

**Université du Québec
INRS-Institut Armand Frappier**

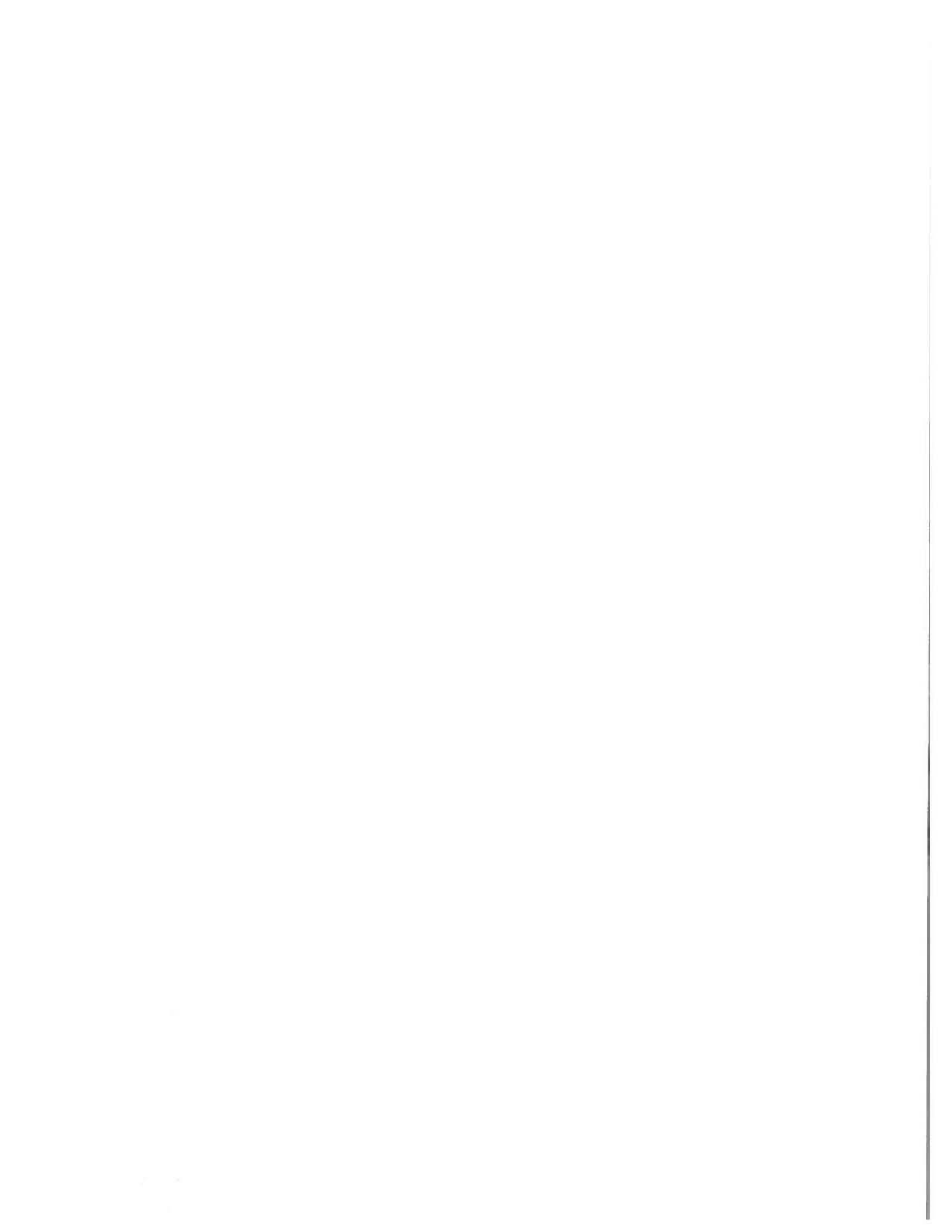
**ÉTUDE ÉCOTOXICOLOGIQUE DU SITE DE MERCIER SOUMIS AUX IMPACTS
DE L'INCINÉRATEUR DE DÉCHETS DANGEREUX**

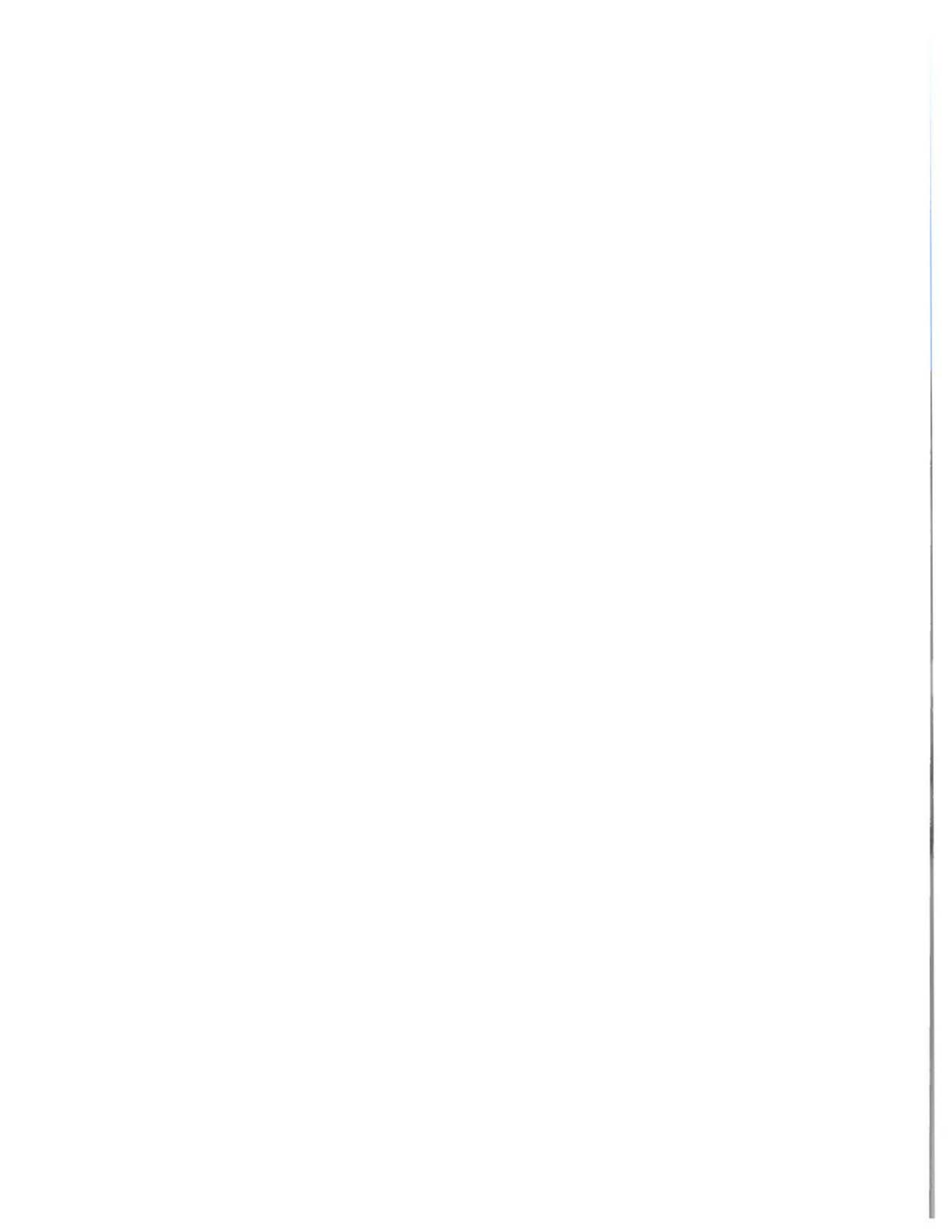
PAR
HAYET BELMESKINE

THÈSE PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
PHILOSOPHIAE DOCTOR (Ph.D.)
EN BIOLOGIE

Jury d'évaluation

Président de jury Et examinateur interne	Pre. Cathy Vaillancourt, Ph.D. INRS-Institut Armand Frappier
Examineur externe	Pre. Céline Surette, Ph.D. Département de chimie et de biochimie Université de Moncton
Examineur externe	Pr. Jules M Blais, Ph.D Département de biologie Université d'Ottawa
Directeur de recherche	Pr. Michel Fournier, Ph.D. INRS-Institut Armand Frappier
Co-Directrice de recherche	Pre. Louise Vandelac, Ph.D Département des sciences environnementales Université du Québec à Montréal
Co-Directeur de recherche	Pr. Sami Haddad, Ph.D. Département de santé environnementale et santé au travail Université de Montréal





