response following cadmium and zinc exposures in *Eisenia fetida*. SETAC Europe, 15th annual meeting, 22-26 May 2005, Lille.
- Demuyneck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Leprêtre A. (2006). Metallothionein response following cadmium exposure in the oligochaete species *Eisenia fetida*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. 144(1):34-46.
- Demuyneck S., Grumiaux F., Mottier V., Schikorski D., Lemièrè S., Leprêtre A. (2007). Cd/Zn exposure interactions on metallothionein in response in *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Comp. Biochem. Phys. C*. 145:658–668.
- Di Marzio W.D., Saenz M.E., Lemièrè S., Vasseur P. (2005). Improved single-cell gel electrophoresis assay for detecting DNA damage in *Eisenia foetida*. *Environ Mol Mutagen*. 46(4):246–52.
- Dominguez, J. (2004). State of the art and new perspectives on vermicomposting research. In *Earthworm Ecology*; CRC Press: Boca Raton, FL, 2004; pp 401-424.
- Fourié F., Reinecke S.A., Reinecke A.J. (2007). The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the Comet assay. *Ecotoxicol Environ Saf*. 67(3):361–8.
- Galay-Burgos M., C. Winters, Sturzenbaum S.R., Randerson P.F., Kille P., Morgan A.J. (2005). Cu and Cd effects on the earthworm *Lumbricus rubellus* in the laboratory: multivariate statistical analysis of relationships between exposure, biomarkers, and ecologically relevant parameters. *Environmental Science & Technology* 39:1757-1763.
- 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 foetida*. *European Journal of Biochemistry*. 267:573-582.
- Heikens A., Peijnenburg W. J. G. M., Hendriks A.J. (2001). Bioaccumulation of heavy metal in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution*. 113:385-393.
- Hendawi M., Sauvé S., Ashour M., Brousseau P., Fournier M. (2004). A new ultrasound protocol for extrusion of coelomocyte cells from the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59:17-22
- Henkler F., Brinkmann J., Luch A. (2010). The role of oxidative stress in carcinogenesis induced by metals and xenobiotics. *Cancers* 2:376–396.

Hertel-Aas T., Oughton D.H., Jaworska A., Brunborg G. (2011). Induction and repair of DNA strand breaks and oxidised bases in somatic and spermatogenic cells from the earthworm *Eisenia fetida* after exposure to ionising radiation. *Mutagenesis*. 26(6):783-93.

Hopkin S.P. (1995). Deficiency and excess of essential and non-essential metals in terrestrial insects. In: Harrington, R., Stork, N.E. (Eds.), *Insects in a Changing Environment*. Academic press, London, pp. 251-270.

Janssens T.K.S., Del Rio Lopez R., Mariën J., Timmermans M.J.T.N., Montagne-Wajer K., VanStraalen N.M., Roelofs D. (2008). Comparative population analysis of metallothionein promoter alleles suggests stress-induced micro-evolution in the field. *Environ. Sci. Technol.* 42:3873–3878.

Jeantet A.Y., Ballan-Dufrançais C., Anglo A. (1997). Pollution par les métaux et atteintes cytologiques chez les bivalves marins. In *Biomarqueurs en écotoxicologie*, 14:315-353, Lagadic L., Caquet T., Amiard J.C., Ramade F., eds Masson, Paris.

Klaassen C.D., Liu J., Choudhuri S. (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 39:267-294.

Labrot F., Ribera D., Saint-Denis M., Narbonne J.F. (1996). *In vitro* and *in vivo* studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, acetylcholinesterase, catalase and glutathione peroxidase activities in three non-mammalian species. *Biomarkers* 1:21–28.

Lanno R., Wells J., Conder J., Bradham K., Basta N. (2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 57:39–47.

Laszczyca P., Augustyniak M., Babczynska A., Bednarska K., Kafel A., Migula P., Wilczek, G., Witas I. (2004). Profiles of enzymatic activity in earthworms from zinc, lead and cadmium polluted areas near Olkusz (Poland). *Environ. Int.* 30:901–910.

Lemièrre S., Cossu-Leguille C., Chaty S., Rodius F., Bispo A., Jourdain M. J., Lanhers M. C., Burnel D., Vasseur P. (2004). Genotoxic and CYP1A enzyme effects consecutive to the food transfer of oil spill contaminants from mussels to mammals. *Aquat. Living Resour.* 17:303-307.

Li L., Zhou D.-M., Wang P., Luo X.-S. (2008). Subcellular distribution of Cd and Pb in earthworm *Eisenia fetida* as affected by Ca²⁺ ions and Cd–Pb interaction, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71(3):632–637

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* 74:621–625.

Liang S.-H., Chen S.-C., Chen C.-Y., Kao C.-M., Yang J.-I., Shieh B.-S., Chen J.-H., Chen C.-C. (2011). Cadmium-induced earthworm metallothionein-2 is associated with metal accumulation and counteracts oxidative stress. *Pedobiologia* 54:333–340.

Liu J., Kershaw W.C., Klaassen C.D. (1992). Protective effects of zinc on cultured rat primary hepatocytes to metals with low affinity for metallothionein. *Journal of Toxicology & Environmental Health* 35:51-62.

Lock K., Janssen C. R. (2001). Zinc and cadmium body burden in terrestrial oligochaetes: use and significance in environmental risk assessment. *Environmental Toxicologic Chemistry*. (20):2067-2072.

Lukkari T., Aatsinki M., Väisänen A., Haimi J. (2005). Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Applied Soil Ecology* 30:133-146.

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(1):63-68

Manier, N., Deram, A., Broos, K., Denayer, F.O., Wan Haluwyn, C. (2009). White clover modulation index in heavy metal contaminated soils- A potential bioindicator. *Journal of Environmental Quality* 38, 685-692.

Manier, N., Brulle, F., Le Curieux, F., Vandebulcke, F., Deram, A. (2012). Biomarker measurements in *Trifolium repens* and *Eisenia fetida* to assess the toxicity of soil contaminated with landfill leachate: A microcosm study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80:339–348.

Morgan J.E., Morgan A.J. (1988). Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils. *Environmental Pollution* 54:123-138.

Morgan J.E., Morgan A.J. (1998). The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from an unpolluted and a metal-contaminated site. *Environ. Pollut.* 99:167–175.

Morgan A.J., Kille P., Stürzenbaum S.R. (2007). Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental Science & Technology*, 41, 1085-1096

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) (1984). OECD guideline for testing chemicals. Section 2: effects on biotic systems, Method, 207, Earthworm, acute toxicity tests, Paris, France, 207 pp.

Palmiter R.D. (1998). The elusive function of metallothioneins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:8428-8430.

Ricketts H.J., Morgan A.J., Spurgeon D.J., Kille P. (2004). Measurement of annetocin gene expression: a new reproductive biomarker in earthworm ecotoxicology. *Ecotox. Environ. Safe*. 57:4–10.

Rozen A. (2006). Effect of Cd on life history parameters in *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae:Oligocheta) populations originating from forests differently polluted with heavy metals. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 489-503

Sauvé S., Fournier M. (2005). Age-specific immune competence of the earthworm *Eisenia andrei*: exposure to methyl-mercury chloride. *Ecotox. Environ. Safe*. 60:67–72.

Schell L.M., Burnitz K.K., Lathrop P.W. (2010). Pollution and human biology. *Ann. Human Biol.* 37:347–366.

Sharma P., Dubey R.S. (2005). Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17:35–52.

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. *Ecotox. Environ. Safe*. 35:86–95.

Spurgeon D.J., Hopkin S.P. (1999b). Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Appl. Soil Ecol.* 11:227–243.

Stürzenbaum S.R., Winters C., Galay M., Morgan A.J., Kille P. (2001). Metal ion trafficking in earthworms identification of a cadmium-specific metallothionein. *J. Biol. Chem.* 276:34013–34018.

Tice R.R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., et al. (2000). The single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 35:206–221.

Timmermans M.J.T.N., Ellers J., Roelofs D., Van Straalen N.M. (2005). Metallothionein mRNA expression and cadmium tolerance in metal-stressed and reference populations of the springtail *Orchesella cincta*. *Ecotoxicology*, 14, 727-739.

Van Hook R.I. (1974). Cadmium, lead, and zinc distributions between earthworms and soils: potentials for biological accumulation. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 12:509–512.

Veltman K., Huijbregts M.A.J., Vijver M.G., Peijnenburg W.J.G.M., Hobbelen P.H.F., Koolhaas J.E., vanGestel C.A.M., vanVliet P.C.J., Hendriks A.J. (2007). Metal accumulation in the earthworm *Lumbricus rubellus*. Model predictions compared to field data. *Environ. Pollut.* 146:428–436.

Verschaeve L., Gilles J., Schoeters J., Van Cleuvenbergen R., De Fre' 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., editors. *Organohalogen compounds 11*. Austria: Federal Environmental Agency; 1993. p. 213–216.

Wu B., Liu Z., Xu Y., Li D., Li M. (2012). Combined toxicity of cadmium and lead on the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 81:122–126.

**DISCUSSION GENERALE, CONCLUSIONS &
PERSPECTIVES**

Discussion générale

Au cours de ce projet de thèse, les deux outils utilisés sont: (1) la PCR en temps réel, pour quantifier les variations des niveaux d'expression de gènes codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif et (2) le test des comètes, pour évaluer les dommages à l'ADN causés par des expositions à des sols contaminés par du Cd et du Pb chez deux espèces importantes en écotoxicologie, *Trifolium repens* et *Eisenia fetida*. L'application de ces approches moléculaires en écotoxicologie a permis de mieux appréhender les mécanismes d'action des contaminants sur les organismes vivants.

Les profils d'expression génique représentent le premier niveau d'intégration entre les «stress» environnementaux et le génome qui, à travers la synthèse de protéines, conduit la réponse des organismes aux changements externes. L'analyse des changements dans l'expression génique est un outil puissant pour diagnostiquer l'existence d'un stress dans une population et pour analyser les mécanismes de réponse à un stress. Cet outil, utilisé chez *E. fetida* depuis 2006, est de plus en plus utilisé chez cette espèce. De plus, dans cette thèse, cet outil a été transposé chez *T. repens*, espèce pour laquelle un seul travail faisant appel à la quantification du niveau d'expression génique grâce à la PCR en temps réel a été répertorié (Evans *et al.*, 2012). A notre connaissance, les travaux portant sur l'étude du stress oxydatif au niveau transcriptionnel chez *T. repens* présentés dans ce manuscrit sont les premiers.

L'étude des gènes codant les principales familles de protéines impliquées dans le stress oxydatif chez *E. fetida* a pu être facilement mise en œuvre car ces effecteurs avaient été clonés et séquencés par notre équipe et les séquences étaient toutes disponibles (Brulle *et al.*, 2006). Au total, le niveau d'expression de 6 gènes ont été mesurés dans les cœlomocytes de vers exposés à des sols contaminés par Cd et du Pb (**Publication 5**). Cinq gènes (*cat*, *pcs*, *CuZnsod*, *gstp* et *gpx*) ont un niveau d'expression très faible et/ou proche de celui observé

chez les individus témoins; seul *Cd-mt* montre des variations significatives dans nos conditions expérimentales (**Tableau 3**). En effet, lors des expositions aux sols contaminés par du Cd, les individus montrent une induction de *Cd-mt* qui est corrélée à la quantité de Cd présente dans les animaux. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus lors de nos travaux précédents (Brulle *et al.*, 2006; 2007; 2008a; Bernard *et al.*, 2010). Selon Veltman *et al.* (2007), le Cd serait difficile à excréter et le principal mécanisme de défense semble être la séquestration du Cd par la Cd-MT. Ceci est en accord avec les mesures de teneurs métalliques qui montrent clairement une accumulation du Cd dans les animaux exposés. Le niveau d'expression n'est pas affecté par la présence de Pb dans le sol. Ce candidat peut donc être utilisé comme biomarqueur d'exposition au Cd et montre une spécificité certaine.