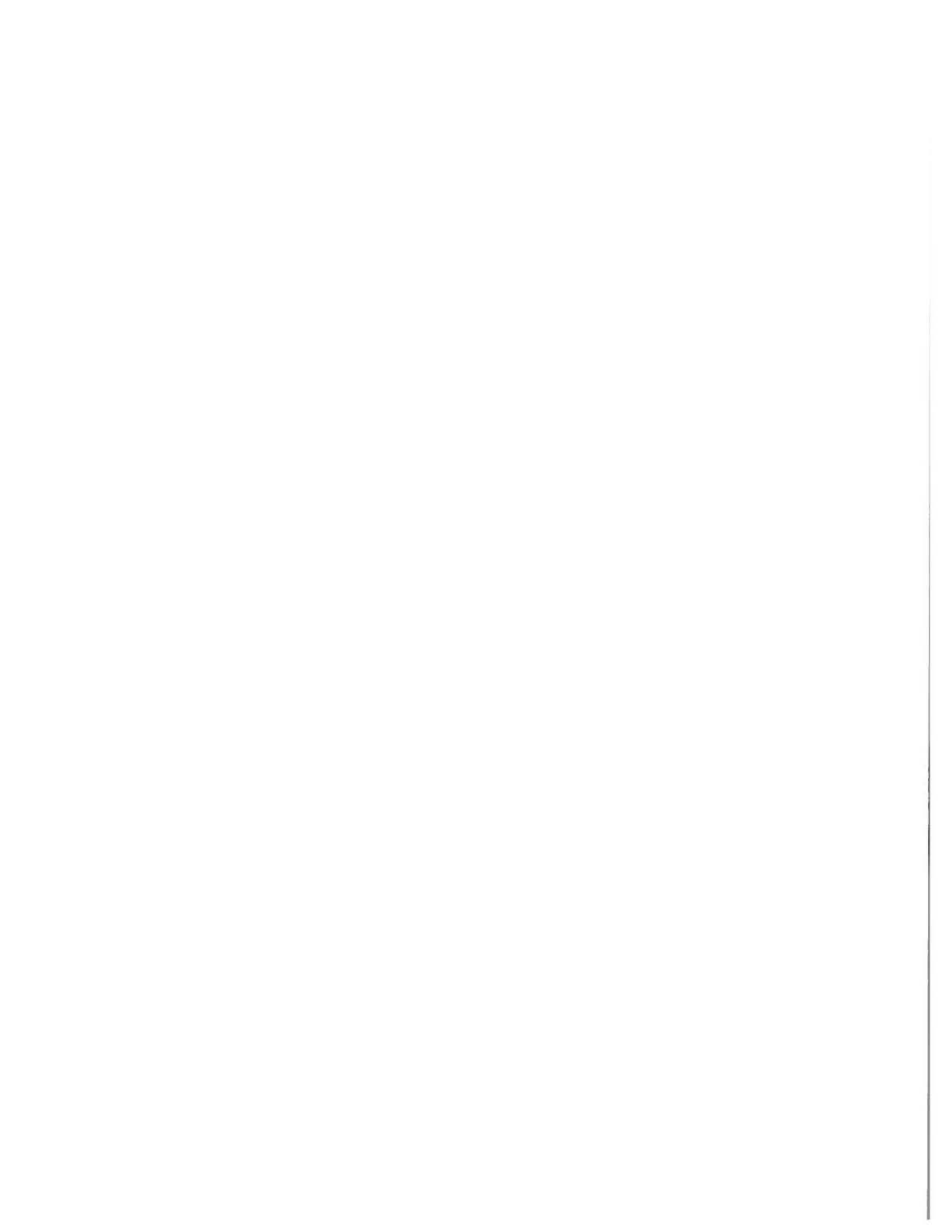


TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABBRÉVIATIONS	v
LISTE DES FIGURES	vi
RÉSUMÉ GÉNÉRAL.....	vii
REMERCIEMENTS	ix
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	4
1.1. LE RÔLE DES VERS DE TERRE DANS L'ÉVALUATION DE LA CONTAMINATION DES SOLS.....	5
1.1.1. CARACTÈRES GÉNÉRAUX	5
1.1.1.1. ÉCOLOGIE	5
1.1.1.2. REPRODUCTION	7
1.1.2. LES ESPÈCES MODÈLES UTILISÉES EN ÉCOTOXICOLOGIE DES SOLS.....	8
1.2. RÉPONSE DES VERS DE TERRE À UNE CONTAMINATION PAR DES XÉNOBIOTIQUES.....	11
1.2.1. RÉSISTANCE AUX XÉNOBIOTIQUES.....	11
1.2.2. EFFETS SUR LA MORTALITÉ	12
1.2.3. EFFETS SUR LE POTENTIEL BIOTIQUE.....	13
1.2.3.1. EFFETS SUR LA REPRODUCTION.....	13
1.2.3.2. EFFETS SUR LA CROISSANCE	13
1.2.4. EFFETS SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE	14
1.2.4.1. IMMUNOLOGIE DES OLIGOCHÈTES.....	14
1.2.4.2. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE.....	15

1.2.5. LE STRESS OXYDANT	16
1.3. LE BIO-MONITORING DES POLLUANTS.....	17
1.3.1. CONCEPT DE BIOMARQUEUR	17
1.3.2. BIOMARQUEURS IMMUNOLOGIQUES.....	18
1.3.2.1. LA PHAGOCYTOSE.....	18
1.3.2.2. ACTIVITÉ DES CELLULES NK	19
1.3.3. INTÉGRITÉ MEMBRANAIRE DES LYSOSOMES.....	19
1.3.4. MÉTALLOTHIONÉINES (MTS) ET MÉTALLOTHIONÉINES-LIKE PROTÉINES (MTLPS)	20
1.3.5. LE STRESS OXYDANT	21
1.3.5.1. LA CATALASE (CAT).....	21
1.3.5.2. LA GLUTATHION S-TRANSFÉRASE (GST).....	21
1.3.5.3. LA SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD)	22
1.4. LES DIOXINES DANS L'ENVIRONNEMENT.....	22
1.4.1. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES.....	22
1.4.2. PRINCIPALES SOURCES D'ÉMISSION DANS L'ENVIRONNEMENT	23
1.4.3. CONTAMINATION DES RÉSEAUX TROPHIQUES	27
1.4.4. DEVENIR DES PCDD/F DANS LES SOLS	28
1.5. LES DIOXINES DANS LES VERS DE TERRE.....	31
1.5.1. BIOACCUMULATION	31
1.5.2. TOXICITÉ.....	32
1. 6. TOXICOLOGIE DES DIOXINES.....	33
1.6.1. MÉCANISME D'ACTION	33
1.6.2. CONCEPT D'ÉQUIVALENCE TOXIQUE	34
1.6.3. TOXICOCINÉTIQUE DES DIOXINES.....	36

1.6.4. EFFETS DES DIOXINES SUR L'ORGANISME HUMAIN	37
1.6.6. VALEURS TOXICOLOGIQUES DE RÉFÉRENCE	38
1.7. L'IMMUNOTOXICOLOGIE CHEZ LES VERS DE TERRE ET SANTÉ ENVIRONNEMENTALE	39
CHAPITRE 2 : CONTEXTE DE L'ÉTUDE	41
2.1. PROBLÉMATIQUE DE MERCIER.....	42
2.2. DONNÉES SCIENTIFIQUES DISPONIBLES	44
2.2.1. PROJET AMR.....	44
2.2.2. INVENTAIRE NATIONAL DES REJETS DE POLLUANTS	47
2.3. OBJECTIFS DE RECHERCHE	47
2.4. HYPOTHÈSES	50
CHAPITRE 3 : IMMUNOTOXICOLOGIE DES DIOXINES CHEZ LES VERS DE TERRE <i>EISENIA ANDREI</i>	51
3. 1. ÉTUDE <i>IN VITRO</i> DES EFFETS IMMUNOTOXIQUES DES PCDD/F SUR LES CELLULES IMMUNITAIRES DES <i>E. ANDREI</i>	52
3. 1. 1. INTRODUCTION	52
3. 1. 2. EFFETS SUR LA PHAGOCYTOSE	52
3. 1. 3. EFFETS DES PCDD/F SUR L'ACTIVITÉ DES CELLULES NK-LIKE	74
3. 1. 4. SYNTHÈSE	92
3.2. ÉTUDE <i>IN VIVO</i> DES EFFETS IMMUNOTOXIQUES DES PCDD/F SUR LES VERS DE TERRE <i>E. ANDREI</i>	93
3.2. 1. INTRODUCTION.....	93
3. 2. 2. TEST DE TOXICITÉ: CONTACT-PAPIER FILTRE.....	93
3. 2. 3. TEST DE TOXICITÉ: CONTACT-SOL	95
3. 2. 4. SYNTHÈSE	117
CHAPITRE 4: ÉCOTOXICOLOGIE DES SOLS DE MERCIER	119

4.1. INTRODUCTION.....	120
4.2. ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES SOLS DE MERCIER SOUS DES CONDITIONS CONTRÔLÉES DE LABORATOIRE	121
4.3. ÉVALUATION <i>IN SITU</i> DE LA TOXICITÉ DES SOLS DE MERCIER SUR DES VERS DE TERRE <i>E.ANDREI</i>.....	149
4.4. SYNTHÈSE	169
CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS	170
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	177
ANNEXES	193

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

BPC : biphényles polychlorés

CAT: catalase

GST: glutathion-S-transférase

HAP : hydrocarbures aromatiques polycycliques

J : jour

MTLPS: « metallothioneins-like proteins »

MTS: « metallothioneins »

NK: « natural killers »

PCDD : polychlorodibenzo-*p*-dioxines

PCDF : polychlorodibenzofuranes

RN: rouge neutre

SOD: superoxyde dismutase

TEF: « Toxic Equivalency Factor »

TEQ: « Toxic Equivalent Quantity »

TRRN: temps de rétention de rouge neutre

C/N : Rapport Carbone/Azote

CEC : Capacité d'échange cationique

MO : Matière organique

ng : nanogramme

pg : picogramme

µg : microgramme

fg : femtogramme

ml : millilitre

Liste des Figures

Figure 1: Processus d'autofécondation chez <i>E.foetida</i>.....	7
Figure 2: Accouplement chez le ver de terre.....	8
Figure 3: Paramètres de reproduction chez <i>E.foetida</i> et <i>E. andrei</i>.....	10
Figure 4: Défense naturelle des vers de terre contre des organismes étrangers.....	16
Figure 5: Structure chimique des PCDD et PCDF.....	23
Figure 6: Inventaire des rejets des principales sources canadiennes de PCDD/F....	25
Figure 7: Principales sources d'émission, de transport environnemental des PCDD/F et modalités d'exposition de l'être humain.....	26
Figure 8: Distribution des PCDD/F dans un sol en fonction de la profondeur.....	29
Figure 9: Patrons des homologues de PCDD/F dans les sols.....	30
Figure 10: Le diagramme de direction des vents à Mercier.....	44
Figure 11: Positionnement spacial de la contamination en PCDD/F.....	45

Liste des tableaux

Tableau 1 : Propriétés des vers de terre.....	6
Tableau 2 : Concentrations des PCDD/F dans les sols dans différentes régions du monde.....	27
Tableau 3 : Facteurs d'équivalence toxique de PCDD/F selon l'OTAN et l'OMS... 	35
Tableau 4 : Récapitulatif des études précédentes sur les substances chimiques immunotoxiques pour les vers de terre.....	39

Liste des annexes

Annexe A : Résultats de l'analyse chimique des PCDD/F pour le projet AMR.....	194
Annexe B : Supplément des résultats sur les tests <i>in vitro</i>.....	196
Annexe C: Supplément des résultats sur les biomarqueurs.....	200
Annexe D: Lettres des éditeurs.....	205

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

Les effets de l'incinération de déchets dangereux sur l'environnement et sur la santé humaine se sont imposés comme étant un problème majeur de ce siècle. Ces effets ont été mis en évidence par un très grand nombre d'études menées sur l'émission de polluants organiques persistants (POP), et particulièrement sur l'émission de dioxines et furanes dont l'une des premières sources est l'incinération de déchets. Notre travail visait une étude écotoxicologique de certains sols en périphérie de l'incinérateur de déchets dangereux de Mercier, en utilisant les vers de terre *Eisenia andrei* comme bioindicateurs. Afin d'identifier et de mieux comprendre le comportement de ces organismes vis-à-vis des sols de Mercier, nous nous sommes proposé d'étudier, dans un premier temps, l'effet d'un mélange de dioxines/furanes sur la réponse immunitaire via des tests *in vitro* et *in vivo* au laboratoire pour prédire les effets dans l'environnement. Ainsi, les expériences de cette première partie de la thèse ont montré que les polychlorodibenzo-*p*-dioxines et les polychlorodibenzofuranes (PCDD/F) modulent le système immunitaire du ver de terre. En effet, dans les tests *in vitro*, une stimulation de la phagocytose et de l'activité des cellules NK-like a été observée pour une concentration sublétales du mélange PCDD/F contenant 25 ng de 2,3,7,8-TCDD/litre. Dans les expériences *in vivo*, le test de toxicité aigüe-contact papier filtre a révélé une inhibition de la phagocytose pour une concentration de mélange contenant 276 µg/cm² et plus de 2378-TCDD. En exposant des *E. andrei* à des sols contaminés par des PCDD/F à différentes concentrations pendant 28 jours, nous avons constaté une diminution significative de la croissance, de la cellularité, et de l'activité phagocytaire des cœlomocytes à une concentration du mélange contenant 1 ng de 2,3,7,8-TCDD/g sol.

Dans un deuxième temps, l'exposition des vers de terre aux sols de Mercier, sous des conditions contrôlées de laboratoire, a mis en évidence que les sols se trouvant sous le panache de l'incinérateur provoquent une diminution significative de la survie et du potentiel biotique, après 28 jours d'exposition. De même, l'étude *in situ* a permis de constater et de confirmer ces mêmes réponses. En effet, il a été observé des mortalités allant de 50 à 80% chez les vers exposés dans des mésocosmes installés sous le panache. De plus, l'évaluation de la croissance chez les vers restants dans ces mêmes mésocosmes annonçait une perte significative de poids. Ces expériences ont également permis de démontrer que ces sols ont

des effets sub-létaux. Cela a été évalué par la mesure de biomarqueurs soient; l'intégrité de la membrane lysosomiale en mesurant le temps de rétention du rouge neutre (TRRN), l'activité phagocytaire et le cycle cellulaire des coelomocytes. Les résultats ont révélé une diminution du TRRN traduisant une fragilité de la membrane lysosomiale considérée comme cible subcellulaire de l'action des métaux lourds et des polluants organiques (e.g. PCDD/F) présents dans les sols. D'autre part, nos expériences de terrain ont mis en évidence une modulation (stimulation ou inhibition) de la réponse phagocytaire et une perturbation du cycle cellulaire des coelomocytes chez les vers exposés sous le panache.

Dans l'ensemble, nos expériences ont montré que le potentiel biotique ainsi que le système immunitaire du ver de terre peuvent être affaiblis suite à l'exposition permanente aux polluants organiques et inorganiques présents dans le sol.

Hayet Belmeskine, M.Sc.
Étudiante

Michel Fournier, Ph.D.
Directeur de recherche

REMERCIEMENTS

Je tiens à témoigner toute ma reconnaissance et mes remerciements à mes responsables scientifiques.

Tout d'abord, au Pr. Michel Fournier, mon directeur de thèse, pour la confiance et le soutien dont il a fait preuve à mon égard tout le long de ce difficile parcours, et pour m'avoir offert un cadre idéal de travail qui m'a permis de mener à bien mon étude. Merci beaucoup, Michel, d'avoir accepté et financé mes participations à différents congrès nationaux et internationaux. Vos encouragements m'ont permis de m'affirmer non seulement en tant que chercheuse en écotoxicologie mais aussi en immunotoxicologie de l'environnement; un monde fascinant que j'ai découvert dans votre laboratoire.

Un grand merci également à mes codirecteurs, la Pre. Louise Vandelac et le Pr. Sami Haddad pour le soutien constant, qu'ils n'ont cessé de m'apporter tout le long de ce travail, tout en me faisant bénéficier de leurs expériences scientifiques très enrichissantes.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude aux personnes qui ont accepté d'être examinateurs pour ce travail.

Je remercie très profondément la Pre. Cathy Vaillancourt, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant la présidence du jury d'évaluation de thèse.

Ma gratitude et mes remerciements vont également à la Pre. Céline Surette et au Pr. Jules M Blais, pour avoir accepté d'être mes examinateurs de thèse malgré leurs nombreuses obligations.

Je suis très reconnaissante au Pr. Pierre Yves Robidoux, professeur associé à l'UQAM et chef de projets dans le groupe d'écotoxicologie appliquée, de l'institut de recherche en biotechnologie du Conseil National de Recherche du Canada (IRB-CNRC), pour l'accueil chaleureux, la compréhension et l'aide matérielle et scientifique qu'il m'a accordé durant ma formation au sein du laboratoire d'écotoxicologie et aussi pour avoir accepté de collaborer à la partie préliminaire concernant les sols de Mercier.

Je tiens aussi à remercier Mme. Pauline Brousseau, Ph.D, adjointe à la direction scientifique du CIRÉ, pour ses conseils et orientations.

Également, je désire remercier les personnes qui m'ont facilité les expériences et m'ont beaucoup appris lors de mes débuts au laboratoire; Marlène Fortier de l'INRS-IAF,

l'assistance de recherche de Michel, et Virginie Bérubé de l'IRB-CNRC, l'assistance de recherche de Pierre Yves Robidoux, tout en me faisant profiter de leurs expériences et compétences techniques.

Je ne saurais oublier l'ancienne technicienne de laboratoire de Sami à l'UQAM, Mme Isabelle Rheault, qui m'a aidé dans mes expériences pour l'analyse des dioxines dans les sols par SPME-GCMS pour la mise au point d'un nouveau protocole comme alternative à la HRGC/HRMS. Ce fût un axe de recherche important orienté vers la chimie environnementale, et même si cette partie n'est pas incluse dans ma thèse, elle restera toujours une de mes perspectives de recherche.

Les échantillonnages sur le terrain et nos expériences *in situ* n'auraient pu être réalisés sans l'aide de deux citoyens de Mercier; Mme. Maude Laberge et Mr. Pierre Lapalme (membre du CVER), qui nous ont facilité l'accès et accompagné dans les différents sites de Mercier visés par notre étude. Merci Maude, Merci Mr. Lapalme, pour votre aide précieuse dans la réalisation de ce travail. Je vous suis très reconnaissante.

La mise en contexte du dossier Mercier a été facilitée par les échanges avec Simon Beaudoin, l'assistant de recherche de la Pre. Louise Vandelac. Merci Simon pour toutes les informations que tu m'as fournis.

Je tiens aussi à témoigner ma reconnaissance envers le personnel administratif de l'IAF, en particulier Jocelyne Ash, Anne Philippon et Josée Labonne pour leur aide, patience et disponibilité. De plus, je voudrais aussi remercier l'équipe de la bibliothèque; Danielle, Diane et Michel pour leur aide dans la recherche bibliographique, la rapidité et l'efficacité de leur travail.

Je désire également remercier sincèrement tous mes collègues passés ou présents au laboratoire, pour leur aide, sympathie, conseils et encouragements. Plus précisément, je remercie Nadjat Benchalgo, Audrey Bruneau, Meriem Birane, Hamida Djouder, Sophie Dusseault, Émilie Farcy, Marie Van Der Berg, Célie Dupuy, Bertrand Bouchard et Kalum Murai.

Mes vifs remerciements et toute ma reconnaissance vont à la Pre. Marie-Hélène Parizeau, professeure à l'université Laval, pour son amitié et pour son soutien constant depuis mon arrivée au Québec. Merci de m'avoir fait confiance et recruté comme assistante de

recherche avant de commencer mon doctorat. Ta rigueur, ta patience, ton esprit critique et ta volonté étaient de précieux enseignements qui m'ont beaucoup aidé à la réalisation de ce travail.

Je tiens finalement à remercier mon mari, Mahieddine, pour sa présence, sa patience et sa compréhension dont il a fait preuve pendant toutes ces années de doctorat. Merci encore à mes enfants, Rayane et Abir, qui ont supporté une maman pas très présente et qui rentrait souvent très tard à la maison à cause des longs temps d'incubation au laboratoire. Enfin, je remercie ma mère, mon frère, ma sœur ainsi que toute ma famille, pour leur aide et soutien constants. Merci également à toutes mes amies; Assia, Zhor, Nissa, Karima, Houda, Sonia et Zoubida, pour leur soutien moral, leur écoute, leur encouragement et aussi d'avoir partagé mes angoisses dans les moments difficiles de ce long parcours.

Un grand merci à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin dans ce travail et dont j'ai oublié de citer les noms.

« Améliorer aujourd'hui les conditions de vie de l'individu, de la famille, de la société, ne signifie rien si demain leurs descendants sont ruinés dans leur santé, ont perdu l'essentiel de leur biens naturels et de leur raison de vivre et si la société, voire l'espèce elle-même, est menacée de déclin. »

Pesson (1974)

INTRODUCTION

Au cours des dernières décennies, les polluants organiques persistants (POP) sont devenus une source d'intérêt majeur en santé humaine et environnementale, en particulier depuis la convention de Stockholm sur les POP (mai 2001). Lors de cette convention, les POP ont été reconnus pour être des composés aux « propriétés toxiques, qui résistent à la dégradation, s'accumulent dans les organismes vivants et sont propagés via l'air, l'eau et les espèces migratrices au-delà des frontières internationales et déposés loin de leur site d'origine, où ils s'accumulent dans les écosystèmes terrestres et aquatiques ».

Les polychlorodibenzo-*p*-dioxines et les polychlorodibenzofuranes (PCDD/F) sont des POP formés accidentellement suite à l'incinération de déchets et à d'autres processus industriels thermiques. Une fois émis, ils se déposent aux alentours de la source et s'accumulent dans les milieux riches en matière organique tels que les sédiments et les sols. Jusqu'à présent, l'incinération de déchets municipaux et industriels a joué le rôle prédominant dans l'émission de PCDD/F dans l'environnement (Domingo *et al.*, 2002; Schuhmacher and Domingo, 2006; Kim *et al.*, 2008; Vilavert *et al.*, 2010; Chiu *et al.*, 2011). À cet effet, le comité Européen de Normalisation avait imposé une valeur limite à l'émission de 0,1 ng/m³ en dioxines aux installations d'incinération (CEN, 1994).

Le sol est le principal récepteur où les PCDD/F émises par différentes sources se déposent et s'accumulent à long terme, comparé à d'autres milieux tel que l'air, qui est en fait le milieu d'exposition directe aux émissions de l'incinérateur, mais où cette exposition est à court terme. Ainsi, le sol a été souvent sélectionné par plusieurs études comme milieu modèle pour le monitoring des dioxines afin d'estimer les impacts des incinérateurs (Abbott *et al.*, 1997; Caserini *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2008). La présence de ces substances dans les sols peut causer des effets létaux et sub-létaux chez les animaux terrestres dont les vers de terre qui représentent 60 à 80 % de cette faune terrestre (Rida, 1994). Or, en dépit du grand nombre d'études sur la toxicité des PCDD/F, ces polluants ont reçu peu d'attention pour la recherche chez les vers de terre qui jouent pourtant un rôle important dans le maintien de la structure et de la fertilité des sols. De plus, plusieurs espèces de vers de terre (*lumbricus terrestris*, *Eisenia fætida* et *Eisenia andrei*) ont été utilisées comme bio-indicateurs de la contamination

des sols aux alentours des incinérateurs pour leur capacité à ingérer et accumuler des substances organiques (pesticides, POP) et inorganiques (métaux lourds).

Dans ce contexte, notre projet vise à mener une étude écotoxicologique de certains sols situés en périphérie de l'incinérateur de déchets dangereux de Mercier; le plus ancien incinérateur installé au Québec, soit depuis 1971. Ce projet de recherche s'inscrit dans le cadre de plusieurs études en cours et d'autres présentées pour l'obtention de subventions, portant sur la catastrophe environnementale de la région de Mercier. Afin de répondre à cette problématique, deux thèmes importants ont été choisis; l'immunotoxicité des PCDD/F chez les vers de terre *Eisenia andrei*, et l'écotoxicologie des sols de Mercier. Avant d'aborder ces deux thèmes, nous présenterons dans un premier temps, une revue de littérature résumant l'état des connaissances sur l'espèce modèle utilisée et son importance dans l'évaluation de la qualité des sols, sur les dioxines dans l'environnement, leur devenir dans les sols et leur accumulation dans les vers de terre, et enfin sur la réponse de ces organismes à différents xénobiotiques en particulier la réponse immunitaire.

Dans un deuxième temps, le contexte de l'étude sera présenté avec la description de la problématique de Mercier, les données scientifiques disponibles, les objectifs et les hypothèses du projet de recherche.

Par la suite, le premier thème de la thèse sera abordé (chapitre 3). Il s'agit d'étudier en laboratoire les effets immunotoxiques des PCDD/F chez les vers de terre *Eisenia andrei*. Le choix de l'étude de l'immunotoxicité est motivé par l'importance du système immunitaire dans l'organisme du fait que « il contribue au maintien de l'intégrité de l'organisme par l'exclusion des constituants étrangers et de constituants du « soi » modifiés. Cette fonction est assurée en étroite relation avec les autres systèmes physiologiques, notamment les systèmes nerveux et endocrinien » (Kouassi *et al.*, 2003). De plus, le système immunitaire est la cible d'une large gamme de polluants environnementaux et la suppression de toute fonction immunitaire (ex. : la phagocytose) réduit la résistance des animaux aux infections. Cette immunodéficience est considérée comme un signe des effets toxiques des polluants environnementaux (Fournier *et al.*, 2000).

Dans le deuxième thème de la thèse (chapitre 4), l'étude écotoxicologique des sols de Mercier sera détaillée. Cette étude a été réalisée en deux étapes principales soient; l'étude du

potentiel toxique des sols de Mercier sous les conditions contrôlées de laboratoire, et l'étude *in situ* en installant des mésocosmes dans les sites présélectionnés dans l'étude de laboratoire. Il est important de noter ici que les résultats des deux thèmes sont présentés sous forme d'articles, donc certaines répétitions sont présentes en particulier sur l'état des connaissances et pour la partie matériel et méthodes. Enfin, cette thèse se terminera par une discussion générale résumant l'interprétation des résultats obtenus et les perspectives de notre projet de recherche.

CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

1.1. LE RÔLE DES VERS DE TERRE DANS L'ÉVALUATION DE LA CONTAMINATION DES SOLS

1.1.1. CARACTÈRES GÉNÉRAUX

Les vers de terre sont des Oligochètes de l'ordre des Lombricidés appartenant au groupe des Annélides clitellates. Appelés aussi cœlomates, ils possèdent un cœlome qui permet la séparation du tube digestif des autres parties du corps ce qui facilite son mouvement indépendamment du corps de l'animal. Le cœlome confère ainsi de l'espace où les organes peuvent croître, et avec le fluide qu'il contient; le liquide cœlomique, il construit un squelette hydrostatique permettant au ver de mieux se mouvoir et peut aussi servir à tamponner les variations de température et à amortir les chocs qui pourraient provoquer des blessures internes (Rouse *et al.*, 2006, Edward *et al.*, 1996).

1.1.1.1. ÉCOLOGIE

Les vers de terre se répartissent en trois catégories selon leurs adaptations écologiques aux conditions du sol (Bouché 1972, Rida 1994) (tableau 1):

- *Les épigés* : Ils vivent à la surface du sol et participent constamment à la dégradation de la matière organique et aux procédés d'humification. Parmi eux, *Eisenia fætida* et *Eisenia andrei*, connus aussi pour leur importante fécondité.

- *Les endogés* : Ils creusent en profondeur dans le sol de larges réseaux de galeries sub-horizontales, se nourrissent de matière organique et se mettent en quiescence pour se défendre contre les mauvaises conditions environnementales telles que la sécheresse. La *Millsonia anomala* et l'*Octolasion cyaneum* font partie de cette catégorie.

- *Les anéciques* : Ils représentent les plus gros vers de terre qui creusent en profondeur dans le sol des galeries sub-verticales. En fait, ils peuvent vivre en surface et en profondeur. En été, ces vers tels que le *Lumbricus terrestris*, subissent un arrêt du développement morphogénique non induit par les conditions environnementales.

Tableau 1: Propriétés des 3 catégories de vers de terre (Rida, 1994)

Propriétés	Épigés	Anéciques	Endogés
BIOLOGIE			
Maturation	Rapide	Modérée	Modérée
Reproduction	Abondante	Très limitée	Limitée
Fécondité (cocons/adulte/an)	Importante 42-106	Faible 3-13	Moyenne 8-27
Régénération	Nulle	Importante	Variable
Respiration	Élevée	Modeste	Faible
Forme de résistance	cocon	diapause	quiescence
CARACTÈRES			
Biomasse (%)			
- Zones tempérées	Très faible	Importante	Moyenne
- Zones tropicales	Faible	Faible	Importante
Taille (mm)	10-30	200-1100	Variable
Pigmentation	Homochromique	Sombre	Apigmenté
Mobilité	Rapide	Modérée	Faible
Galeries	Pas dans le sol	Sub-verticales	Sub-horizontales
Alimentation	Matière organique	Matières organiques et sol	Sol plus ou moins organique
MILIEUX			
Habitat	En surface	En mouvement	En profondeur
pH du sol	2,83-8,16	4,68-8,30	2,83-8,55
C/N du sol	10,5-16,5	9,5-12,0	10,5-15,5
CEC meq/100g sol	0,5-20,7	2,1-20,9	0,1-26,6
Argile (%)	0,1-34,2	6,3-38,7	0,1-45,7
Sable (%)	3,7-83,6	4,5-40,6	2,1-60,3
Intérêt et fonction	<ul style="list-style-type: none"> - Dégradabilité de la MO - Lombricompostage - Appâts - Alimentation des animaux domestiques et sauvages 	<ul style="list-style-type: none"> - Disparition de la litière - Macroporosité et microporosité - Aération, drainage - Structure grumeleuse - Alimentation des animaux sauvages 	<ul style="list-style-type: none"> - Structure grumeleuse - Macroporosité et microporosité - Aération, drainage

1.1.1.2. REPRODUCTION :

Les vers de terre sont hermaphrodites c'est-à-dire qu'ils possèdent des organes mâles et femelles. Cependant, ces gamètes sont séparés pour éviter l'autofécondation. Cette dernière est sujette à une controverse considérable chez les Lombricidés.

Chez *Eisenia fetida*, Dominguez et collaborateurs (2003) ont étudié la reproduction uniparentale chez 84 vers. Il en ressort que 88,2% de ces vers ont subi un transfert bidirectionnel du sperme, 9,8% ont connu un transfert unidirectionnel et un seul individu a été autofécondé (figure 1). À partir de ces résultats, on déduit l'existence et la possibilité de l'autofertilisation mais dont la probabilité reste faible.

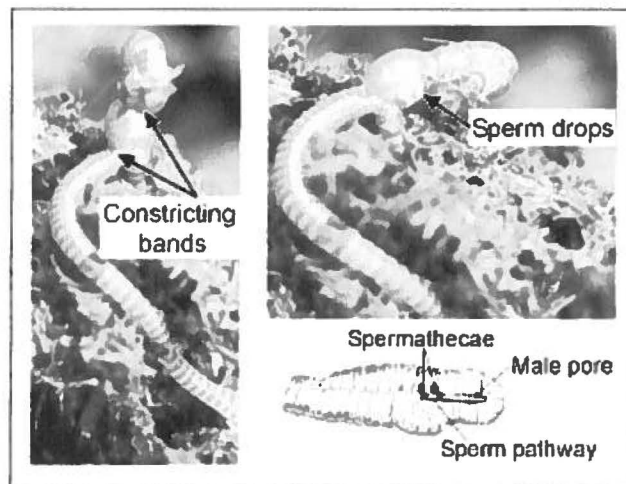


Figure 1: Processus d'autofécondation chez *E. fetida*
(Dominguez, 2003)

L'appareil reproducteur mâle comporte deux paires de testicules et deux paires d'entonnoirs séminaux entourés par trois paires de vésicules séminales où est recueilli (et devient mature) le sperme provenant des testicules, qui par la suite sera conduit jusqu'aux gonopores mâles via les entonnoirs séminaux (figure 2). Quant au système de reproduction femelle, il est composé d'une paire d'ovaires située dans la cavité coelomique. Les œufs produits sont recueillis par des oviductes puis sont conduits aux gonopores femelles, mais ne seront fertilisés que dans le cocon formé une fois l'accouplement établi.

En effet, pour annoncer l'accouplement, le **clitellum**, signature de maturité sexuelle, se gonfle et sécrète un mucus collant qui permettra aux deux vers de s'accoler tête-bêche (figure 2). Ils échangent ainsi leur sperme qui sera provisoirement conservé dans les réceptacles séminaux appelés aussi spermathèques. Après l'accouplement, chaque ver sécrète du mucus qui va former un manchon autour de son clitellum. Ce manchon de mucus va glisser vers le prostomium et donc vers les parties sexuées mâles et femelles. Ainsi, en passant par les gonopores femelles, celles-ci vont libérer leurs œufs dans ce sac de mucus, et arrivant aux spermathèques, du sperme, provenant du partenaire, est aussi relâché dans ce sac qui formera par la suite un **cocon**. Une fois libéré du ver, ce cocon va se retrouver dans le sol et trois semaines plus tard, il subira une éclosion d'où sortiront des juvéniles dont le nombre varie selon l'espèce (Rida, 1994, Edwards *et al.*, 1996).

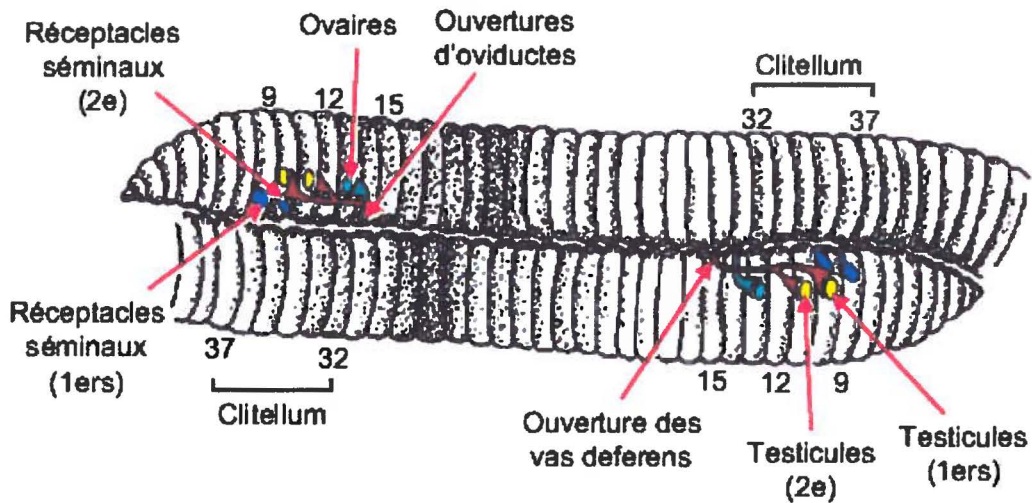


Figure 2: Accouplement chez le ver de terre

1.1.2. LES ESPÈCES MODÈLES UTILISÉES EN ÉCOTOXICOLOGIE DES SOLS

Au cours de ces deux dernières décennies, les vers de terre, en particulier *Eisenia fetida*, ont été intensivement utilisés dans les études écotoxicologiques des sols. Ceci est lié à leur cycle de vie court, la haute vitesse de reproduction et la facilité de leur culture (Lowe 2007). En effet, *Eisenia fetida* est l'espèce la plus recommandée pour les tests standards de

toxicité aiguë (ISO 1993, OCDE 1984) ou chronique (Fischer *et al.*, 1997, Norgrove, 2007). Celle-ci n'est en fait qu'un complexe de deux espèces différentes; *E. fætida fætida* et *E. fætida andrei* (Bouché 1972, Dominguez *et al.*, 2005, Perez-Losada *et al.*, 2005).

Elvira *et al.* (1996) ont montré que la vitesse de croissance et la fécondité sont plus importantes chez *E. andrei* que chez *E. fætida*. Par ailleurs, dans le même contexte, Dominguez *et al.* (2003), ont prouvé que *E. andrei* présente effectivement une fécondité importante (figure 3) ce qui laisse déduire que les deux espèces ont un système de reproduction différent et doivent être distinctement considérées dans les études écotoxicologiques des sols. De plus, pour les études de toxicité aiguë, Bouché (1972) a recommandé l'utilisation de *E. andrei* car elle est génétiquement plus homogène que *E. fætida*.

Toutes ces caractéristiques motivent le choix d'*E. andrei* pour nos tests. En effet son cycle de vie court (maturité atteinte en 7 à 8 semaines) et son rythme de reproduction (2 à 5 cocons/ver/semaine pouvant produire 1 à 6 juvéniles/cocon) nous permettront d'obtenir des organismes rapidement exploitables dans les tests envisagés (Lee, 1985). Toutefois, la reproduction chez le ver de terre peut être altérée en raison de la présence de contaminants qui peuvent inhiber la production de cocons. Ainsi, de nombreux tests standardisés de reproduction ont été développés afin d'évaluer la qualité des sols :

- ISO 11268- 1 (1993) : Qualité du sol, effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fætida*), Partie 1 : Détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sols artificiel.

- ISO 11268-2 (1993) : Qualité du sol, effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fætida*), Partie 2 : Détermination des effets sur la reproduction

- ISO/DIS 17512-1.2 (2007) : Qualité du sol, Essai d'évitement pour contrôler la qualité des sols et les effets des produits chimiques sur le comportement, Partie 1 : Essai avec des vers de terre (*Eisenia fætida* et *Eisenia andrei*)

- OECD ligne directive 222 (2004) : Test de reproduction chez les vers de terre (*Eisenia fætida*/*Eisenia andrei*).