Tableau 3: Synthèse des résultats de l'étude de l'expression génique réalisée sur les coelomocytes d'*E. fetida* suite aux différentes expositions en conditions contrôlées (sols artificiellement contaminés)

Conditions expérimentales			Expression génique - observations		Commentaires
Sols témoins	Référence et OCDE	3, 10 et 56 jours	<i>Cd-mt</i>	OCDE ↑ après 3j et ↓ après 56j	3. Le transfert dans ces sols semble entraîner un léger stress chez les vers par rapport aux conditions d'élevage. 4. Le sol OCDE semble induire à long terme un stress chez les vers (56j d'exposition)
			<i>pcs</i>	↑ par rapport témoin élevage OCDE ↑ après 10j et ↓ après 56j	
			<i>cat</i>	↑ par rapport témoin élevage OCDE ↓ après 56j	
			<i>CuZnsod</i>	↓ par rapport témoin élevage OCDE ↓ après 56j	
			<i>gstp</i>	OCDE ↑ après 3 j et ↓ après 56j	
			<i>gpx</i>	OCDE ↑ après 3 j et ↓ après 56j	
			Sols artificiellement contaminés	[Cd] : 0-2,5-5-10-20 mg/kg	
<i>pcs</i>	3j : ↓ par rapport Réf sauf Cd 10 (↓) 10j : ↓ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Cd] 56j : ↓ mais pas de réelle ≠ avec Réf				
<i>cat</i>	↓ par rapport réf sauf Cd 10 10j et Cd 20 56j(↓) mais celle-ci est constante qq soit [Cd]				
<i>CuZnsod</i>	3 et 10j : ↓ par rapport Réf (sauf Cd 20 3j ↑) 56j : ↑ par rapport Réf sauf pour Cd 10 et 20				
<i>gstp</i>	3 et 10j : pas de ≠ avec Réf sauf Cd 20 10j (↑) 56j : ↑ par rapport témoin mais celle-ci est constante qq soit [Cd]				
<i>gpx</i>	3j, 10j et 56j : pas de ≠ avec Réf sauf Cd 10 10j (↓) et Cd 20 3j (↑)				
[Pb] : 0-250-500-1000-2000 mg/kg	3j : ↓ Pb 250 et ↑ Pb 1000 et 2000 10j : pas de ≠ avec Réf sauf Pb 1000 (↓) 56j : ↑ par rapport Réf mais celle-ci est constante qq soit [Pb]	4. Les effets significatifs sont surtout observés pour les concentrations en Pb les + élevées (500 et surtout 1000 et 2000 mg/kg) 5. Pas de profil signé de réponse, les gènes semblent répondre indépendamment 6. Les variations sont surtout observées après 3 et 10j d'exposition			
<i>pcs</i>	pas de ≠ avec Réf sauf Pb 2000 3j (↓) 3j : ↓ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] sauf Pb 2000 (↓) 10j : ↗ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] sauf Pb 2000 (↑) 56j : peu de ≠ avec Réf				
<i>cat</i>	3j : peu de ≠ avec Réf 10j : ↑ sauf Pb 250 56j : peu de ≠ avec Réf				
<i>CuZnsod</i>	3j : ↑ sauf pour Pb 1000, pas dépendante de [Pb] 10j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↘ Pb 250 et ↗ Pb 500) 56j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↘ Pb 250 et Pb 2000)				
<i>gstp</i>	3j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↑ maximale : Pb 500) 10j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↗ pour Pb 250 et Pb 2000) 56j : peu de ≠ avec Réf (↘) sauf Pb 1000 (↑)				
<i>gpx</i>	3j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↑ maximale : Pb 500) 10j : ↑ mais celle-ci n'est pas dépendante de [Pb] (↗ pour Pb 250 et Pb 2000) 56j : peu de ≠ avec Réf (↘) sauf Pb 1000 (↑)				

Tableau 3 (suite et fin)

Sols contaminés artificiellement	Mélanges Cd + Pb	[Cd] 5 + [Pb] 250-500- 1000 mg/kg	3, 10 et 56 jours	<i>Cd-mt</i>	Mélange avec Cd 5 3 et 56j : peu de ≠ avec Réf (sauf ↑ pour Pb 500 3j) Mélange avec Cd 5 10j : ↑ parallèle à ↗ [Pb] dans les mélanges Mélange avec Cd 10 3 et 56j : peu de ≠ avec Réf (sauf ↑ pour Pb 1000 56j) Mélange avec Cd 10 10j : ↗ et parallèle à ↗ [Pb] entre 250 et 500 mg/kg	3. Les effets significatifs sont surtout observés pour les mélanges avec la concentration en Cd la + élevée (10 mg/kg) sauf pour Cd-mt qui est le marqueur biologique dont la réponse est la plus intéressante dans le cadre des expositions aux mélanges Cd 5 et Cd 10
				<i>pcs</i>	Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf sauf ↓ pour Pb 500 3j Mélange avec Cd 10 3, 10 et 56 j : ↓ pour Pb 250 3j et 56j, Pb 500 3j et 10j et Pb 1000 3j	
				<i>cat</i>	Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf sauf 10j ↓ pour Pb 500 et ↑ Pb 1000 Mélange avec Cd 10 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf sauf Pb 500 : ↑ 3j et ↓ 10j	
				<i>CuZnsod</i>	Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : pas de ≠ avec Réf Mélange avec Cd 10 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf sauf après 56 j Pb 250 ↓ et Pb 1000 ↑	
				<i>gstp</i>	Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf (↘ sauf Pb 500 56j (↓)) Mélange avec Cd 10 3 j : peu de ≠ avec Réf (sauf Pb 1000 ↑) Mélange avec Cd 10 10 j : ↓, constante quel que soit [Pb] Mélange avec Cd 10 56 j : peu de ≠ avec Réf (sauf Pb 500 ↑)	
				<i>gpx</i>	3, 10 et 56j : peu de ≠ avec Réf sauf Pb 250 (↑ à 10j et ↓ à 56j)	

(Symboles utilisés, abréviations : → (ou =) comparable à ; ↗ induction non significative ; ↑ induction significative ; ↘ répression non significative ; ↓ répression significative ; ↗ augmentation ; ↘ baisse ; ≠ différence ; qq quelque ; tjrs toujours ; Réf référence ; *cat* = Catalase, *gpx* = Glutathione peroxidase, *gstp* = Pi glutathione transferase, *Cd-mt* = Cadmium metallothionein, *pcs* = Phytochelatin synthase, *CuZnsod* = Copper/Zinc superoxide dismutase.)

Chez *T. repens*, une seule publication utilisant la quantification de l'expression génique au moyen de la PCR en temps réel a été réalisée (*TrCKX2*; Evans *et al.*, 2012). Seule la séquence de *TrMT1B* (Ellison & White, 1996) étaient disponibles dans les banques de données (GenBank™). Nous avons donc fait un bilan des effecteurs protéiques impliqués directement ou indirectement dans le stress oxydatif chez les végétaux et avons essayé de cloner la totalité des gènes qui les codent. Ainsi, 10 gènes ont pu être clonés et séquencés. Parmi les 11 candidats disponibles, 4 ont pu être quantifiés en PCR en temps réel au niveau des feuilles (*TrMT1B*, *TrGPX7*, *TrAPX1* et *TrCAT5*) dans nos conditions expérimentales (**Tableau 4**). Lors des expositions de *T. repens* aux différents sols, *TrCAT5* et *TrGPX7* n'ont pas montré de variations significatives quels que soient la condition et le temps d'exposition (**Publication 3**). En ce qui concerne *TrAPX1*, le niveau d'expression de ce gène est induit à court terme chez les plantes exposés aux sols contaminés par du Cd. L'induction du gène pourrait être due à la présence d'espèces réactives de l'oxygène (EROs) générées par la présence de Cd dans les feuilles. Par conséquent, *TrAPX1* pourrait être utilisé comme biomarqueur d'exposition à court terme à des sols contaminés par du Cd. Cela mériterait peut-être des investigations complémentaires mais nous n'avons pas poussé plus en avant nos recherches sur un biomarqueur précoce supplémentaire. Plus intéressant nous semble-t'il, *TrMT1B* est également induit mais à long terme chez les plantes exposées aux sols contaminés par du Cd. Le niveau d'expression de *TrMT1B* augmente en fonction de la quantité de Cd accumulée dans les feuilles. Cette observation suggère que l'accumulation croissante du Cd dans les feuilles stimule l'induction *TrMT1B* afin de produire plus de MT1B et ainsi chélater les ions Cd²⁺.

Tableau 4: Synthèse des résultats de l'étude de l'expression génique réalisée sur les feuilles de *T. repens* suite aux différentes expositions en conditions contrôlées (sols artificiellement contaminés)

Conditions expérimentales			Expression génique - observations		Commentaires		
Sols témoins	OCDE	3, 10 et 56 jours	<i>TrCAT5</i>	OCDE ↓ à 56 j	Le sol OCDE semble induire à court terme un stress chez <i>T. repens</i> qui ne perdure pas à 56 j		
			<i>TrAPX1</i>	OCDE ↑ à 3j, ↓ à 56 j			
			<i>TrGPX7</i>	OCDE → réf			
			<i>TrMT1B</i>	OCDE ↑ à 3 et 10j, ↓ à 56 j			
Sols contaminés artificiellement	Expositions mono-métalliques	[Cd] : 0-2,5-5-10-20 mg/kg	3, 10 et 56 jours	<i>TrCAT5</i>	↓ Cd 2.5 10j, ↑ Cd 20	Variation quand forte dose	
				<i>TrAPX1</i>	↑ 3j en fonction ↗ [Cd], ↑ Cd 20 10j	Précocité <i>TrAPX1</i>	
				<i>TrGPX7</i>	→ réf sauf Cd 10 10j (↓) et Cd 20 3j (↑)	Peu de variation	
				<i>TrMT1B</i>	3j : ↑ Cd 20 10j : ↑ Cd 20 56j : ↑	Surexpression <i>TrMT1B</i> pour forte concentrations et 56 j : semble surexprimé lorsqu'atteinte d'une dose seuil	
	Sols contaminés artificiellement	[Pb] : 0-250-500-1000-2000 mg/kg	3, 10 et 56 jours	3, 10 et 56 jours	<i>TrCAT5</i>	→ réf, ↓ Pb 500 et Pb 1000 56 j	Pas de variation
					<i>TrAPX1</i>	→ réf, ↓ Pb 500 et Pb 1000 56 j	Pas de variation
					<i>TrGPX7</i>	→ réf, ↓ Pb 1000 56 j et ↗ Pb 2000 56 j	Pas de variation
					<i>TrMT1B</i>	3j : ↑ Pb 500 ↓ Pb 1000 10j : ↑ Pb 1000 et Pb 2000 56j : ↓ Pb 2000	Surexpression pour forte dose à moyen terme (10 j) : lien avec cytotoxicité
Mélanges Cd + Pb	[Cd] 5 + [Pb] 250-500-1000 mg/kg [Cd] 10 + [Pb] 250-500-1000 mg/kg	3, 10 et 56 jours	3, 10 et 56 jours	<i>TrCAT5</i>	↓ Cd 5 Pb 1000 56 j et Cd 10 Pb 250 10j, ↑ Cd 5 Pb 500 10j, Cd10 Pb 250 3j et Cd 10 Pb 1000 10j	1. Légère surexpression des enzymes impliquées dans le stress oxydant 2. Pour <i>TrMT1B</i> sous-expression quand présence de forte [Pb] (1000 mg/kg) ?	
				<i>TrAPX1</i>	↓ Cd 5 Pb 250 3j et Cd 5 Pb 1000 56j, ↑ à 3 j pour Cd 10 Pb		
				<i>TrGPX7</i>	↓ Cd 10 Pb 1000 10j, Cd 5 Pb 250 et Cd 5 Pb 1000 56 j		
				<i>TrMT1B</i>	↓ Cd 5 /Pbx à 56 j et Cd 5 Pb 1000, ↑ Cd 5 Pb 250 3j, Cd 5 Pb 500 10j et Cd 10 Pb 250		

(Symboles utilisés, abréviations : → (ou =) comparable à ; ↗ induction non significative ; ↑ induction significative ; ↓ répression non significative ; ↘ répression significative ; ↗ hausse ; ↘ baisse ; ≠ différence ; qq quelque ; tjrs toujours ; Réf référence ; *BolC.MTIC* = Méthionine, *BolC.GSTF2* = Glutathion transférase Phi, *BolC.GSTU19* = Glutathion transférase Tau, *BolC.GSTZ1* = Glutathion transférase Zéta, *BolC.PRXCB* = Peroxydase).

Cependant, selon Akashi *et al.* (2004) et Wong *et al.* (2004), les MTs peuvent être aussi impliquées dans la prise en charge des EROs. Par conséquent la présence de Cd en excès dans les feuilles pourrait aussi augmenter la production des EROs et donc induire *TrMT1B* afin de produire davantage de MT1B pour les prendre en charge. *TrMT1B* pourrait être utilisé comme biomarqueur d'exposition à long terme à des sols contaminés par du Cd. Ce dernier résultat est plutôt original et surprenant à la fois. En effet, ce sont plutôt les phytochélatines qui sont sollicitées dans la prise en charge de métaux tels que le Cd chez les plantes (Zenk, 1996; Cobbett & Goldsbrough, 2002). Ici, l'excès de Cd entraîne une induction significative d'un gène codant une MT dont le rôle principal chez les plantes est l'homéostasie et la tolérance au cuivre (Cobbett & Goldsbrough, 2002).

Les résultats obtenus lors des mesures des niveaux d'expression génique ont permis de sélectionner des biomarqueurs d'exposition potentiels chez nos deux espèces. Parmi ces biomarqueurs, on retrouve chez les deux espèces une isoforme appartenant aux métallothionéines. Ces résultats confortent le fait de pouvoir utiliser cette famille de protéine comme biomarqueur face à une contamination au Cd. Chez *T. repens*, nous avons deux biomarqueurs qui pourraient être utilisés en fonctions de la durée d'exposition à des matrices contaminées par du Cd: *TrAPXI* pour des expositions à court terme et *TrMT1B* pour des expositions à long terme.

Un travail similaire à celui réalisé chez *T. repens* (recherche de candidats impliqués dans le stress oxydatif, clonage et séquençage des candidats non disponibles dans les banques lorsque cela était possible) a également été entrepris chez *B.oleracea* dans le cadre du projet MarGeEn. Cependant, ces travaux ne seront pas présentés dans la cadre de la thèse mais feront l'objet d'une présentation dans les perspectives de ce mémoire.

Les cellules animales et végétales ont accumulé du Cd et la présence de ce métal dans la cellule peut être à l'origine de dommages à l'ADN. Pour cela, le test des comètes permet d'évaluer les dommages primaires à l'ADN dans des populations cellulaires individuelles. Dans la plupart des travaux faisant appel au test des comètes, les organismes étudiés sont exposés sur papier filtre (Annélides) ou en solutions hydroponiques (Fabaceae). Dans ce projet, les organismes étudiés sont exposés dans des sols naturels artificiellement contaminés par des métaux. Par conséquent, des conditions expérimentales plus réalistes, même s'il ne s'agit pas encore de sols contaminés collectés *in situ*. Nous avons employé la version alcaline du test des comètes car elle permet de mettre en évidence aussi bien les cassures double-brin que les cassures simple-brin ainsi que les sites alcali-labiles qui correspondent à de nettes cassures des brins au sein de l'ADN. De plus, l'électrophorèse réalisée en conditions alcalines est plus sensible lors d'expositions à de faibles doses de polluants. La mise en œuvre de ce test chez des modèles végétaux a nécessité de nombreuses mises au point. Le test des comètes appliqué aux vers de terre et aux végétaux est un outil précieux pour la surveillance environnementale et la détection des composés génotoxiques dans les écosystèmes terrestres. Nos résultats montrent l'intérêt de tester le pouvoir génotoxique d'un sol à la fois chez 2 espèces régulièrement utilisées en écotoxicologie. Les résultats obtenus montrent que les vers qui se nourrissent du sol dans lequel ils vivent et que le trèfle, fortement ancré dans le sol par le biais de ses racines, sont de bons indicateurs du potentiel génotoxique de contaminants présents dans le sol.

Lors des expositions au sol contaminé par la gamme de Cd, les résultats obtenus chez *E. fetida* et *T. repens* montrent des dommages à l'ADN significatifs chez les individus exposés pendant 3 et 10 j, ce qui confirme le caractère génotoxique du Cd. Entre les deux durées d'exposition, il est possible qu'un équilibre se soit installé entre la génération des dommages à l'ADN et leur réparation incomplète et complète. Après 56 j d'exposition, les dommages à

l'ADN sont moindres et proches de ceux mesurés chez les témoins. Ils peuvent se traduire par le fait que les mécanismes de réparation complète de l'ADN se sont mis en place entre 10 et 56 j d'exposition. En effet, lorsque des expositions de longue durée sont étudiées, le test des comètes permet également d'évaluer la réparation des dommages à l'ADN d'un point de vue quantitatif et qualitatif dans des populations cellulaires individuelles.

En ce qui concerne les expositions au sol contaminé par la gamme de Pb, aucun dommage significatif à l'ADN n'a été observé chez les 2 espèces. Le Pb n'apparaît pas comme un génotoxique ou plus précisément comme un agent clastogène pour *E. fetida*. Cette absence de génotoxicité pourrait s'expliquer (1) parce que le Pb n'est pas génotoxique, (2) parce que le tégument du ver de terre constitue une barrière gênant l'entrée du Pb et par conséquent n'engendrerait pas ou peu d'effets génotoxiques aux concentrations utilisées *in vivo* (de 250 à 2000 mg.kg⁻¹); notons que des tests *in vitro* ont été effectués qui montrent que les coelomocytes exposés ont ne présentent pas ou très peu de dommages à l'ADN détectable par le test des comètes (Lemière S., communication personnelle), (3) parce que le Pb présent dans la cellule n'atteint pas le noyau et donc n'exprime pas son caractère toxique vis-à-vis de l'ADN. En ce qui concerne *T. repens*, le Pb s'accumule peu dans les feuilles. La faible accumulation de Pb au niveau des feuilles pourrait être une stratégie de défense de la plante (mécanisme d'exclusion possible?). Ces résultats montrent l'importance de considérer la bioaccumulation d'un polluant et donc de déterminer sa biodisponibilité vis-à-vis d'une espèce avant d'aborder les questions portant sur son caractère génotoxique. Il est donc difficile de dire d'après nos résultats si Pb est génotoxique ou non pour *T. repens*.

Les dommages observés chez les deux espèces suite aux expositions aux différents mélanges Cd et Pb sont intermédiaires entre les cassures reportées suite aux deux différentes expositions monométalliques. Comme pour le Cd, une augmentation des dommages à l'ADN

est observée (plus élevée que dans le cas du Pb seul, et légèrement inférieure, parfois équivalente, aux résultats obtenus avec le Cd seul). Lors de ces co-expositions, les effets clastogènes du Cd apparaissent un peu atténués. Ceci pourrait s'expliquer (1) par la mise en place de mécanismes de défense contre les effets toxiques du Pb, qui protégerait également les individus contre la génotoxicité du Cd, (2) par des effets génotoxiques autres que clastogènes du Pb qui masquerait la génotoxicité du Cd (le Pb serait-il un agent pontant qui créerait des liaisons ADN-ADN ou ADN-protéine ? Ce type de dommages ralentirait la migration et rendrait donc le test des comètes inadapté pour visualiser la génotoxicité du Pb). Chez *T. repens*, le taux des dommages à l'ADN est nettement moindre par rapport à l'exposition au sol contaminé par 5 et 10 mg.kg⁻¹ de Cd quelle que soit la dose de Pb ajoutée.

Le test des comètes a également été réalisé chez *B. oleracea* mais dans le cadre du projet MarGeEn. Ainsi, les résultats obtenus ne sont pas développés dans ce mémoire.

E. fetida et *T. repens* montrent des tendances similaires en ce qui concerne les taux de dommages à l'ADN mesurés lors de nos expositions et semblent répondre de la même façon face au même stress. En revanche, si on observe les résultats obtenus lors des mesures d'expression génique, les deux espèces montrent des candidats différents et répondent aux stress de façon différente. En effet, chez *T. repens*, *TrAPXI* montre les perturbations les plus importantes lors des expositions de courte durée tandis que *TrMT1B* est affecté lors des expositions de longue durée. Chez *E. fetida*, *Cd-mt* montre les perturbations les plus importantes lors des expositions de moyenne et longue durée. Ainsi, ces deux espèces peuvent être utilisées de façon complémentaire et permettre ainsi une meilleure analyse en ce qui concerne les effets d'une contamination métallique sur les organismes vivants.

Conclusions

Le constat de fonctionnement/dysfonctionnement au niveau des écosystèmes et des communautés (animales/végétales) doit s'accompagner d'une compréhension des relations entre organismes et de la biologie d'espèces clés. Le but principal est d'identifier les causes de perturbation *in situ* (exposition) et éventuellement de dégager des moyens de remédiation efficaces compatibles avec le vivant. Une véritable approche écotoxicologique doit se fonder sur une approche intégrant les différents niveaux d'organisation (du moléculaire à l'écosystème) à plusieurs échelles spatiales et temporelles. Les indicateurs écologiques globaux (*e.g.* indices de diversité, indices biotiques, indices biologiques diatomiques, etc.) présentent l'avantage de donner une vision intégrée de l'état de santé de l'écosystème. Ils sont réalistes dans la mesure où ils intègrent une dimension temporelle, mais sont difficiles à mettre en œuvre avec une bonne «reproductibilité» et sont souvent utilisés pour un constat tardif des atteintes subies par les milieux.

L'étude de réponses biologiques des individus vis-à-vis d'un contaminant est très importante pour évaluer les risques d'effets délétères sur les organismes qui peuplent un écosystème. Ainsi, de nombreuses recherches en écotoxicologie se focalisent sur la mesure des traits d'histoire de vie, typiquement la mortalité, ainsi que sur les effets des contaminants sur la reproduction et la croissance. Depuis quelques années, les recherches réalisées à l'échelle infra-individuelle (du niveau moléculaire jusqu'à l'individu) se multiplient. Ces travaux permettent de mieux comprendre les atteintes directes des contaminants et les mécanismes de toxicité. Les changements observés constituent des biomarqueurs potentiels. C'est à ce niveau que se situe le travail réalisé au cours de cette thèse.

Les travaux menés ont contribué à réaliser une synthèse bibliographique des travaux au niveau moléculaire portant sur le stress oxydatif chez l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida* et la Fabaceae *Trifolium repens* lors d'expositions à des ETMs et/ou des polluants organiques

(hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides) afin de faire un état des lieux, 2- à transposer chez *T. repens* la méthode d'analyse des niveaux d'expression génique développée chez *E. fetida* (Brulle *et al.*, 2006), 3- à identifier des gènes dont les variations d'expression pourraient être indicatrices d'exposition métallique (biomarqueurs potentiels), 4- à évaluer les dommages à l'ADN grâce au test des comètes chez nos deux espèces exposées à un sol contaminé par des gammes de Cd et de Pb, seuls ou en mélange. Ces travaux ont été initiés sur la base de plusieurs constats, 1- le stress oxydatif est un état physiologique largement étudié chez beaucoup d'espèces mais qu'en est-il chez nos espèces étudiées?, 2- le manque de données génétiques concernant le stress oxydatif chez *T. repens*, espèces ubiquistes et importantes au niveau agronomique, 3- évaluer les potentiels génotoxiques de deux ETMs nocifs pour les organismes vivants et très répandus dans l'environnement naturel, le Cd et le Pb.

Les approches utilisées dans ce projet (test des comètes et étude de l'expression génique) ont permis d'étudier au niveau infra-individuel les effets d'une exposition à des ETMs chez deux espèces de niveaux trophiques différents vivants en contact étroit avec le sol. Le test des comètes permet d'évaluer les dommages à l'ADN au niveau cellulaire avec notamment la mise en évidence de cassures au niveau des brins d'ADN. La PCR en temps réel permet de mesurer au niveau moléculaire les variations d'expressions de gènes cibles codant des protéines impliquées dans le stress oxydatif, état physiologique dans lequel peuvent se retrouver les organismes exposés à des ETMs. Le but de ce projet était de déterminer s'il existait un lien entre stress oxydatif et dommages à l'ADN. Ces deux méthodes complémentaires permettant d'observer les effets d'une exposition métallique à deux niveaux infra-individuels différents n'ont pas permis de mettre en évidence de lien potentiel entre stress oxydatif et dommages à l'ADN lors de ces conditions d'expérimentations. Cependant, une étude des mécanismes de réparation de l'ADN au niveau moléculaire (transcriptome)

pourrait apporter un complément de réponse à notre question concernant le lien potentiel entre stress oxydatif et dommages à l'ADN.

Les deux espèces utilisées dans ce projet peuvent aussi être utilisées de manière complémentaire. En effet, *E. fetida* et *T. repens* vivent en contact étroit avec le sol (tégument et tube digestif pour *E. fetida* et racines et stolons pour *T. repens*) et les deux méthodes ont été appliquées sur les coelomocytes d'*E. fetida* et les feuilles de *T. repens*. Le choix des tissus est justifié: les coelomocytes sont les cellules immunitaires circulantes dans la cavité coelomique présente autour du tube digestif et sont impliquées dans la défense d'*E. fetida* vis-à-vis de stress biotiques et abiotiques; les feuilles ont été choisies chez *T. repens* car les racines présentent des nodules (symbiose racines – bactéries du genre *Rhizobium*) et un risque de contamination du matériel végétal par le symbionte est important lors de l'application des deux méthodes. En ce qui concerne le test des comètes, *E. fetida* et *T. repens* montrent des réponses similaires. Néanmoins, *T. repens* montrent des taux de dommages à l'ADN beaucoup plus importants qu'*E. fetida*. Les résultats obtenus lors des mesures d'expression génique montrent que seul *Cd-mt* montre des variations significatives chez *E. fetida* lors d'une exposition au sol contenant du Cd (seul et mélanges Cd/Pb). Chez *T. repens*, *TrMT1B* montre des variations significatives après une exposition longue durée (56 j) tandis que *TrAPX1* montre des variations significatives après une exposition courte durée (3 j) à un sol contaminé par du Cd. Des informations plus complètes sont obtenues si on exploite les résultats chez les deux espèces plutôt qu'une exploitation des résultats espèce par espèce. Dans ce cas, *E. fetida* et *T. repens* peuvent être utilisés de manière complémentaire et permettre ainsi un meilleur diagnostique concernant la dangerosité des contaminants testés.