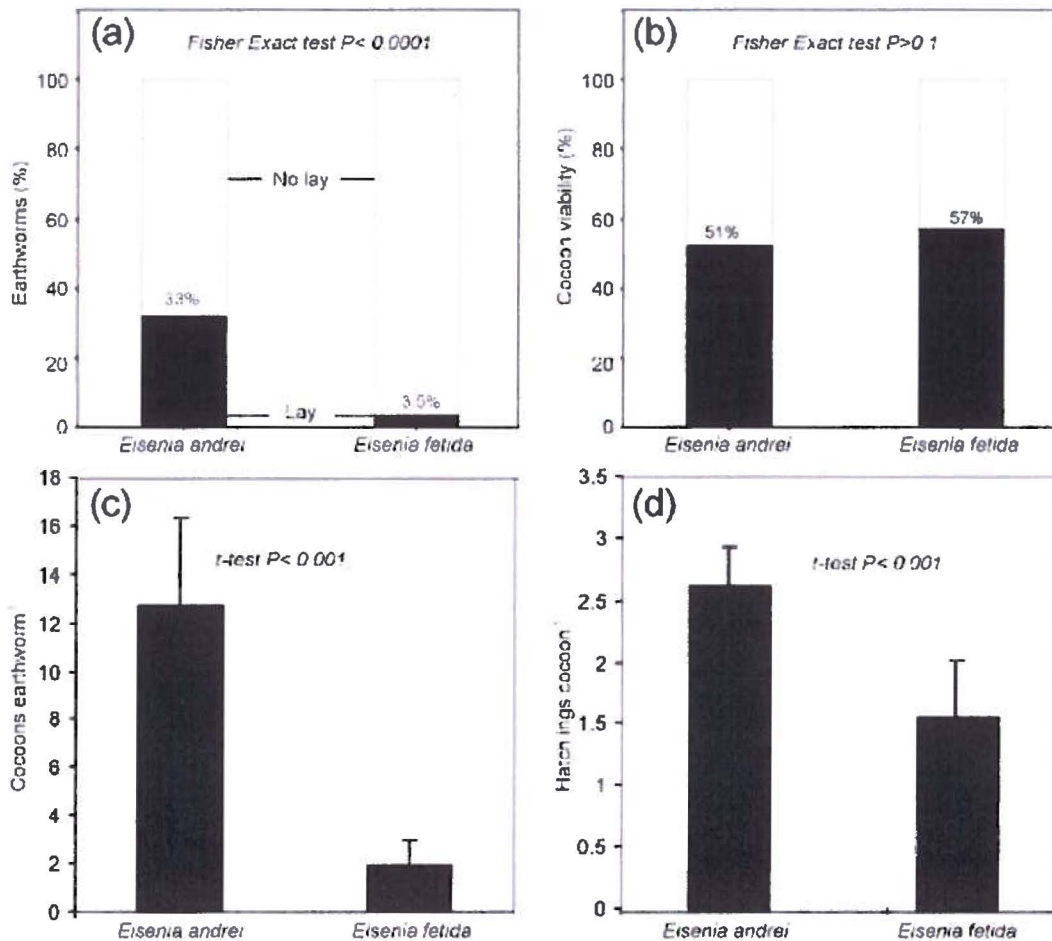


Figure 3: Paramètres de reproduction chez *E. fetida* et *E. andrei*. (a) pourcentage de vers de terre ayant produit des cocons, (b) viabilité des cocons (%), (c) nombre de cocon produit par ver de terre, (d) nombre de juvéniles par cocon (Dominguez *et al.*, 2003).

E. andrei constitue aussi un potentiel important en tant que bioindicateur : étant donné qu'elle est épigée (vie à la surface du sol), elle se trouve donc constamment exposée à tous les contaminants de l'environnement et aux conditions climatiques défavorables. La contamination peut donc être cutanée ou se faire par ingestion de sol contaminé. Face à cette problématique, de nombreuses études ont abordé les risques de la contamination des sols par l'évaluation de la toxicité chez les vers de terre (Robidoux *et al.*, 1999, 2000, 2001, Robidoux 2004 a, b, Lukkari *et al.*, 2005).

1.2. RÉPONSE DES VERS DE TERRE À UNE CONTAMINATION PAR DES XÉNOBIOTIQUES

1.2.1. RÉSISTANCE AUX XÉNOBIOTIQUES

L'évolution de la résistance aux métaux et aux pesticides chez les vers de terre ont été largement étudiées. En effet la capacité de certaines espèces à s'adapter physiologiquement et génétiquement aux contaminants peut permettre aux populations de persister dans des environnements pollués.

Dans ce contexte, deux populations de vers de terre *Apporrectodea tuberculata* prélevées en Finlande, l'une d'un site contaminé par du chlorophénol et l'autre d'un autre site non contaminé, ont été exposés à des sols enrichis par différentes concentrations de pentachlorophénol (PCP). Les CL50 obtenues pour les vers provenant des sites contaminés et non contaminés étaient respectivement de 1,87µg PCP/g et 1,52 µg PCP/g. Les résultats ont montré également que les vers des sites contaminés ont tendance à produire plus de cocons dans le sol enrichi de PCP que dans un sol propre. À l'inverse, des vers prélevés de sols non contaminés produisaient plus de cocons dans un sol propre (Haïmi et Paavola, 1998).

Pour étudier la résistance des vers de terre à la toxicité du cuivre, Langdon et collaborateurs (2001) ont utilisé deux espèces de vers de terre; *Lumbricus rubellus* et *Dendrodrilus rubidus* vivant dans des sites fortement contaminés par les métaux lourds et l'arsenic issus des rejets des mines de Carrock Fell et Devon Great Consols, en Grande Bretagne, et d'autres dans des sites non contaminés. Tous les vers ont été exposés à des sols enrichis de cuivre à 750 mg CuCl₂/kg de sol. L'évaluation semi-quantitative a montré que l'indice de condition, qui définit l'état de santé des vers, était plus élevé chez tous les spécimens à l'exception de ceux provenant des sites non contaminés. Par ailleurs, la concentration en cuivre dans les tissus des vers des sites contaminés n'a pas changé significativement durant l'expérience. Cependant, celle des vers des sites non contaminés a augmenté significativement pendant les 7 premiers jours, suivie d'une mortalité de 90% des vers de terre. Dans cette optique, d'autres études ont été menées sur l'*Eisenia fetida* et ont montré la résistance de cette espèce au zinc, cuivre, cadmium, plomb et arsenic (Spurgeon and Hopkin, 2000).

Il a été démontré aussi que la résistance aux xénobiotiques est liée au système de détoxification permettant la dégradation ou la neutralisation des substances toxiques. Néanmoins, pour une même espèce, on retrouve une variation de la résistance dépendant principalement du mode d'action des xénobiotiques. En effet, la résistance des vers de terre aux pesticides est associée à l'induction des estérases, tandis que ce sont les métallothionéines qui sont impliquées dans la résistance aux métaux (Spurgeon and Hopkin, 2000). Il existe de nombreux mécanismes qui régissent la résistance aux polluants toxiques, tels que; le changement de comportement, l'imperméabilité des téguments aux toxiques, l'augmentation de la vitesse de détoxification et la modification biochimique de la cible cellulaire produisant une insensibilité du site d'action du toxique (Ramade, 2007).

1.2.2. EFFETS SUR LA MORTALITÉ

En écotoxicologie, la mortalité constitue l'un des paramètres principaux qui caractérisent la toxicité aiguë ou chronique d'un polluant. Cette manifestation ultime de la toxicité constitue une mesure absolue et significative du degré de toxicité (Ramade, 2007).

La présence de concentrations suffisantes de polluants, provenant de conditions accidentelles ou lors d'exposition chronique, dans le biotope des vers de terre, peut induire une mortalité par intoxication aiguë ou subaiguë. En effet, une mortalité de 100% a été observée chez des vers *Eisenia fetida* exposés pendant 56 jours à des sols enrichis de 500 et 1000 mg/kg de l'herbicide 2,4-D (l'acide 2,4-dichlorophénoxyacétique). Des taux de mortalité de 30 et 40% ont été aussi obtenus pour des concentrations plus faibles de 2,4-D (Correia and Moreira, 2010).

Afin d'évaluer la toxicité des sols contaminés par des composés organiques polynitriques, tels que; 2,4,6-trinitrotoluène (TNT), 1,3,5-trinitro-1,3,5-triazacyclohexane (RDX) et octahydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tetrazocine (HMX), sur 2 espèces de vers de terre; *Lumbricus terrestris* et *Eisenia andrei*, Robidoux *et al.* (2004) ont entrepris cette étude sous des conditions de terrain et de laboratoire. Ils ont démontré que l'exposition des vers pendant 10 jours dans des mésocosmes (conditions de terrain) a induit une mortalité de plus de 40% dans des sols contenant de 110,6 à 395,9 mg HMX/kg sol. Par ailleurs, la mortalité a atteint 100% après 28 jours d'exposition sous des conditions de laboratoire.

1.2.3. EFFETS SUR LE POTENTIEL BIOTIQUE

1.2.3.1. EFFETS SUR LA REPRODUCTION

Un grand nombre d'études ont porté sur l'impact des polluants environnementaux sur le succès/échec de la reproduction chez différentes espèces d'annélides oligochètes. Les causes de l'échec peuvent se rencontrer à différents stades du processus de reproduction : la gamétogénèse, la maturation des gamètes, la fécondation, le développement embryonnaire, l'éclosion et la mortalité néonatale (Ramade, 2007).

L'exposition à long terme des vers de terre aux polluants, même à de très faibles concentrations, peut, par exemple, perturber leur reproduction en provoquant des anomalies morphogénétiques conduisant à une mortalité intra-embryonnaire. En effet, lors de l'exposition des *Eisenia fetida* à des sols contenant 2 mg/kg de carbofuran, Bouwman et Reinecke (1987) ont observé que les vers de terre ne développaient pas de clitellum et ne produisaient pas de cocons. Robidoux *et al.* (2004) ont démontré aussi que la contamination des sols par des composés organiques polynitriques, tels que TNT, RDX et HMX, diminuent les paramètres de reproduction du *Lumbricus terrestris* et d'*Eisenia andrei*.

1.2.3.2. EFFETS SUR LA CROISSANCE

Un autre effet subléthal des polluants est le ralentissement de la croissance. Cet effet induit un retard de la maturation sexuelle traduit par une éclosion dans une période du cycle annuel qui serait défavorable pour les juvéniles (Ramade, 2007).

Il a été observé qu'un sol contaminé avec 50 mg/kg de diflubenzuron induit une diminution de 84% du poids des vers de terre après 28 jours d'exposition (Ahmed *et al.*, 1991). Dans une étude menée par Yahia *et al.* (2003) sur l'effet de certains pesticides (Aldicarb, cyperméthrin, profenofos, chlorfluazuron, atrazine et metalaxyl) sur les vers de terre *Aporrectodea caliginosa* sous des conditions de laboratoire, il a été démontré qu'après 28 jours d'exposition, tous les pesticides testés provoquaient une diminution du poids et de la vitesse de croissance chez les vers de terre. Cette réduction du poids était accompagnée d'une réduction de la quantité des protéines dissoutes et une élévation de l'activité des

transaminases; glutamic-oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT) et des phosphatases; acid phosphatase (AcP), alkaline phosphatase (AIP).