Perspectives

Suite aux résultats obtenus lors de ce projet, plusieurs pistes sont envisageables. Tout d'abord, le test des comètes a révélé lors de nos études qu'il y avait une mise en place de mécanismes de réparation après 10 j d'exposition chez *E. fetida* et *T. repens*. Cependant, nous n'avons aucune idée sur le temps de la mise en place de ces mécanismes puisque des dommages à l'ADN sont encore observables après 10 j d'exposition et la plupart des noyaux observés après 56 j d'exposition ne sont pas ou peu endommagés. L'investigation de temps d'exposition entre 10 et 56 j pourrait permettre d'identifier et d'explorer le moment auquel la mise en place de la réparation a lieu. Puisque des mécanismes de réparation de l'ADN se mettent en place au cours du temps, un travail au niveau transcriptionnel réalisé à travers l'étude des gènes codant les enzymes de réparation pourrait s'avérer informatif.

Nous avons étudié le stress oxydatif au niveau transcriptionnel afin de voir les effets des ETMs sur ce système. Ce choix se justifie par le fait que (1) un des principaux facteurs de dommages à l'ADN est la présence en excès d'EROs; (2) le niveau moléculaire est le niveau d'organisation d'un écosystème qui est affecté en premier lieu; (3) le stress oxydatif est un état physiologique très étudié dans la plupart des organismes et donc beaucoup de résultats sont disponibles; (4) les protéines qui sont fréquemment étudiées (ex: CATs, SODs, peroxydases,...) sont relativement conservées entre les différentes espèces, ce qui permet de les obtenir assez facilement et de pouvoir les étudier dans nos modèles. Malgré cela, il s'est avéré que le niveau d'expression des principales protéines impliquées dans le stress oxydatif n'est pas perturbé par la présence d'ETMs dans nos conditions expérimentales (sauf *TrAPXI*). En revanche, les gènes *Cd-mt* et *TrMT1B*, codant une métallothionéine (MT) respectivement chez *E. fetida* et chez *T. repens*, montrent des variations significatives dans nos conditions expérimentales. Le rôle principal des MTs est la prise en charge de métaux chez les animaux mais certaines isoformes peuvent aussi prendre en charge des EROs chez les animaux et les

végétaux (Anderson *et al.*, 1999; Akashi *et al.*, 2004). Ces protéines sont principalement impliquées dans des mécanismes tels que la détoxification des métaux. L'étude d'autres voies métaboliques (ex: photosynthèse chez les végétaux, nutrition) pourrait permettre de découvrir de nouveaux candidats plus sensibles à une contamination métallique qui pourrait être sélectionnés comme biomarqueurs d'exposition.

Les expositions des organismes ont été réalisées sur un sol naturel artificiellement contaminé par du Cd et du Pb. Ces conditions expérimentales sont réalistes comparées à celles classiquement utilisées dans ce type d'étude (ex: papier filtre, cultures hydroponiques, ...). Cependant, une exposition sur des sols naturels contaminés collectés *in situ* devrait être réalisée dans l'optique d'une évaluation de l'impact des ETMs en conditions encore plus proches de la réalité.

Enfin, dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes focalisés sur deux espèces de niveaux trophiques différents, *T. repens* (producteur primaire) et *E. fetida* (détritivore). Dans le cadre du projet MarGeEn, *B. oleracea* a également été étudiée. Les mêmes approches que celles appliquées chez *E. fetida* et *T. repens* ont été utilisées. Le choix de cette plante se justifie par le fait que (1) c'est une espèce d'intérêt agronomique (banque de données moléculaires disponible), (2) elle est utilisée en surveillance de la qualité de l'air (VDI, 2000) et (3) elle fait partie des Brassicaceae, famille pour laquelle plusieurs espèces sont utilisées dans les études de phytoremédiation (ex: *Brassica juncea*, *Arabidopsis halleri*). Le travail chez cette espèce est bien avancé. Les principaux résultats obtenus lors du projet MarGeEn sont résumés dans les **tableaux 5** (test des comètes) et **6** (quantification de l'expression génique). Les résultats obtenus sont différents de ceux obtenus chez *E. fetida* et *T. repens*.

Tableau 5: Synthèse des résultats du test des comètes réalisés chez *B. oleracea*.

Conditions expérimentales		Génotoxicité - observations	Mesures complémentaires		
Sols témoins	Référence, OCDE, Terreau et Sol Agricole	3 et 10 jours	Comètes + faibles avec OCDE	Pas de bioaccumulation	
	Référence et OCDE	3, 10 et 56 jours	Comètes + faibles avec OCDE	Pas de bioaccumulation	
Sols contaminés artificiellement	Expositions mono-métalliques	[Cd] : 0-2,5-5-10-20 mg/kg	3, 10 et 56 jours	Pas d'effet génotoxique significatif.	↗ Cd racinaire avec le temps et la quantité dans le sol. ↗ Cd parties aériennes avec le temps.
		[Pb] : 0-250-500-1000-2000 mg/kg		Effets très faibles et non significatifs.	Pas d'accumulation ni de transferts vers les parties aériennes.
	Mélanges Cd + Pb	[Cd] 5 + [Pb] 250-500-1000 mg/kg [Cd] 10 + [Pb] 250-500-1000 mg/kg	3, 10 et 56 jours	Effets très faibles et non significatifs.	Accumulation du Cd dans les racines assez proche des expositions avec Cd seul. Accumulation dans PA plus faibles.

(Symboles utilisés, abréviations: → (ou =) comparable à; ↗ augmentation; ↘ diminution; ≠ différence; n.s. observation non significative)

Tableau 6: Synthèse des résultats d'expression génique pour *B. oleracea*

Conditions expérimentales			Expression génique - observations		Commentaires	
Sols témoins	Référence et OCDE	3, 10 et 56 jours	<i>BolC.MT1C</i>	OCDE ↓ après 10j	5. Le sol OCDE semble induire à moyen terme un stress chez les choux (10j d'exposition)	
			<i>BolC.GSTF2</i>	OCDE → Réf		
			<i>BolC.GSTU1</i> 9	OCDE ↗ après 10 j et ↑ après 56j		
			<i>BolC.GSTZ1</i>	OCDE ↑ après 10j		
			<i>BolC.PRXCB</i>	OCDE → Réf, ↗ 10 j		
Sols contaminés artificiellement	Expositions mono-métalliques	3, 10 et 56 jours	<i>BolC.MT1C</i>	3j : ↑ Cd 10 et Cd 20 10j et 56 j : ↓ sauf Cd 20 10j (↑)	7. Les variations significatives sont principalement observées après 3 et 56j d'exposition 8. Les réponses ne semblent pas dépendre de la [Cd] mais de la présence de Cd dans le sol	
			<i>BolC.GSTF2</i>	3j : ↓ Cd 5 et Cd 10, ↑ Cd 20 10j : pas de réelle ≠ avec Réf sauf Cd 2.5 (↑) et Cd 5 (↘) 56j : ↑ Cd 2.5 et Cd 5		
			<i>BolC.GSTU1</i> 9	pas de réelle ≠ avec Réf sauf Cd 10 3j (↑)		
			<i>BolC.GSTZ1</i>	3j : ↑ Cd 2.5 et Cd 20, ↗ Cd 10 et ↓ Cd 5 10j : pas de réelle ≠ avec Réf sauf Cd 5 (↓) 56j : ↗ sauf Cd 20 (↘)		
			<i>BolC.PRXCB</i>	3j : ↗ sauf Cd 5 (↘) 10j : ↑ Cd 10 56j : ↓ Cd 2.5 et Cd 10		
	[Cd] : 0-2,5-5-10-20 mg/kg	3, 10 et 56 jours	<i>BolC.MT1C</i>	3j : ↓ Pb 1000 et ↑ Pb 2000 10j : pas de réelle ≠ avec Réf sauf Pb 1000 (↑) 56j : ↑ Pb 500 et Pb 1000		7. Les effets significatifs sont surtout observés pour les concentrations en Pb les + élevées (500 et surtout 1000 et 2000 mg/kg) 8. Pas de profil signé de réponse, les gènes semblent répondre indépendamment 9. Les variations sont surtout observées après 3j d'exposition
			<i>BolC.GSTF2</i>	3j : ↓ sauf Cd 20 (↑) 10j ↑ Pb 250 et Pb 1000 56j : pas de ≠ avec Réf sauf Pb 1000 (↑)		
			<i>BolC.GSTU1</i> 9	3j : ↑ Pb 2000 10j : ↑ sauf Pb 2000 (↘) 56j : ↑ Pb 500 et Pb 1000		
			<i>BolC.GSTZ1</i>	3j : ↑ Pb 250, ↓ Pb 500 et Pb 1000 10j : pas de réelle ≠ sauf Pb 500 (↑) 56j : ↑ sauf Pb 500 (↗)		
			<i>BolC.PRXCB</i>	3j : ↓ Pb 500 et Pb 1000 10j : ↑ Pb 1000 56j : ↗ sauf Pb 250 (↓)		
Mélanges Cd + Pb	[Cd] 5 + [Pb] 250-500-1000 mg/kg	3, 10 et 56 jours	<i>BolC.MT1C</i>	Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56j : ↓ Cd 5 Pb 250 (10j et 56j) et Cd 5 Pb 1000 10 j, ↑ Cd 5 Pb 1000 56j Mélange avec Cd 10 3 et 10j : ↑ par rapport Réf mais celle-ci est constante qq soit [Cd] Mélange avec Cd 10 56j : ↓ Cd10 pb 1000 56j	5. Les effets significatifs sont surtout observés pour les mélanges avec la concentration en Cd la + élevée (10 mg/kg)	

[Cd] 10 +
[Pb] 250-500-
1000 mg/kg

<i>BolC.GSTF2</i>	Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf sauf pour Cd 5 Pb 250 10 j et Cd 5 Pb 1000 10j (↑) et Cd 5 Pb 250 56j (↓) Mélange avec Cd 10 3, 10 et 56 j : ↑ après 3 j et ↓ après 10 et 56 j
<i>BolC.GSTU19</i>	Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : peu de ≠ avec Réf Mélange avec Cd 10 3, 10 et 56 j : ↑ 10 j, Cd 10 Pb 250 3j et Cd 10 Pb 500 3j
<i>BolC.GSTZ1</i>	Mélange avec Cd 5 3, 10 et 56 j : ↓ 3 j (Cd 5 Pb 250 et Cd 5 Pb 1000) et ↑ Cd 5 Pb 250 10j Mélange avec Cd 10 3, 10 et 56 j : ↑ 3 j et 10 j (Cd 10 Pb 250 et Cd 10 Pb 500) et ↓ Cd 10 Pb 1000 10j et Cd 10 Pb 250 56j Mélange avec Cd 5 3j : → Réf
<i>BolC.PRXCB</i>	Mélange avec Cd 5 10 et 56 j : ↑ 10 j et Cd 5 Pb 250 56 j Mélange avec Cd 10 3 et 56 j : → Réf sauf Cd 10 Pb 250 (↘) Mélange avec Cd 10 10 j : ↑, constante quelque soit [Cd 10 Pb]

6. *BolC.MT1C*, *BolC.GSTU19* et *BolC.PRXCB* semblent être de bon biomarqueurs lors d'une exposition de 10 j à des mélanges contenant 10 mg/kg de Cd

(Symboles utilisés, abréviations : → (ou =) comparable à ; ↗ induction non significative ; ↑ induction significative ; ↘ répression non significative ; ↓ répression significative ; ↗ hausse ; ↘ baisse ; ≠ différence ; qq quelque ; tjrs toujours ; Réf référence ; *BolC.MT1C* = Métallothionéine, *BolC.GSTF2* = Glutathion transférase Phi, *BolC.GSTU19* = Glutathion transférase Tau, *BolC.GSTZ1* = Glutathion transférase Zéta, *BolC.PRXCB* = Peroxydase).

Sans multiplier à l'infini les espèces tests, l'utilisation d'un organisme supplémentaire permet une meilleure évaluation de l'impact des ETMs, une interprétation plus précise et plus adaptée à un diagnostic environnemental. Cependant, il faut bien cibler les espèces à étudier car le fait d'avoir plusieurs espèces alourdit considérablement les conditions d'expérimentation et les coûts.

LISTE DES PUBLICATIONS

Articles publiés

Bernard, F., Brulle, F., Douay, F., Lemièrre, S., Demuynck, S., Vandebulcke, F., 2010. Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in *Eisenia fetida*, using an "exposure/depuration" experimental scheme with field soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73:1034–1045.

Bernard F., Brulle F., Dumez S., Lemiere S., Platel A., Nessler F., Cuny D., Deram A. & Vandebulcke F. Identification, cloning and gene expression study of the genes involved in oxidative stress in three soil ecotoxicology important test species. *En soumission*.

F. Brulle, **F. Bernard**, F. Vandebulcke, D. Cuny & S. Dumez. How to identify suitable real-time PCR reference genes in a dedicated species: Example in leaves of *Brassica oleracea*. *En soumission*.

Bernard F., Dumez S., Brulle F., Lemièrre S., Platel A., Nessler F., Cuny D., Deram A. & Vandebulcke F. Oxidative stress molecular analysis in *Trifolium repens* and *Brassica oleracea* exposed to Cd and Pb. *En soumission*.

Lanier C., **Bernard F.**, Dumez S., Leclercq J., Lemièrre S., Vandebulcke F., Nessler F., Platel A., Devred I., Cuny D., Deram A. DNA damage, Ascorbate and Guaiacol peroxidase activity in *Trifolium repens* in response to trace element stress. *En soumission*.

Lemièrre S., **Bernard F.**, Brulle F., Dumez S., Platel A., Nessler F., Cuny D., Deram A. & Vandebulcke F. DNA damage and oxidative stress molecular analysis in *Eisenia fetida* exposed to Cd and Pb. *En rédaction*.

Participation à des conférences

Bernard F., Brulle F., Douay F. & Vandebulcke F. *Mesure de l'expression génique de candidats biomarqueurs de pollution métallique chez les Annélides Oligochètes*. Congrès National de la Recherche dans les IUT, LILLE 8 au 11 juin 2009. **Communication affichée.**

Bernard F., Brulle F., Douay F., Lemièrre S., Demuyne S., Leprêtre A. & Vandebulcke F. *Metallic Trace Elements body burden and gene expression analysis of biomarker candidates in Eisenia fetida, during an "intox-detox" protocol performed with field soils*. SETAC Europe 19th Annual Meeting, GÖTEBORG (SUEDE), 31 mai au 4 juin 2009. **Communication affichée.**

Bernard F., Deram A. & Vandebulcke F. *Intérêt et validation de marqueurs de génotoxicité environnementale*. Journées Recherche SFUPS ADEME, ANGERS 13 et 14 Janvier 2011. **Communication orale.**

Bernard F. *Intérêt et validation de marqueurs de génotoxicité environnementale*. Journées doctorants ADEME, PARIS 10 et 11 février 2011. **Communication affichée.**

Bernard F., Deram A., Lemièrre S., Cuny D. & Vandebulcke F. *Intérêt et validation de marqueurs de génotoxicité environnementale*. Journée IRePSE, LILLE 18 Mars 2011. **Communication orale.**

Bernard F., Lemièrre S., Cuny D., Vandebulcke F. & Deram A. *Marqueurs de génotoxicité environnementale pour l'évaluation de la qualité des sols - Premiers résultats du programme MarGeEn (Anses, ADEME)*. Colloque SEFA, PARIS 22 juin 2011. **Communication orale.**

Bernard F., Lemière S., Cuny D., Vandebulcke F. & Deram A. *Sensibilité du test des comètes pour la mise en évidence de la génotoxicité des contaminations des sols en faibles doses*. Colloque IRENI, DOUAI 8 juillet 2011. **Communication affichée.**

Bernard F., Deram A., Lemière S., Cuny D. & Vandebulcke F. *Intérêt et validation de marqueurs de génotoxicité environnementale: présentation des premiers résultats*. Journée IRePSE, LILLE 16 Mars 2012. **Communication orale.**

S. Lemière, M. Delattre, J. Leclercq, F. Ocelli, **F. Bernard**, S. Dumez, F. Nesslany, A. Platel, D. Cuny, A. Deram & F. Vandebulcke. *Génotoxicité environnementale du cadmium et du plomb, seuls ou en mélange, en sol naturel, pour le ver *Eisenia fetida**. Colloque SEFA, LYON Juillet 2012. **Communication affichée.**

Bernard F., Lemière S., Cuny D., Vandebulcke F. & Deram A. *Sensibilité du test des comètes et de la mesure de l'expression de gènes cibles pour la mise en évidence de la génotoxicité des contaminations des sols en faibles doses*. Colloque IRENI, DUNKERQUE 23 novembre 2012. **Communication affichée.**

F. Bernard, S. Lemiere, S. Dumez, F. Brulle, C. Cocquerelle, A. Platel, F. Nesslany, D. Cuny, A. Deram & F. Vandebulcke. *Gene expression analysis of the genes involved in oxidative stress to explain DNA damages in organisms exposed to cadmium/lead contaminated soils*. SETAC Europe 23rd Annual Meeting, GLASGOW (ECOSSE), 12 au 16 Mai 2013. **Communication affichée.**

S. Lemière, M. Delattre, J. Leclercq, **F. Bernard**, S. Dumez, F. Nessler, A. Platel, D. Cuny, A. Deram & F. Vandebulcke. *Environmental genotoxicity of cadmium and/or lead in natural soil, for the earthworm, Eisenia fetida*. SETAC Europe 23rd Annual Meeting, GLASGOW (ECOSSE), 12 au 16 Mai 2013. **Communication affichée.**

A. Deram, **F. Bernard**, S. Dumez, C. Lanier, S. Lemière, A. Platel, F. Nessler, F. Vandebulcke & D. Cuny. *Higher plants to assess the genotoxicity of soil*. SETAC Europe 23rd Annual Meeting, GLASGOW (ECOSSE), 12 au 16 Mai 2013. **Communication affichée.**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

**Bibliographie complémentaire: références qui n'apparaissent pas
dans les publications de ce mémoire**

A

Achary V.M.M., Jena S., Panda K.K., Panda B.B. (2008). Aluminium induced oxidative stress and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 70:300–310.

Akashi K., Nishimura N., Ishida Y., Yokota A. (2004). Potent hydroxyl radical scavenging activity of drought-induced type-2 metallothionein in wild watermelon. *Biochem Biophys Res Commun* 323:72–78.

Akcha F., Vincent Hubert F., Pfohl-Leskowicz A. (2003). Potential value of the Comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutat Res.* 534 (1–2):21–32.

Angelis K.J., McGuffie M., Menke M., Schubert I. (2000). Adaptation to alkylation damage in DNA measured by the Comet assay. *Environ Mol Mutagen.* 36(2):146–50.

Ansari H.A., Ellison N.W., Reader S.M., Badaeva E.D., Friebe B., Miller T.E., Williams W.M. (1999). Molecular cytogenetic organization of 5S and 18S-26S rDNA loci in white clover (*Trifolium repens* L.) and related species. *Annal of Botany.* 83:199–206

B

Bajpayee M., Pandey A.K., Zaidi S., Musarrat J., Parmar D., Mathur N., Seth P.K., Dhawan A. (2006). DNA damage and mutagenicity induced by endosulfan and its metabolites. *Environ Mol Mutagen.* 47(9):682–92.

Bakare A.A., Pandey A.K., Bajpayee M., Bhargav D., Chowdhuri D.K., Singh K.P., Murthy R.C., Dhawan A. (2007). DNA damage induced in human peripheral blood lymphocytes by industrial solid waste and municipal sludge leachates. *Environ Mol Mutagen.* 48(1):30–7.

Baos R, Jovani R, Pastor N, Tella JL, Jiménez B, Gómez G, Gonzalez M.J., Hiraldo F. (2006). Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Milvus migrans*) from southwestern Spain after a mining accident. *Environ Toxicol Chem.* 25 (10):2794–803.

Bernard, F., Brulle, F., Douay, F., Lemièrre, S., Demuyneck, S., Vandebulcke, F. (2010). Metallic trace element body burdens and gene expression analysis of biomarker candidates in *Eisenia fetida*, using an "exposure/depuration" experimental scheme with field soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73:1034-1045.

Bhat T.M., Ansari M. Y. K., Choudhary S., Aslam R., Alka. (2011) Synergistic Cytotoxic Stress and DNA Damage in Clover (*Trifolium repens*) Exposed to Heavy Metal Soil from

Automobile Refining Shops in Kashmir-Himalaya. ISRN Toxicology, vol. 2011, Article ID 109092, 7 pages.

Bidar, G., Garçon, G., Pruvot, C., Dewaele, D., Cazier, F., Douay, F., Shirali, P. (2007). Behavior of *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal contaminated field: Plant metal concentration and phytotoxicity. *Environmental Pollution* 147, 546-553.

Bidar, G., Pruvot, C., Garçon, G., Verdin, A., Shirali, P., Douay, F. (2009). Seasonal and annual variations of metal uptake, bioaccumulation, and toxicity in *Trifolium repens* and *Lolium perenne* growing in a heavy metal-contaminated field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 42-53.

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(14-15):2935-47.

Bigorgne E., Cossu-Leguille C., Bonnard M., Nahmani J. (2010). Genotoxic effects of nickel, trivalent and hexavalent chromium on the *Eisenia fetida* earthworm. *Chemosphere* 80(9):1109-12.

Bilbao C., Ferreiro J.A., Comendador M.A., Sierra L.M. (2002). Influence of *mus201* and *mus308* mutations of *Drosophila melanogaster* on the genotoxicity of model chemicals in somatic cells in vivo measured with the Comet assay. *Mutat Res.* 503:11–9.

Bispo A., Jourdain M.J., Jauzein M. (1997) Les apports des tests d'écotoxicité à l'analyse d'une terre contaminée: Le sol, une éponge à polluants. *Analysis*, 25: 9-10.

Bonnard M., Eom I.C., Morel J.L., Vasseur P. (2009). Genotoxic and reproductive effects of an industrially contaminated soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ Mol Mutagen* 50:60–67.

Bonnard M., Devin S, Leyval C., Morel J.-L., Vasseur P. (2010). The influence of thermal desorption on genotoxicity of multipolluted soil. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:955–960.

Brulle, F., Mitta, G., Cocquerelle, C., 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., Mitta, G., Leroux, R., Lemièrre, S., Leprêtre, A., Vandebulcke, F. (2007). The strong induction of metallothionein gene following cadmium exposure transiently affects the expression of many genes in *Eisenia fetida*: A trade-off mechanism? *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 144, 334-341.

Brulle, F., Cocquerelle, C., Mitta, G., Castric, V., Douay, F., Leprêtre, A., Vandembulcke, F. (2008a). Identification and expression profile of gene transcripts differentially expressed during metallic exposure in *Eisenia fetida* coelomocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 1441-1453.

Brulle, F., Cocquerelle, C., Wamalah, A.N., Morgan, A.J., Kille, P., Leprêtre, A., Vandembulcke, F. (2008b). cDNA cloning and expression analysis of *Eisenia fetida* (Annelida: Oligochaeta) phytochelatin synthase under cadmium exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 47-55.

Bustos-Obregon E., Goicochea R.I. (2002). Pesticide soil contamination mainly affects earthworm male reproductive parameters. *Asian J Androl.* 4(3):195–9.

Button M., Jenkin G.R.T., Bowman K.J., Harrington C.F., Brewer T.S., Jones G.D.D., Watts M.J. (2010). DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: Assessing resistance to arsenic toxicity by use of the comet assay. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 696(2):95-100.

Button M., Koch I., Reimer K.J. (2012). Arsenic resistance and cycling in earthworms residing at a former gold mine in Canada. *Environmental Pollution* 169:74-80.

C

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. *J Soils Sediments* 7 (4) 232–239.

Cavas T., Könen S. (2007). Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the Comet assay. *Mutagenesis*. 22(4):263–8.

Chen Y., Wang Z. (2005). Detection of genotoxicity of soil pollution to earthworm *in vivo* exposure by comet assay. *Acta Pedologica Sinica* 42(4):577-583

Chen Z., Lou J., Chen S., Zheng W., Wu W., Jin L., Deng H., He J. (2006). Evaluating the genotoxic effects of workers exposed to lead using micronucleus assay, Comet assay and TCR gene mutation test. *Toxicology*. 223(3):219–26.