1.2.4. EFFETS SUR LE SYSTÈME IMMUNITAIRE

Chez les oligochètes, le système immunitaire est localisé dans le cœlome contenant le fluide cœlomique où sont les cœlomocytes qui sont des cellules sensibles aux substances étrangères. Deux populations de cœlomocytes ont été identifiées soient les chloragocytes et les amœbocytes. Les chloragocytes sont des cellules chloragogènes péritonéales de l'intestin mais qui se détachent de celui-ci après être complètement développées et tombent dans le fluide cœlomique. Ayant des fonctions excrétrices, les chloragocytes représentent également le siège d'une partie importante du métabolisme glucidique et protidique. Par ailleurs, les amœbocytes (petits et larges) sont des cellules phagocytaires ayant aussi la capacité de synthétiser et de sécréter des molécules antimicrobiennes. Tous les cœlomocytes sont impliqués dans les processus de l'immunité cellulaire, et via leurs sécrétions, dans l'immunité humorale (Dhainaut and Scaps, 2001).

1.2.4.1. IMMUNOLOGIE DES OLIGOCHÈTES

Depuis plusieurs décennies, il a été démontré que le ver de terre possède une immunité naturelle comprenant des éléments cellulaires et humoraux (Goven *et al.*, 1993b).

L'immunité cellulaire contre les agents pathogènes est particulièrement développée chez les annélides oligochètes. Les réponses cellulaires prédominantes sont; la phagocytose, l'encapsulation, la cytotoxicité et le rejet de greffe (Dhainaut and Scaps, 2001). Les premières études menées sur la réponse immunitaire des vers de terre ont concerné la cytotoxicité des amœbocytes. Les résultats ont révélé une corrélation entre la morphologie et la fonction des cellules. En effet, il a été démontré que la lyse de cellules cibles est effectuée par les petits amœbocytes et les débris sont éliminés par les plus larges amœbocytes via la phagocytose ou la formation du granuloma. Il a été démontré que l'activité phagocytaire est stimulée par l'ingestion de cibles opsonisées par des anticorps IgG ou par le fragment C3b (Bilej *et al.*, 2010). Par ailleurs, les expériences de transplantation ont mis en exergue que les vers de terre sont capables de reconnaître et de rejeter les greffes de tissus étrangers et d'accepter les autogreffes. Il est important de noter aussi que les petits amœbocytes sont positifs aux

marqueurs cellulaires CD11a, CD45RA, CD45RO, Cdw49B, CD54, Thy-1 (CD90) et β_2 -microglobuline. Cependant, les plus larges amœbocytes leur sont négatifs (Cooper and Roch, 2003).

Quant aux réponses humorales, certaines molécules antimicrobiennes ont été identifiées chez les oligochètes, telles que les agglutinines, les lysozymes, les protéases. Les agglutinines permettent l'agrégation de particules étrangères, en particulier les bactéries, ce qui facilite les processus de phagocytose et d'encapsulation. Plusieurs cytokines ont été également détectées comme les fétidines, CCF-1 (Cœlomic cytolytic factor), les lysénines et les lumbricines. Les fétidines sont des lipoprotéines (40 et 45 kDa) antibactériennes et hémolytiques qui constituent environ 75% de l'activité antibactérienne du fluide coelomique. Mélangées au mucus, les fétidines couvrent le ver de terre et constituent ainsi une barrière antimicrobienne externe non spécifique. Le CCF-1 est une protéine (42 kDa) opsonique et hémolytique, capable de lyser certaines cellules cancéreuses cibles. Les lysénines (41 kDa) présentent des propriétés biologiques et biochimiques similaires aux fétidines et CCF-1. Cependant, il a été démontré que la lumbricine I révélait une activité antimicrobienne contre les bactéries Gram-négatif et Gram-positif mais ne présentait pas une activité hémolytique contre les erythrocytes humains (Dhainaut and Scaps, 2001; Kauschke *et al.*, 2007).

1.2.4.2. LA RÉPONSE IMMUNITAIRE

La première ligne de défense des vers de terre contre une agression bactériologique a lieu au niveau du tégument en impliquant différentes protéines cytotoxiques et peptides antimicrobiens synthétisés par les cellules de l'épiderme. En effet, l'épiderme des vers de terre comprend des cellules de soutien, des cellules sensorielles et de nombreuses cellules muqueuses. De ce fait, la première protection provient de la sécrétion du mucus qui va couvrir l'animal. Le mucus est un mélange d'eau, d'électrolytes et d'un nombre de macromolécules incluant des glycoprotéines, des mucopolysaccharides, des lectines et des hémocyanines (Pan *et al.*, 2010). Lorsque les organismes étrangers traversent la barrière du tégument et envahissent la cavité coelomique, ils vont être expulsés directement via les pores dorsaux et excrétés par les néphridies comme ils peuvent être ingérés par les coelomocytes. De plus que, les facteurs humoraux sont impliqués dans leur élimination car les bactéries agglutinées

peuvent être encapsulées. Les substances antimicrobiennes présentes dans le fluide cœlomique préviennent la multiplication des bactéries et les opsonines facilitent leur phagocytose (figure 4) (Cooper *et al.*, 2002).

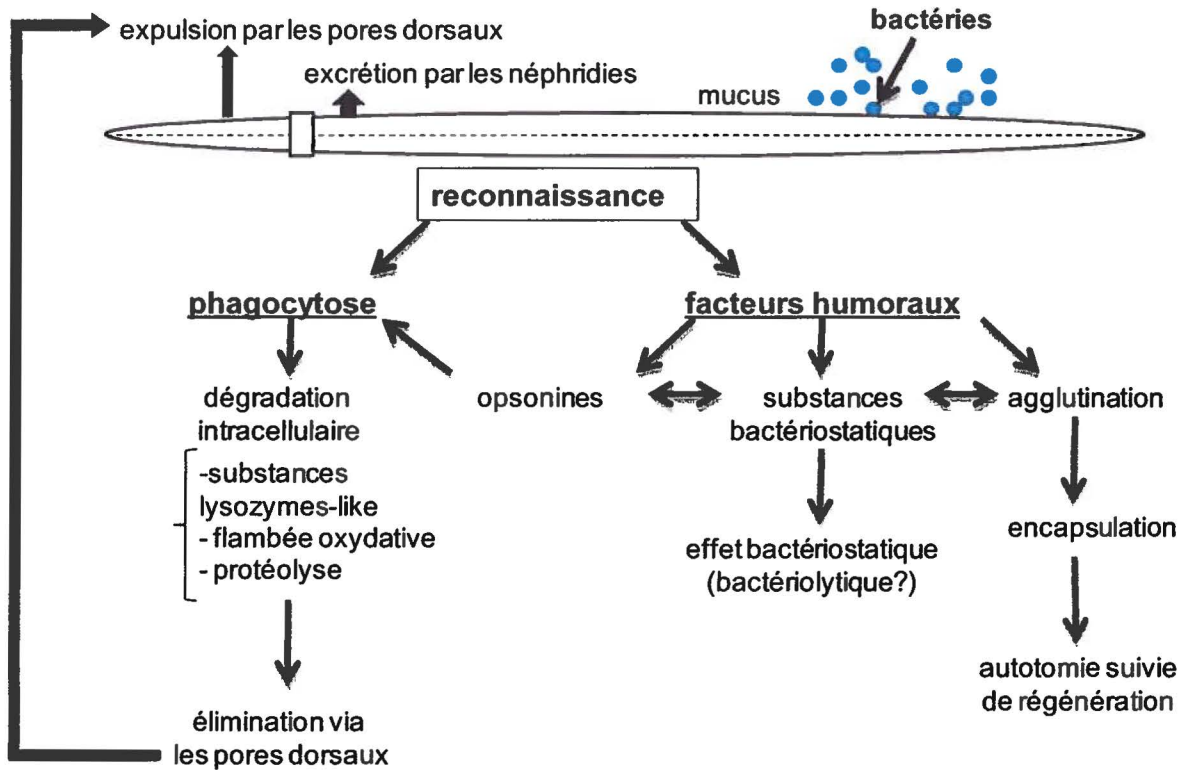


Figure 4: Défense naturelle des vers de terre contre des organismes étrangers (ex. : bactéries) (inspirée de Cooper *et al.*, 2002). Le mucus sécrété constitue la première barrière protectrice. Les bactéries se trouvant dans le cœlome seront éliminées soit par expulsion via les pores dorsaux et les néphridies ou par ingestion par les cœlomocytes. Les facteurs humoraux sont également impliqués dans leur élimination.

1.2.5. LE STRESS OXYDANT

Au niveau cellulaire, la réponse biologique à la présence de xénobiotiques se traduit par une perturbation allant à l'inhibition du système de défense antioxydant développé par l'organisme contre les espèces oxygénées activées (EOAs) produites naturellement par l'oxygène au niveau des mitochondries. Le résultat de ce déséquilibre entre les EOAs et les

agents antioxydants est connu comme stress oxydant, avec pour conséquence, l'apparition de dégâts souvent irréversibles pour la cellule (Perottoni *et al.*, 2004). Pour lutter contre ce déséquilibre, l'organisme développe naturellement des systèmes de défense antioxydants afin de réguler la production des espèces oxygénées actives. Ces systèmes antioxydants se composent d'enzymes telles que; la superoxyde dismutase (SOD) et la catalase (CAT), des oligo-éléments, des vitamines (A, E, C), des protéines transporteuses de fer (transferrine, ferritine), le Glutathion, etc.

Dans une étude récente sur des vers *Eisenia fætida*, des chercheurs ont expérimenté l'effet du toluène, de l'éthylbenzène et du xylène sur l'activité de la SOD et de la CAT, afin d'évaluer le stress oxydant. Les résultats ont révélé une inhibition des enzymes avec l'augmentation des concentrations des polluants. En effet, une concentration de toluène de 5 mg/kg était suffisante pour inhiber l'activité de la SOD et de la CAT. Par ailleurs, des concentrations de 5 et 10 mg/kg de xylène ont provoqué l'inhibition significative de respectivement la CAT et la SOD (Liu *et al.*, 2010).

Pour évaluer les effets toxicologiques de certaines nanoparticules présentes dans le sol sur les vers de terre *E. fætida*, Hu et collaborateurs (2010) ont observé que des concentrations de 1 g TiO₂/kg sol et 0,1 et 0,5 g ZnO/kg sol induisent un stress oxydant.

1.3. LE BIO-MONITORING DES POLLUANTS

1.3.1. CONCEPT DE BIOMARQUEUR

Un biomarqueur est défini comme étant une réponse biologique à une exposition, ou à un effet toxique d'une substance chimique (Peakall et Shugart, 1993). Les raisons majeures de l'intérêt récent porté au biomarqueurs sont liées aux limites des approches classiques de la toxicologie environnementale où seule la concentration chimique présente dans l'environnement ambiant interprétait les effets sur les organismes, tels que; la mortalité, la reproduction ou la croissance (Scott-Fordsmand *et al.*, 2000). Cependant, sous les conditions variables de l'environnement, la disponibilité des contaminants peut changer ce qui rend difficile l'extrapolation des données de laboratoire aux conditions variables du terrain. De ce fait, les biomarqueurs abordent la question de toxicologie par quantification de la fraction

bioactive du polluant (Weeks, 1996). Toutefois, pour l'estimation d'un problème, la relation dose-réponse entre le niveau d'exposition et la réponse du biomarqueur reste essentielle.

Plusieurs biomarqueurs ont été étudiés chez les vers de terre, mais dans l'étude ici proposée nous sommes limités et focalisés principalement sur certains biomarqueurs immunologiques soient; la phagocytose et l'activité des cellules NK. De plus, nous avons étudié l'intégrité membranaire des lysosomes par la mesure du temps de rétention du rouge neutre, les métallothionéïnes et les enzymes du stress oxydant.

1.3.2. BIOMARQUEURS IMMUNOLOGIQUES

1.3.2.1. LA PHAGOCYTOSE

L'une des réponses immunitaire est la phagocytose. Il s'agit de l'ingestion de particules étrangères par certaines cellules (macrophages, hémocytes, cœlomocytes) comprenant leur fixation à la surface du phagocyte, leur internalisation et leur destruction.