Clements C., Ralph S., Petras M. (1997). Genotoxicity of select herbicides in *Rana catesbeiana* tadpoles using the alkaline single-cell gel DNA electrophoresis (Comet) assay. *Environ Mol Mutagen.* 29(3):277–88.

Collins A.R. (2004). The Comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol.* 26:249–60.

COM (Committee on Mutagenicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment), COM guidance on a strategy for testing of chemicals for mutagenicity, United Kingdom, December 2000.

Conder J.M., Lanno R.P. (2000). Evaluation of surrogate measures of cadmium, lead, and zinc bioavailability to *Eisenia fetida*. *Chemosphere.* 41:1659-1668.

Conder J.M., Seals L.D., Lanno R.P. (2002). Method for determining toxicologically relevant cadmium residues in the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere.* 49:1-7.

Cotelle S., Ferard J.F. (1999). Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environ Mol Mutagen.* 34:246–55.

Cui X., Wang H., Lou L., Chen Y., Yu Y., Shi J., Xu L., Khan M.I. (2009). Sorption and genotoxicity of sediment-associated pentachlorophenol and pyrene influenced by crop residue ash. *Journal of Soils and Sediments* 9(6):604-12

D

Darwin C.R. (1883). The formation of vegetable mould, through the action of worms with observations on their habitats. John Murray, London.

Declercq C., Beauvois M. (2000). Programme de dépistage du saturnisme infantile autour du site Metaleurop de Noyelles-Godault. Bilan de la campagne 1999–2000, Lille, Observatoire Régional de la santé, Nord-Pas-de-Calais.

Dhawan A., Bajpayee M., Parmar D. (2009). Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. *Cell Biol Toxicol* 25:5–32.

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(4):246–52.

Di Marzio W.D., Sáenz M.E., Montivero C., Alberdi J.L., Tortorelli M.C., Ambrini G. (2007). Genotoxicity of aqueous elutions of industrial soils. *Bull Environ Contam Toxicol* 79(5):483-7.

Directive Cadre Sol, proposition du 22 septembre 2006 définissant un cadre pour la protection des sols et modifiant la directive 2004/35/CE.

Dong L., Gao J., Xie X., Zhou Q. (2012). DNA damage and biochemical toxicity of antibiotics in soil on the earthworm *Eisenia fetida*. *Chemosphere* 89:44–51.

E

Espinosa-Reyes G., Ilizaliturri C.A., González-Mille D.J., Costilla R., Díaz-Barriga F., Cuevas M.D.C., Martínez M.A., Mejía-Saavedra J. (2010). DNA damage in earthworms (*Eisenia spp.*) as an indicator of environmental stress in the industrial zone of coatzacoalcos, veracruz, mexico. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 45(1):49-55.

Evans T., Song J., Jameson P.E. (2012). Micro-scale chlorophyll analysis and developmental expression of a cytokinin oxidase/dehydrogenase gene during leaf development and senescence. *Plant Growth Regulation*. 66:95–99.

F

Feng S., Kong Z., Wang X., Zhao L., Peng P. (2004). Acute toxicity and genotoxicity of two novel pesticides on amphibian, *Rana N. Hallowell*. *Chemosphere* 56(5):457–63.

Fischer E., Molnar L. (1997). Growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta, Lumbricidae) in semi-natural soil containing various metal chlorides. *Soil Biology & Biochemistry*. 29:667-670.

Florea, A.M., Büsselberg, D. (2006). Occurrence, use and potential toxic effects of metals and metal compounds. *BioMetals*. 19, 419-427.

Fourié F., Reinecke S.A., Reinecke A.J. (2007). The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the Comet assay. *Ecotoxicol Environ Saf*. 67(3):361–8.

Frame J. & Newbould P. 1986. Agronomy of white clover. *Advances In Agronomy* 40:1-88

Frame J. (2003). *Trifolium repens* L. *Food and Agriculture Organization* (FAO). In : The Biology and Ecology of White Clover (*Trifolium repens* L.) in Australia. Australian Government, Departement of Health and Ageing.

Fuchs J., Piola L., González E.P., Oneto M.L., Basack S., Kesten E., Casabé N. (2011). Coelomocyte biomarkers in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to 2,4,6-trinitrotoluene (TNT). *Environ Monit Assess* 175(1-4):127-37.

G

Gandolfi I., Siculo M., Franzetti A., Fontanarosa E., Santagostino A., Bestetti G. (2010). Influence of compost amendment on microbial community and ecotoxicity of hydrocarbon-contaminated soils. *Bioresour Technol* 101(2):568-75.

Gedik C., Ewen S., Collins A. (1992). Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. *Int J Radiat Biol.* 62:313–20.

Ghosh M., Bandyopadhyay M., Mukherjee A. (2010). Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: plant and human lymphocytes. *Chemosphere*, 81:1253–1262.

Ghosh M., Sinha J.M., Chakraborty A., Malick S.K., Bandyopadhyay M., Mukherjee A. (2012). *In vitro* and *in vivo* genotoxicity of silver nanoparticles *Mutat. Res.* 749(1–2):60–69.

Gichner T., Plewa M.J. (1998). Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. *Mutat Res.* 401 (1–2):143–52.

Gichner T., Patková T., Száková J., Demnerová K. (2004). Cadmium induces DNA damage in tobacco roots, but no DNA damage, somatic mutations or homologous recombination in tobacco leaves. *Mutat. Res.* 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. *Ecotoxicol Environ Saf.* 65(3):420–6.

Gichner T., Lovecká P., Kochánková L., Macková M., Demnerová K. (2007). Monitoring toxicity, DNA damage, and somatic mutations in tobacco plants growing in soil heavily polluted with polychlorinated biphenyls. *Mutat Res.* 629(1):1–6.

Gichner T., Patkova Z., Szàková J., Znidar I., Mukherjee A. (2008a). DNA damage in potato plants induced by cadmium, ethyl methanesulphonate and γ -rays, *Environ. Exp. Bot.* 62:113–119.

Gichner T., Znidar I., Szàková J. (2008b). Evaluation of DNA damage and mutagenicity induced by lead in tobacco plants, *Mutat. Res.* 652:186-190

Giovanetti A., Fesenko S., Cozzella M. L., Asencio L. D., Sansone U. (2010). Bioaccumulation and biological effects in the earthworm *Eisenia fetida* exposed to natural and depleted uranium. *Journal of Environmental Radioactivity.*

Grant W.F. (1999). Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations — a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals. *Mutat Res.* 426:107–12.

Grelle C., Descamps M. (1998). Heavy metal accumulation by *Eisenia fetida* and its effects on Glutathione-S-Transferase activity. *Pedobiologia.* 42:289-297

H

Heikens A., Peijnenburg W.J.G.M., Hendriks A.J. (2001). Bioaccumulation of heavy metal in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution.* 113:385-393.

Helling B., Reinecke S.A., Reinecke A.J. (2000). Effects of fungicide copper oxychloride on the growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 46(1):108-116.

Hu C.W., Li M., Cui Y.B., Li D.S., Chen J., Yang L.Y. (2010). Toxicological effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biol Biochem* 42(4):586-91.

I

Iannone M.F., Rosales E.P., Groppa M.D., Benavides M.P. (2010). Reactive oxygen species formation and cell death in catalase deficient tobacco leaf disks exposed to cadmium, *Protoplasma* 245, 15–27.

J

Jones E.S., Huges L.J., Drayton M.C., Abberton M.T., Michaelsonyeates T.P.T., Bowen C., Foster J.W. (2003). An SSR and AFLP molecular marker – based genetic map of white clover (*Trifolium repens* L.). *Plant Science* 165: 531–539

K

Kassie F., Parzefall W., Knasmüller S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 463(1):13–31.

Kastori R., Petrovic M., Petrovic N. (1992). Effect of excess lead, cadmium, copper and zinc on water relations in sunflower. *J Plant Nutr* 15:2427–2439

Khan M.I., Cheema S.A., Tang X., Shen C., Sahi S.T., Jabbar A., Park J., Chen Y. (2012). Biototoxicity assessment of pyrene in soil using a battery of biological assays. *Arch Environ Contam Toxicol* 63(4):503-12.

Khan M.I., Cheema S.A., Tang X., Hashmi M.Z., Shen C., Park J., Chen Y. (2013). A battery of bioassays for the evaluation of phenanthrene biototoxicity in soil. *Arch Environ Contam Toxicol*. 65(1), 47–55.

Klobucar G.I., Pavlica M., Erben R., Papes D. (2003). Application of the micronucleus and Comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquat Toxicol*. 64 (1):15–23.

Klobučar G.I.V., Štambuk A., Šrut M., Husnjak I., Merkaš M., Traven L., Cvetković Z. (2011). *Aporrectodea caliginosa*, a suitable earthworm species for field based genotoxicity assessment? *Environmental Pollution* 159(4):841-9.

Koppen G., Verschaeve L. (1996). The alkaline Comet test on plant cells: a new genotoxicity test for DNA strand breaks in *Vicia faba* root cells, *Mutat. Res.* 360:193–200.

Kratovalieva S., Cvetanowska L. (2001). Influence of different lead concentrations to some morphophysiological parameters at tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in experimental conditions. *Maced Agric Rev* 48(1/2):35–41

L

Labieniec M., Gabryelak T. (2006) Oxidatively modified proteins and DNA in digestive gland cells of the fresh-water mussel *Unio tumidus* in the presence of tannic acid and its derivatives. *Mutat Res.* 603(1):48–55.

Lagisz M., Kramarz P., Laskowski R., Tobor M. (2002). Population parameters of the beetle *Pterostichus oblongopunctatus* F. from metal contaminated and reference areas. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 69:243-249.

Lah B., Malovrh S., Narat M., Cepeljnik T., Marinsek-Logar R. (2004). Detection and quantification of genotoxicity in wastewater-treated *Tetrahymena thermophila* using the Comet assay. *Environ Toxicol*. 19(6):545–53.

Lamb D.T., Ming H., Megharaj M., Naidu R. (2010). Phytotoxicity and accumulation of lead in Australian native vegetation. *Arch Environ Contam Toxicol* 58(3):613–621

Lane L.A., Ayres J.F., Lovett J.V. 1997. A review of the introduction and use of white clover (*Trifolium repens* L.) in Australia – significance for breeding objectives. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 37:831-839.

- Lane L.A., Ayres J.F., Lovett J.V. 2000. The pastoral significance, adaptative characteristics, and grazing value of white clover (*Trifolium repens* L.) in dryland environments in Australia: A review. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 40:1033-1046.
- Ledgard S.F., Sprosen M.S., Penno J.W., Rajendram G.S. (2001). Nitrogen fixation by White clover in pastures grazed by dairy cows: temporal variation and effects of nitrogen fertilization. *Plant and Soil*, 229:177-187.
- Lee R.F., Steinert S. (2003). Use of the single cell gel electrophoresis/Comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res.* 544:43–64.
- Li L., Zhou D.-M., Wang P., Luo X.-S. (2008). Subcellular distribution of Cd and Pb in earthworm *Eisenia fetida* as affected by Ca²⁺ ions and Cd–Pb interaction, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71(3):632–637
- 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* 74:621–625.
- Liang S.-H., Chen S.-C., Chen C.-Y., Kao C.-M., Yang J.-I., Shieh B.-S., Chen J.-H., Chen C.-C. (2011). Cadmium-induced earthworm metallothionein-2 is associated with metal accumulation and counteracts oxidative stress. *Pedobiologia* 54:333–340.
- Lin A.J., Zhu Y., Tong Y.P. (2005a). Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and imidacloprid, *Sci. China C Life Sci.* 48:7–17.
- Lin A.J., Zhu Y.G., Tong Y.P., Geng C.N. (2005). Evaluation of Genotoxicity of Combined Pollution by Cadmium and Atrazine, *Bull. Environ. Contam. Tox.* 74:589–596.
- Lin A.J., Zhang X.-H., Chen M.-M., Cao Q. (2007). Oxidative stress and DNA damages induced by cadmium accumulation. *Journal of Environmental Sciences.* 19:596–602.
- Lin D., Zhou Q., Xie X., Liu Y. (2010). Potential biochemical and genetic toxicity of triclosan as an emerging pollutant on earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere* 81:1328–1333.
- Lin D., Xie X., Zhou Q., Liu Y. (2012a). Biochemical and genotoxic effect of triclosan on earthworms (*Eisenia fetida*) using contact and soil tests. *Environmental Toxicology* 27:385–392.
- Lin D., Zhou Q., Xu Y., Chen C., Li Y. (2012b). Physiological and molecular responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to soil chlortetracycline contamination. *Environmental Pollution* 171:46–51.