Fournier et collaborateurs (2000) ont démontré que des cellules phagocytaires telles que les macrophages, peuvent être utilisées comme biomarqueurs de l'immunotoxicité chez différentes classes de vertébrés et d'invertébrés. Par ailleurs, Sauvé et son équipe (2002) ont défini que les métaux lourds à l'état de trace (Ag, As, Cd, Hg, Mo, Ni, Pb, Se et Zn) ont un potentiel à inhiber la réponse de la phagocytose chez les cœlomocytes extrudés de différentes espèces de vers de terre.

Chez *Eisenia andrei*, une étude menée par Sauvé et Fournier (2005) sur l'effet du méthylmercure (CH_3HgCl) sur le système immunitaire des vers à différents âges a montré que la phagocytose des vers immatures est plus sensible au CH_3HgCl que celle des vers matures. Il a aussi été démontré que l'exposition aiguë ou chronique des *L. terrestris* aux biphényles polychlorés (BPC) peut causer l'inhibition de l'activité phagocytaire (Goven *et al.*, 1994; Ville *et al.*, 1995). Ainsi, on retient l'importance de la phagocytose dans la défense immunitaire et sa sensibilité vis-à-vis de différents xénobiotiques environnementaux chez des espèces différentes des vertébrés et des invertébrés.

1.3.2.2. ACTIVITÉ DES CELLULES NK

Les cellules tueuses naturelles (NK) sont capables de lyser certaines cellules cibles (e.g. cellules tumorales) sans l'intervention des antigènes d'histocompatibilité ni d'anticorps. Ces mêmes cellules trouvées chez les vertébrés ne sont pas présentes chez les invertébrés (Fournier *et al.*, 2004). Cependant, une forme similaire naturelle de cytotoxicité a été démontrée pour la première fois par Boiledieu et Valembois (1977) chez des annélides, dans les *Sipunculoidea*. Par la suite, cette cytotoxicité spontanée a été étudiée *in vitro* sur différentes espèces d'oligochètes et ces cellules tueuses sont dites NK-like.

Chez *E. fætida*, de nombreuses études ont mis en évidence la capacité des cœlomocytes à lyser des cellules tumorales humaines K562, ainsi que d'autres lignées tumorales de mammifères soient; Hela, Hep-2, PC-12 et PA317 (Patel *et al.*, 2007, Engelmann *et al.*, 2004, Quaglino *et al.*, 1996). Dans des tests *in vitro*, des chercheurs ont prouvé que l'exposition des cœlomocytes aux xénobiotiques peut diminuer de manière significative la capacité cytotoxique. En effet, une concentration de 100 µM de 7,12 diméthylbenz[a]anthracène (DMBA) a causé l'immunosuppression de la cytotoxicité chez *E. fætida* (Patel *et al.*, 2007).

1.3.3. INTÉGRITÉ MEMBRANAIRE DES LYSOSOMES

Au niveau subcellulaire, le système lysosomal a été identifié comme cible particulière pour les effets toxiques des xénobiotiques (Moore, 1990). Chez les vers de terre, le liquide cœlomique contient plusieurs types de cellules dont les cœlomocytes; cellules immunitaires non-spécifiques. Chacune de ces cellules renferme des lysosomes dont l'activité consiste à dégrader des substances extracellulaires d'origine exogène ou des substances intracellulaires d'origine endogène (Pellerin-Massicotte et Tremblay, 1998). La variation de la stabilité de la membrane lysosomiale est considérée comme une réponse aux facteurs de stress (Scott-fordsmand et Weeks, 2000).

Dans des lysosomes stables, les hydrolases de substances acides sont empêchées de réagir avec des substrats par une membrane intacte. En présence d'un stress, la stabilité de cette membrane diminue et sa perméabilité augmente. Les mécanismes provoquant cette altération restent flous mais peuvent varier avec le type de stress. En effet, la peroxydation des

lipides et l'inhibition de la pompe à protons semblent causer la fragilisation de la membrane lysosomiale (Honsi et Stenersen, 2000).

Chez *E. fætida* et *E. andrei*, les changements de l'intégrité lysosomiale dus à un stress chimique causé par le cuivre, ont été étudiés par Svendsen et Weeks (1997a). Une réduction du temps de rétention du rouge neutre (RN) avec l'augmentation de la concentration du cuivre dans le sol a été observée.

Le RN n'est en fait qu'un révélateur de la stabilité de la membrane lysosomiale. En effet, si l'organisme est en bonne santé, le RN qui a pénétré dans la cellule et recueilli par les lysosomes, va y rester, on verra alors des cellules blanches. Par contre, en présence d'un stress, les lysosomes ne pourront pas retenir le RN, il sera donc relâché et se diffusera dans tout le cytosol, rendant ainsi les cellules rouges. La fragilité de la membrane lysosomiale constitue un biomarqueur cytologique simple et non dispendieux.

1.3.4. MÉTALLOTHIONÉINES (MTS) ET MÉTALLOTHIONÉINES-LIKE PROTÉINES (MTLPS)

Les métallothionéines (MTs) sont de petites protéines composées de 61 à 68 acides aminés (complètement dépourvues d'acides aminés aromatiques et d'histidine), de faible poids moléculaire (6 – 7kDa) et contenant une concentration élevée de cystéine (30%). La cystéine contient des groupements thiols (-SH) qui ont la capacité de se lier à des métaux tels que; le zinc, le mercure, le cadmium et le cuivre (Ndayibagira *et al.*, 2007). En effet, ils peuvent lier 6 à 7 atomes de métal par molécule de protéine. Les MTs sont induites par la présence de métaux exogènes ou d'autres facteurs comme la température, les hormones, les antibiotiques, etc. Toutefois, l'induction due aux métaux est plus élevée que celle par les stimulants non métalliques (Van Cleef-Toedt *et al.*, 2000, Coyle *et al.*, 2002). Les MTs sont présentes dans tous les organismes et leur rôle principal est de réguler les concentrations intracellulaires de certains métaux essentiels à l'organisme, soient; le zinc et le cuivre en les séquestrant. Ceci va inhiber leur mobilité à l'état libre dans les tissus et évitera donc leur fixation sur d'autres protéines vitales. Par ailleurs, les MTs sont connues pour leur importance dans la détoxification des métaux lourds et dans la protection de la cellule contre le stress oxydant (Klaassen *et al.*, 1999).

Chez les vers de terre, il y a un intérêt croissant pour l'utilisation des MTs comme biomarqueur de l'exposition aux métaux lourds présents dans le sol (Dallinger, 1996, Scott-Fordsmand et Weeks, 2000, Ndayibagira *et al.*, 2007). Les MTLPs ont été identifiées chez *Eisenia fetida*, *Lumbricus terrestris* et chez d'autres annélides. Elles contiennent moins de cystéine et possèdent des acides aminés aromatiques et un pourcentage élevé en glycine (plus de 18%) (Dallinger, 1996, Fordsmand et Weeks, 2000).

1.3.5. LE STRESS OXYDANT

1.3.5.1. LA CATALASE (CAT)

La CAT est une enzyme capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en oxygène et en eau. Elle est localisée dans les peroxysomes de plusieurs cellules et est impliquée dans le métabolisme des acides gras (Frew and Jones 1984, Prento and Prento 1984).

Dans une étude *in vivo*, Labrot et collaborateurs (1996) ont observé une réduction de l'activité de la CAT chez *Eisenia andrei* exposée au plomb et au cadmium. Dans le même contexte, des études *in vitro* ont montré des résultats similaires (Labrot *et al.*, 1996). Song et collaborateur (2009) ont rapporté que l'activité de la CAT chez les vers de terre est stimulée par de faibles concentrations d'atrazine et inhibée par de fortes concentrations.

1.3.5.2. LA GLUTATHION S-TRANSFÉRISE (GST)

C'est une enzyme généralement présente dans tous les organismes et qui est un constituant majoritaire des cellules animales. Elle fait partie des enzymes de biotransformation qui ont un rôle important dans la conjugaison de molécules lipophiles avec des substrats électrophiles (Scott-fordsmand et Weeks, 2000). Les GSTs sont considérées comme un système de défense, fournissant des enzymes de détoxification, contre des produits formés à partir de réaction avec l'oxygène (Stenersen *et al.*, 1987). Toutefois, ce système peut être affecté par différentes substances chimiques dans plusieurs espèces d'organismes aquatiques ou terrestres (Mayer *et al.* 1992, Peakall et Walker 1994).

La mesure de l'activité de la GST a été étudiée dans différentes espèces de vers de terre, mais la première étude qui a montré l'induction de la GST est celle menée par Stenersen et

son groupe en 1979. Ils ont mesuré une activité considérable chez six espèces de vers de terre exposés au 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB), une faible activité après une exposition au 3,4-dichloro-1-nitrobenzène et aucune avec le trans-4-phenyl-3-butène-2-one (TRANS). Ainsi l'induction de la GST diffère en fonction de l'espèce de ver de terre et entre les différents tissus (Stenersen 1992).

1.3.5.3. LA SUPEROXYDE DISMUTASE (SOD)

La SOD est une enzyme qui catalyse la dismutation de l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène. C'est une partie essentielle du système de défense contre les radicaux libres. En effet, la SOD réduit la concentration du superoxyde dans les tissus vivants en l'empêchant de manifester sa toxicité. Il s'agit donc d'une enzyme antioxydante (Peskin, 2000, Radetski, 2004).

Récemment, il a été démontré que les nanoparticules de ZnO à de faibles concentrations dans les sols (< 1g/kg sol) induisent une stimulation de l'activité de la SOD chez *E. fetida*. À l'inverse, des concentrations plus élevées (5 g/kg) provoquent son inhibition (Hu *et al.*, 2010).

1.4. LES DIOXINES DANS L'ENVIRONNEMENT

1.4.1. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES

Les dioxines regroupent les PCDDs et les PCDFs. Ce sont des composés organiques aromatiques tricycliques chlorés ayant une structure chimique très voisine (figure 5) et des propriétés communes telles que la stabilité et la bioaccumulation, ce qui explique une similarité de leurs effets toxiques (Reiner *et al.*, 2006, Srogi 2007)

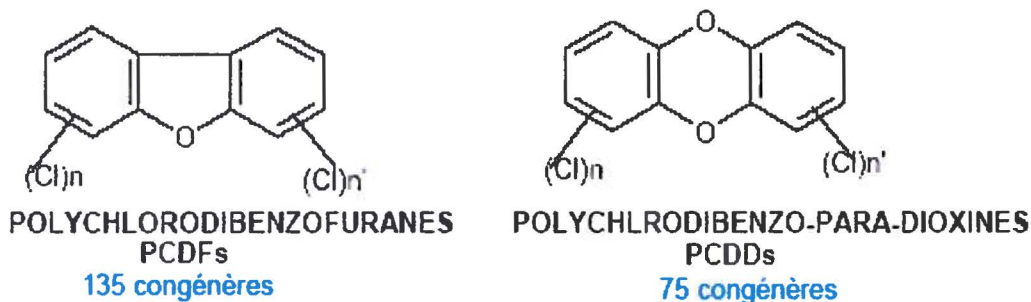


Figure 5: Structure chimique des PCDD et PCDF

(n=1- 4, n'=0- 4) (Srogi 2007)

Dans ces molécules, c'est le nombre (1 à 8) et la position des atomes de chlore qui déterminent le nombre d'homologues à ces composés. En effet, il existe 75 PCDDs et 135 PCDFs nommés congénères (tableau 3, page 35), dont 17 caractérisés par un minimum de 4 atomes, qui sont considérés comme toxiques en particulier la 2, 3, 7, 8-tétrachlorodibenzo-*para*-dioxine (TCDD) connue sous le nom de dioxine de « Seveso » (ATSDR 1998, ATSDR 2006).