Liu W., Zhu L.S., Wang J., Wang J.H., Xie H., Song Y. (2009). Assessment of the genotoxicity of endosulfan in earthworm and white clover plants using the comet assay. *Arch Environ Contam Toxicol* 56:742–746

Liu Y., Zhou Q., Xie X., Lin D., Dong L. (2010). Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene. *Ecotoxicology* 19:1551–1559.

Lock K., Janssen C.R. (2001). Zinc and cadmium body burden in terrestrial oligochaetes: use and significance in environmental risk assessment. *Environmental Toxicologic Chemistry*. 20:2067-2072.

Lourenço J., Pereira R., Silva A. C., Morgado J. M., Oliveira J., Carvalho F., Paiva A., Mendo S. and Gonçalves F., Measurement of Genotoxic Endpoints in Earthworms Exposed to Radioactive Wastes from an Abandoned Uranium Mine. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry—Biological Responses to Contaminants*, Eds., N. Hamamura, S. Suzuki, S. Mendo, C. M. Barroso, H. Iwata and S. Tanabe, 2010; pp. 219-225.

Lourenço J.I., Pereira R.O., Silva A.C., Morgado J.M., Carvalho F.P., Oliveira J.M., Malta M.P., Paiva A.A., Mendo S.A., Gonçalves F.J. (2011). Genotoxic endpoints in the earthworms sub-lethal assay to evaluate natural soils contaminated by metals and radionuclides. *Journal of Hazardous Materials* 186:788–795.

Lourenço J., Pereira R., Silva A., Carvalho F., Oliveira J., Malta M., Paiva A., Gonçalves F., Mendo S. (2012). Evaluation of the sensitivity of genotoxicity and cytotoxicity endpoints in earthworms exposed *in situ* to uranium mining wastes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 75:46–54.

Lu F.C. (1991) *Toxicologie: données générales/ Procédures d'évaluation/ organes cibles/ évaluation du risque*. Chapitre 8, pages 113- 127. Eds. Masson, Paris, pp 361.

M

Ma T., Xu Z., Xu C., McConnell H., Rabago E.V., Arreola G.A., Zhang H. (1995). The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. *Mutat Res*. 334:185–95

Malecka A., Piechalak A., Tomaszewska B. (2009). Reactive oxygen species production and antioxidative defense system in pea root tissues treated with lead ions: the whole roots level. *Acta Physiol Plant* 31:1053–1063

Maluszynska J., Juchimiuk J. (2005). Plant genotoxicity: a molecular cytogenetic approach in plant bioassays. *Arh Hig Rada Toksikol*. 56(2):177–84.

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. *Environ Toxicol Pharmacol* 25(1):63-8

Manerikar R.S., Apte A.A., Ghole V.S. (2008b) *In vitro* genotoxicity of fly ash leachate in earthworm coelomocytes. *Toxicol Environ Chem* 90(2):293-300.

Manier N. (2008). Etude d'un nouveau modèle biologique végétal (*Trifolium repens*) en écotoxicologie, applicable aux sols contaminés par les métaux lourds. Thèse pour l'obtention du grade de docteur de l'université de Lille 2, 2008, 241p.

Manier, N., Deram, A., Broos, K., Denayer, F.O., Wan Haluwyn, C. (2009). White clover modulation index in heavy metal contaminated soils- A potential bioindicator. *Journal of Environmental Quality* 38:685-692.

Manier, N., Brulle, F., Le Curieux, F., Vandebulcke, F., Deram, A. (2012). Biomarker measurements in *Trifolium repens* and *Eisenia fetida* to assess the toxicity of soil contaminated with landfill leachate: A microcosm study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 80:339–348.

Markad V.L., Kodam K.M., Ghole V.S. (2012). Effect of fly ash on biochemical responses and DNA damage in earthworm, *Dichogaster curgensis*. *J Hazard Mater* 215-216:191-8.

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. *Environ Pollut.* 138(2):307–15.

Menke M., Meister A., Schubert I. (2000). N-Methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage detected by the Comet assay in *Vicia faba* nuclei during all interphase stages is not restricted to chromatid aberration hot spots. *Mutagenesis.* 15(6):503–6.

Menke M., Chen I.P., Angelis K.J., Schubert I. (2001). DNA damage and repair in *Arabidopsis thaliana* as measured by the comet assay after treatment with different classes of genotoxins, *Mutat. Res.* 493:87–93.

Mitchelmore C.L., Chipman J.K. (1998). DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the Comet assay in environmental monitoring. *Mutat Res.* 399:135–47.

Mitchelmore C.L., Hyatt S. (2004). Assessing DNA damage in cnidarians using the Comet assay. *Mar Environ Res.* 58(2–5):707–11.

Mohanpuria P., Rana N.K., Yadav S.K. (2007) Cadmium induced oxidative stress influence on glutathione metabolic genes of *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze. *Environ Toxicol* 22:368–374

Moller P. (2005). Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline Comet assay. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 96:1–42.

Moller P. (2006). The alkaline Comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 98(4):336–45.

Mouchet F., Gauthier L., Mailhes C., Ferrier V., Devaux A. (2006). Comparative evaluation of genotoxicity of captan in amphibian larvae (*Xenopus laevis* and *Pleurodeles waltl*) using the Comet assay and the micronucleus test. *Environ Toxicol.* 21(3):264–77.

Mozdzer T. J., Kramarz P., Piskiewicz A., Niklinska M. (2003). Effects of cadmium and zinc on larval growth and survival in the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus*. *Environment International.* 28:737-742.

Muangphra P., Gooneratne R. (2011). Comparative Genotoxicity of Cadmium and Lead in Earthworm Coelomocytes. *Applied and Environmental Soil Science*, vol. 2011, Article ID 218929, 7 pages, doi:10.1155/2011/218929

Muangphra P., Gooneratne R. (2011). Toxicity of Commercial Neem Extract to Earthworms (*Pheretima peguana*). *Applied and Environmental Soil Science*, vol. 2011, Article ID 925950, 8 pages, doi:10.1155/2011/925950

Muangphra P., Kwankua W., Gooneratne R. (2012). Genotoxic effects of glyphosate or paraquat on earthworm coelomocytes. *Environ Toxicol* 13(4).

Mukhopadhyay I., Chowdhuri D.K., Bajpayee M., Dhawan A. (2004). Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay. *Mutagenesis.* 19(2):85–90.

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.* 149:44-58.

National Research Council. (1983) Risk assessment in the Federal government. Managing the process. Washington (DC) : National. Academy Press.

Nawrot T., Plusquin M., Hogervorst J., Roels H. A., Celis H., Thijs L., Vangronsveld J., Van Hecke E., Staessen J. A. (2006). Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: A prospective population-based study. *Lancet Oncology.* Vol. 7, 119-126.

Neuhauser E.F., Cukic Z.V., Malecki M.R., Loehr R.C., Durkin P.R. (1995). Bioconcentration and biokinetics of the heavy metals in the earthworm. *Environmental Pollution*. 89:293-301.

O

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). (1984a). OECD guideline for testing chemicals. Section 2: effects on biotic systems, Method, 207, Earthworm, acute toxicity tests, Paris, France, 207 pp.

Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). (2007). OECD Annual Report 2007. OECD Publishing, 131 pp.

Olive P.L., Banath J.P., Durand R.E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat. Res.* 122 : 86-94.

Olive P.L., Banath J.P. (2006). The Comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* 1 (1):23–9.

Ostling O., Johanson K.J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 123(1):291–8.

P

Palus J., Rydzynski K., Dziubaltowska E., Wyszynska K., Natarajan A.T., Nilsson R. (2003). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium, *Mutat. Res.* 540, 19–28.

Paskova V., Hilscherova K., Feldmannova M., Blaha L. (2006). Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-heterocyclic derivatives. *Environ. Toxicol. Chem.*, 25:3238–3245.

Pastor N., López-Lázaro M., Tella J.L., Baos R., Forrero M.G., Hiraldo F., Cortes F. (2001). DNA damage in birds after the mining waste spill in southwestern Spain: a Comet assay evaluation. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 20 (4):317–24.

Pawert M., Triebkorn R., Gräff S., Berkus M., Schulz J., Kölher H.-R. (1996). Cellular alterations in midgut cells as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. *The Science of the Total Environment.* 181:187-200.

Piola L., Fuchs J., Oneto M.L., Basack S., Giménez R., Massaro R., Papa J.C., Kesten E., Casabé N. (2009). Biomarkers for the assessment of chlorpyrifos effects on earthworms and on soil functional parameters. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira* 44(8):874-80.

Piola L., Fuchs J., Oneto M.L., Basack S., Kesten E., Casabé N. (2013). Comparative toxicity of two glyphosate-based formulations to *Eisenia andrei* under laboratory conditions. *Chemosphere* 91(4):545-51.

Piperakis S.M., Kontogianni K., Siffel C., Piperakis M.M. (2006). Measuring the effects of pesticides on occupationally exposed humans with the Comet assay. *Environ Toxicol.* 21(4):355-9.

Pizl V., Josen G. (1995). Earthworm communities along a gradient of urbanisation. *Environmental Pollution.* 90:7-14.

Poli P., Buschini A., Restivo F.M., Ficarelli A., Cassoni F., Ferrero I., Rossi C. (1999). Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis* 14:547-55.

Poli P., de Mello M.A., Buschini A., de Castro V.L.S.S., Restivo F.M., Rossi C., Zucchi T.M.A.D. (2003). Evaluation of the genotoxicity induced by the fungicide fenarimol in mammalian and plant cells by use of the single-cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 540:57-66.

Pourrut B., Jean S., Silvestre J., Pinelli E. (2011). Lead-induced DNA damage in *Vicia faba* root cells: Potential involvement of oxidative stress. *Mutation Research* 726:123-128.

Pruski A.M., Dixon D.R. (2002). Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. *Aquat Toxicol.* 57(3):127-37.

Puckett, E.E., Serapiglia, M.J., DeLeon, A.M., Long, S., Minocha, R., Smart, L.B. (2012). Differential expression of genes encoding phosphate transporters contributes to arsenic tolerance and accumulation in shrub willow (*Salix spp.*). *Environmental and Experimental Botany* 75, 248-257.

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. *Environ Pollut.* 148(1):141-7.

Qu M., Xu Y., Chen H., Li Z., Sun L., Xu D., Kong Z., Sugiura N. (2005). Toxicological study of three veterinary drugs on *Eisenia foetida*. Chinese Journal of Applied Ecology 16(6):1108-11.

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. Environ Mol Mutagen. 41(2):85–91.

Ranieri A., Castagna A., Scebba F., Careri M., Zagnoni I., Predieri G., Pagliari M., Sanità di Toppi L. (2005). Oxidative stress and PC characterisation in bread wheat exposed to Cd excess, Plant Physiol. Biochem. 43, 45–54.

Rank J., Jensen K., Jespersen P.H. (2005). Monitoring DNA damage in indigenous blue mussels (*Mytilus edulis*) sampled from coastal sites in Denmark. Mutat Res. 585 (1–2):33–42.

Reinecke S.A., Prinsloo M.W., Reinecke A.J. (1999). Resistance of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) to cadmium after long-term exposure. Ecotoxicology and Environmental Safety. 42:75-80.

Reinecke S.A., Reinecke A.J. (2004). The Comet assay as biomarker of heavy metal genotoxicity in earthworms. Arch Environ Contam Toxicol. 46(2):208–15.

Rodriguez E., Azevedo R., Fernandes P., Santos C. (2011). Cr(VI) induces DNA damage, cell cycle arrest and polyploidization: a flow cytometric and comet assay study in *Pisum sativum*. Chemical Research in Toxicology. 24:1040–1047.

Romero-Puertas M.C., Rodriguez-Serrano M., Corpas F.J., Gomez M., Del Rio L.A. (2004). Cd-induced subcellular accumulation of O_2^- and H_2O_2 in pea leaves, Plant Cell Environ. 27, 1122–1134.

Rucinska R., Sobkowiak R., Gwozdz E.A. (2004). Genotoxicity of lead in lupin root cells as evaluated by the comet assay, Cell. Mol. Biol. Lett.9:519–528.

S

Saghirzadeh M., Gharaati M.R., Mohammadi S., Ghiassi-Nejad M. (2008). Evaluation of DNA damage in the root cells of *Allium cepa* seeds growing in soil of high background radiation areas of Ramsar – Iran, J. Environ. Radioact. 99:1698-1702.

Salagovic J., Gilles J., Verschaeve L., Kalina I. (1996). The Comet assay for the detection of genotoxic damage in the earthworms: a promising tool for assessing the biological hazards of polluted sites. *Folia Biol (Praha)*. 42(1–2):17–21.

Sanita di Toppi L., Gabbrielli R. (1999). Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany*. 41, 105–130.

Sathya TN, Deepa V, Sunil Dutt M, Balakrishna Murthy P. DNA damage caused by a textile dye (acid red) in coelomocytes of earthworm, *Eisenia fetida*. *Australas J Ecotoxicol* 2009;15(2-3):45-50.

Scaps P., Descamps M., Demuyne S. (2002). Biochemical and physiological response induced by toxics in Annelida: utilization as biomarkers. *Trends in Comparative Biochemistry and Physiology*. 9:165-173.

Schell L.M., Burnitz K.K., Lathrop P.W. (2010). Pollution and human biology. *Ann. Human Biol.* 37, 347–366.

Sforzini S., Dagnino A., Oliveri L., Canesi L., Viarengo A. (2011). Effects of dioxin exposure in *Eisenia andrei*: Integration of biomarker data by an expert system to rank the development of pollutant-induced stress syndrome in earthworms. *Chemosphere* 85(6):934-42.

Sforzini S., Boeri M., Dagnino A., Oliveri L., Bolognesi C., Viarengo A. (2012). Genotoxicity assessment in *Eisenia andrei* coelomocytes: A study of the induction of DNA damage and micronuclei in earthworms exposed to B[a]P- and TCDD-spiked soils. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 746(1):35-41.

Sharma P., Dubey R.S. (2005). Lead toxicity in plants. *Braz. J. Plant Physiol.* 17, 35–52.

Siddique H.R., Gupta S.C., Dhawan A., Murthy R.C., Saxena D.K., Chowdhuri D.K. (2005). Genotoxicity of industrial solid waste leachates in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mol Mutagen.* 46(3):189–97.

Singh N.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. *Exp Cell Res.* 175(1):184–91.

Sobkowiak R., Deckert J. (2004). The effect of cadmium on cell cycle control in suspension culture cells of soybean. *Acta Physiologiae Plantarum.* 26(3):335–344.

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 foetida*) induced by atrazine. *Soil Biol Bioch* 41:905–909.

Speit G., Hartmann A. (2005). The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol.* 291:85–95.

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., Weeks J.M., van Gestel C.A.M. (2003a). A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia.* 47(5-6):588-606.

Stone D., Jepson P., Kramarz P., Laskowski R. (2001). Time to death response in carabid beetles exposed to multiple stressors along a gradient of heavy metal pollution. *Environmental Pollution.* 113:239-244.

Sturchio E., Boccia P., Meconi C., Zanellato M., Marconi S., Beni C., Aromolo R., Ciampa A., Diana G., Valentini M. (2011). Effects of arsenic on soil–plant systems, *Chemistry and Ecology*, 27(S1):67–78

V

Vajpayee P., Dhawan A., Shanker R. (2006). Evaluation of the alkaline Comet assay conducted with the wetlands plant *Bacopa monnieri* L. as a model for ecogenotoxicity assessment. *Environ Mol Mutagen.* 47(7):483–9.

Valverde M., Fortoul T.I., Díaz-Barriga F., Mejía J., del Castillo E.R. (2002). Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis.* 17(1):55–61.

Vandenhove H., Cuypers A., Van Hees M., Koppen G., Wannijn J. (2006). Oxidative stress reactions induced in beans (*Phaseolus vulgaris*) following exposure to uranium. *Plant Physiol and Biochem.* 44:795–805.

Vanhoudt, N., Vandenhove, H., Horemans, N., Remans, T., Opdenakker, K., Smeets, K., Bello, D.M., Wannijn, J., Van Hees, M., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2011a). Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Part I: Responses in the roots. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 630-637.

Vanhoudt, N., Cuypers, A., Horemans, N., Remans, T., Opdenakker, K., Smeets, K., Bello, D.M., Havaux, M., Wannijn, J., Van Hees, M., Vangronsveld, J., Vandenhove, H. (2011b). Unraveling uranium induced oxidative stress related responses in *Arabidopsis thaliana* seedlings. Part II: Responses in the leaves and general conclusions. *Journal of Environmental Radioactivity* 102, 638-645.

Vasseur P., Férard J.F., Babut M. (1991) The biological aspects of the regulatory control of industrial effluents in France. *Chemosphere*, 22, 625-633.

Veltman K., Huijbregts M.A.J., Vijver M.G., Peijnenburg W.J.G.M., Hobbelen P.H.F., Koolhaas J.E., van Gestel C.A.M., van Vliet P.C.J., Hendriks A.J. (2007). Metal accumulation in the earthworm *Lumbricus rubellus*. Model predictions compared to field data. *Environ. Pollut.* 146:428–436.

Ventura L., Giovannini A., Savio M., Donà M., Macovei A., Buttafava A., Carbonera D., Balestrazzi A. (2013). Single cell gel electrophoresis (Comet) assay with plants: Research on DNA repair and ecogenotoxicity testing. *Chemosphere*, 92:1–9.

Verma S., Dubey R.S. (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci.* 164, 645–655.

Vernile P., Tutino M., Bari G., Amodio M., Spagnuolo M., de Gennaro G., de Lillo E. (2013). Particulate matter toxicity evaluation using bioindicators and comet assay. *Aerosol and Air Quality Research* 13(1):172-8.

Verschaeve L., Gilles J., Schoeters J., Van Cleuvenbergen R., De Fre' 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, editors. *Organohalogen compounds* 11. Austria: Federal Environmental Agency; 1993. p. 213–6.

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(1):112-9.

Voisey C.R., White D.W.R., Wigley P.J., Chilcott C.N., McGregor P.G., Woodfield D.R. (1994). Release of transgenic of transgenic white clover plants expressing *Bacillus thuringiensis* genes: an ecological perspective. *Biocontrol Science and Technology*. 4:475-481.

Voua Otomo P., Reinecke S.A. (2010). Increased cytotoxic and genotoxic tolerance of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) to cadmium after long-term exposure. *Ecotoxicology* 19:362–368.

W

Wang J., Zhu L., Meng Y., Wang J., Xie H., Zhang Q. (2012). The combined stress effects of atrazine and cadmium on the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31(9):2035-40.

Williams W.M. (1987). Genetics and breeding. In “White Clover”, Baker MJ, Williams WM, eds. CAB international, Wallingford.

Winter M.J., Day N., Hayes R.A., Taylor E.W., Butler P.J., Chipman J.K. (2004). DNA strand breaks and adducts determined in feral and caged chub (*Leuciscus cephalus*) exposed to rivers exhibiting variable water quality around Birmingham, UK. *Mutat Res.* 552(1–2):163–75.

Wojcik M., Tukiendorf A. (2004) Phytochelatin synthesis and cadmium localization in wild type of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul* 44:71–80

Wong H.L., Sakamoto T., Kawasaki T., Umemura K., Shimamoto K. (2004). Down-regulation of metallothionein, a reactive oxygen scavenger, by the small GTPase *OsRac1* in rice. *Plant Physiol* 135:1447–1456.

Wu B., Liu Z., Xu Y., Li D., Li M. (2012). Combined toxicity of cadmium and lead on the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 81:122–126.

X

Xiao N., Song Y., Ge F., Liu X., Ou-Yang Z. (2006). Biomarkers responses of the earthworm *Eisenia fetida* to acetochlor exposure in OECD soil. *Chemosphere* 65(6):907-12.

Xiao R.Y., Wang Z., Wang C.X., Yu G., Zhu Y.G. (2006) 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(19):6170–75.

Xu Y., Chen H., Li Z., Li M., Sun H., Kong Z. (2007). Genotoxicity changes of arsanilic acid before and after degradation in slurry with comet assay on earthworm coelomocytes. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology* 13(1):46-9.

Xu C., Chen J., Xu L., Hu F., Li H. (2012). Detection of Cu²⁺-induced DNA damage of acclimated earthworms by comet assay. *Chinese Journal of Ecology* 31(7):1791-7.

Y

Yu G., R. Xiao, C. Wang, W. Wu, H. Liu, Z. Wang, (2007) Genotoxicity Assessment of soil irrigated with reclaimed water using *in vitro* umu/sos test and *in vivo* comet assay. *Acta Pedologica Sinica* 44(3):522-528. (in Chinese)

Z

Zakrzewski S.F. (2002) Environmental toxicology; Third edition. Chapter 5. Eds Oxford University Press, pp 334

Zang Y., Zhong Y., Luo Y., Kong Z.M. (2000). Genotoxicity of two novel pesticides for the earthworm, *Eisenia fetida*. Environ Pollut. 108(2):271–8.

Zhan Y. (2012). Effects of silver nanoparticles on bacteria and earthworms, Master of Science, Lincoln University

Zheng K., Liu Z., Li Y., Cui Y., Li M. (2013). Toxicological responses of earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to metal-contaminated soils. Environmental Science and Pollution Research 2013:1-9.

Zhu J., Zhao Z., Lu Y. (2006). Evaluation of genotoxicity of combined soil pollution by cadmium and phenanthrene on earthworm. J Environ Sci (China) 18(6):1210-5.

RESUME

Lorsqu'un constat de dysfonctionnement est fait au niveau d'un écosystème sur un site contaminé, par exemple à travers l'observation des communautés (animales/végétales), il peut être utile de se pencher sur la compréhension des relations entre organismes et sur la biologie d'espèces clés. Depuis quelques années, les recherches réalisées à l'échelle infra-individuelle (du niveau moléculaire jusqu'à l'individu) se multiplient. Ces travaux permettent de mieux comprendre les atteintes directes des contaminants et les mécanismes de toxicité et de défense. Les changements observés constituent des biomarqueurs potentiels. C'est au niveau moléculaire que se situe le travail réalisé au cours de cette thèse.

Les travaux menés ont consisté 1- à réaliser une synthèse bibliographique des travaux au niveau moléculaire portant sur le stress oxydatif chez l'Annélide Oligochète *Eisenia fetida* et la Fabaceae *Trifolium repens* lors d'expositions à des éléments traces métalliques et/ou des polluants organiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques, pesticides) afin de faire un état des lieux, 2- à transposer chez *T. repens* la méthode d'analyse des niveaux d'expression génique développée par l'équipe chez *E. fetida*, 3- à identifier des gènes dont les variations du niveau d'expression pourraient être indicatrices d'une exposition à une contamination métallique (biomarqueurs potentiels), 4- à évaluer les dommages à l'ADN grâce au test des comètes chez les deux espèces sélectionnées exposées à un sol contaminé par des gammes de Cd et de Pb, seuls ou en mélange. Ces travaux ont été initiés sur la base de plusieurs constats, 1- le stress oxydatif est un état physiologique largement étudié chez beaucoup d'espèces mais qu'en est-il chez les espèces étudiées au niveau transcriptomique?, 2- le manque de données génétiques concernant le stress oxydatif chez *T. repens*, espèce ubiquiste et importante au niveau agronomique, 3- évaluer les potentiels génotoxiques de deux ETMs nocifs pour les organismes vivants et très répandus dans l'environnement naturel, le Cd et le Pb.

Mots-clés: *Eisenia fetida*, *Trifolium repens*, Expression génique, Test des comètes, Génotoxicité, Biomarqueurs, Cadmium, Plomb.

ABSTRACT

When a malfunction is observed on a contaminated site, for example through the observation of communities (animals and/or plants), it may be useful to examine the understanding of relationships between organisms and biology of key species. Since a few years, more and more studies at individual level (from molecular level to individual level) were performed. Observed changes represent potential biomarkers. The work conducted in this thesis was performed at molecular level.

The work consisted in 1- a review of oxidative stress analysis at molecular level in *Eisenia fetida* (Annelida Oligochaeta) and in *Trifolium repens* (Fabaceae) during metal trace element and/or organic exposure (polycyclic aromatic hydrocarbons, pesticides) was done in order to make a state of art; 2- gene expression analysis used in *E. fetida* was transposed in *T. repens*; 3- genes showing indicative expression level variations during a metal exposure were identified (potential biomarkers); 4- comet assay was used to assess DNA damages in both species exposed to a urban natural soil spiked with Cd and Pb, alone or in admixture. This work was introduced further to several observations, 1- oxidative stress is a largely studied physiological state in many species but what about at transcriptional level in *E. fetida* and *T. repens*?; 2- an important lack of oxidative stress molecular data in *T. repens*, a widespread and agronomical important species, 3- to assess potential genotoxic effects of two harmful and widespread metal trace elements, Cd and Pb.

Keywords: *Eisenia fetida*, *Trifolium repens*, Gene expression, Comet assay, Genotoxicity, Biomarkers, Cadmium, Lead.