1.4.2. PRINCIPALES SOURCES D'ÉMISSION DANS L'ENVIRONNEMENT

Les dioxines sont des sous-produits involontaires des réactions de synthèse de produits chimiques chlorés tels que; le pentachlorophénol, le chloranil, ou lors de traitements chimiques au chlore ou aux perchlorates (Rappe, 1992).

La TCDD est rendue célèbre à l'issue de l'accident industriel survenu dans une usine de production de 2, 4, 5- trichlorophénol à Séveso en Italie le 10 juillet 1976, provoquant la libération de 1 à 5 kg de 2, 3, 7, 8-TCDD dans l'atmosphère. Quatre jours après l'accident, les premiers cas de chloracné apparaissaient dont la cause essentielle fût la 2, 3, 7, 8-TCDD identifiée par les laboratoires Hoffman-Laroche. Par la suite, les feuilles des arbres jaunissaient et les animaux domestiques mourraient par dizaines. Enfin ce n'est que 7 ans plus tard, qu'un bilan a été établi faisant état de 193 personnes atteintes de chloracné en particulier des enfants, mais aucun décès n'a été signalé. Par contre, 3300 animaux domestiques sont morts intoxiqués, ce qui a fait de cet accident une catastrophe environnementale (Steeland *et al.*, 2004).

En fait, c'est en 1956 que la structure chimique du TCDD a été identifiée pour la première fois par Sandermann et collaborateurs qui furent les premiers à la synthétiser. Le technicien de laboratoire qui travailla sur la synthèse fût, par la suite, hospitalisé pour chloracné aigu (Parneggiani, 1984).

Concernant la synthèse de dioxines, la littérature décrit deux méthodes (Weber 2007) :

La première dite de novo consiste à former des dioxines à partir de réactions faisant intervenir le carbone et l'oxygène en présence de chlore et d'un catalyseur à des températures d'environ 350 °C. On retrouve ce type de synthèse dans les procédés ayant une étape de combustion soient :

- L'incinération de déchets ménagers, hospitaliers et industriels (QuaB, 1997);
- L'industrie sidérurgique (Grochowalski *et al.*, 2007, Sofilic *et al.*, 2006);
- La combustion de mazout, et des huiles de chauffage (Delistraty *et al.*, 2007, Hyun-Tae *et al.*, 2007);
- Les feux de forêts et les éruptions volcaniques (QuaB, 2000);
- La combustion du tabac;

La deuxième voie de synthèse est à l'aide de précurseurs; en effet, le 2, 4, 5 trichlorophénol contribuant dans la synthèse de l'herbicide 2, 4, 5-T peut aussi induire à la formation de TCDD à partir d'une réaction de condensation-cyclisation (Hay, 1979). Le pentachlorophénol, agent conservateur de bois, peut produire de l'OCDD.

Au Canada comme dans plusieurs autres pays (ex.: France), l'incinération de déchets reste la source majeure de libération de dioxines dans l'atmosphère. Tel que rapporté dans l'inventaire d'environnement Canada (2001) et malgré la diminution des émissions au cours des dernières années, il apparaît clairement que l'incinération de déchets médicaux ou dangereux représente les taux les plus élevés en TEQ par année, en plus de l'industrie de frittage de fer (Figure 6).

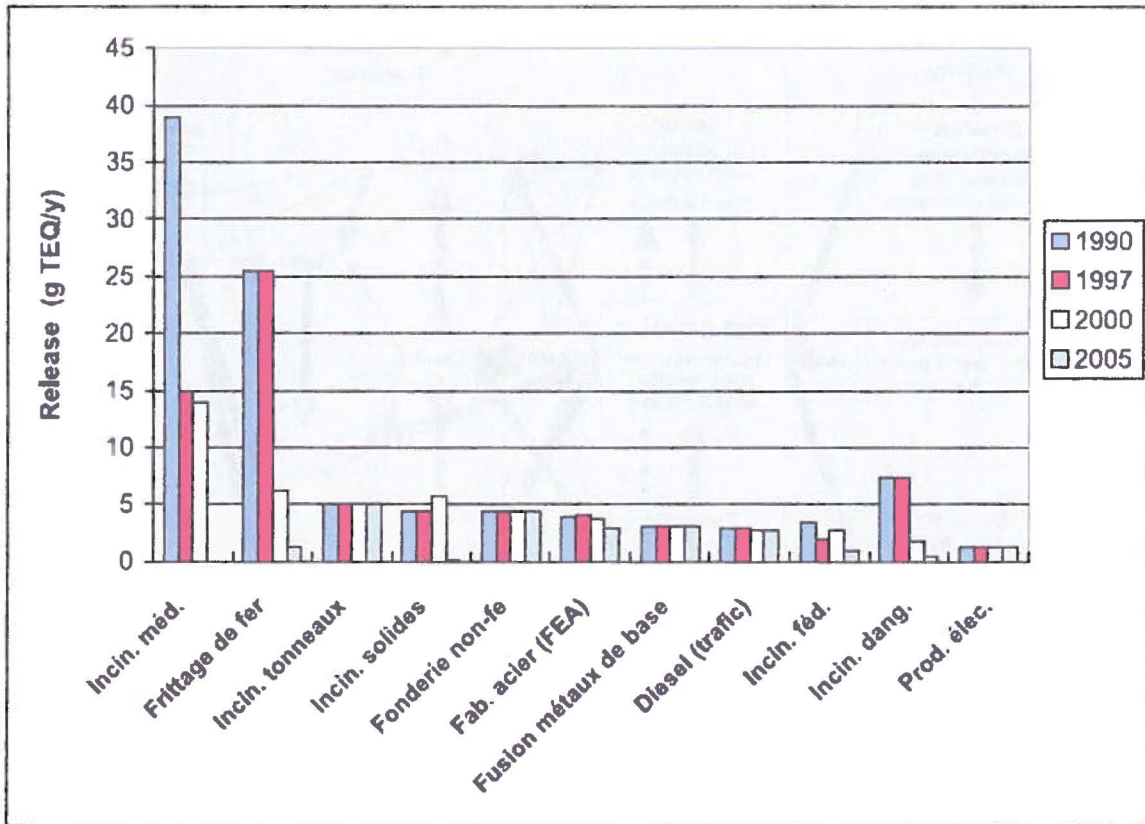


Figure 6 : Inventaire des rejets des principales sources canadiennes de PCDD/F (Environnement Canada, 2001). L'incinération de déchets médicaux est le contributeur principal dans la concentration des rejets dans l'environnement canadien, en plus de l'industrie du frittage de fer et l'incinération de déchets dangereux (la valeur du TEQ en 2005 est une estimation).

Weber *et al.*, (2008) résumant dans la figure 7 les différentes sources d'émission des dioxines dans l'environnement, leur transport environnemental et les voies majeures d'exposition de l'être humain. Dans cette même étude, il a été discuté de l'atteinte directe de la chaîne alimentaire par les PCDD/F sans les processus de bioaccumulation/bioamplification environnementaux normaux.

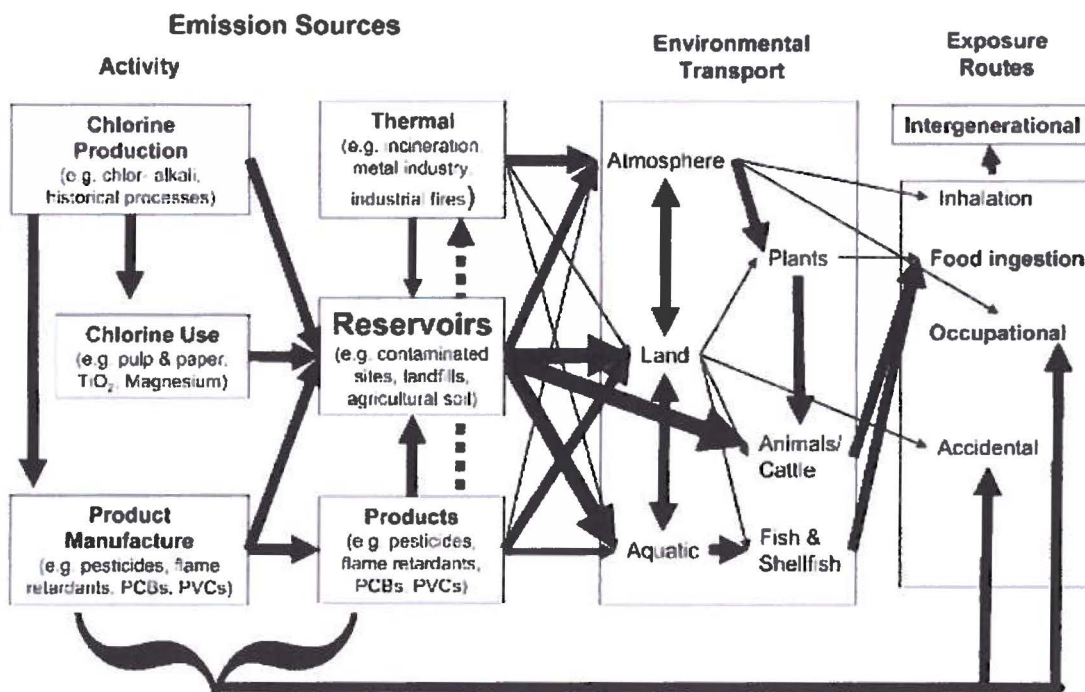


Figure 7: Principales sources d'émission, de transport environnemental des PCDD/F et modalités d'exposition de l'être humain (Weber *et al.*, 2008). Le sol est l'un des réservoirs de stockage pris en compte.

Enfin, plusieurs chercheurs se sont investit dans le suivi de la déposition des PCDD/F dans les sols avoisinant les incinérateurs. Le tableau 2 résume les niveaux environnementaux évalués par des études précédentes.

Tableau 2 : Concentrations des PCDD/F dans les sols avoisinant des incinérateurs dans différentes régions du monde

Région	Concentration pg-I-TEQ/g	Référence
Ohio, USA	4-60	Lorber et al. (1998)
Belgique	3,90-27,7	Nouwen et al (2001)
Reggio Emilia, Italie	1,9-63,0	Capuano et al. (2005)
Catalonia, Espagne	0,14-0,80	Schuhmacher et al. (2006)
Catalonia, Espagne	0,14-0,46	Rovira et al. (2010)
Barcelona, Espagne	1,22-34,28	Domingo et al. (2002)
Nationwide, Korea	0,00-153,23	Kim et al. (2008)
Buchon, Korea	1,25-74,98	Oh et al. (2006)
Hsinchu, Taiwan	0,52-5,02	Cheng et al. (2003)
Taiwan (nord)	2,52-8,72	Wang et al. (2009)
Hangzhou, Chine	0,6-6,38	Xu et al. (2009)

1.4.3. CONTAMINATION DES RÉSEAUX TROPHIQUES

Les PCDD/F sont présents dans l'air, l'eau et le sol. Ces molécules sont considérées comme des contaminants redoutables des réseaux trophiques où elles subissent des phénomènes de bioconcentration et de bioamplification. Ceci représente un risque majeur de contamination de toute la biomasse d'un écosystème. Il est aussi évident que ces polluants sont susceptibles de se bioconcentrer dans les chaînes trophiques (Ramade, 2007).

Les dioxines sont classées comme POP du fait de leur persistance dans l'environnement, en particulier dans les sols et les sédiments. Ces contaminants peuvent alors passer de ces derniers vers les plantes par translocation racinaire, en plus de la contamination directe des parties aériennes de ces plantes par le dépôt des retombées atmosphériques aéroportées. Cela contamine ainsi les chaînes trophiques des herbivores domestiques et donc les productions animales telles que le lait, les œufs et la viande.

Après une analyse du lait de vache au voisinage de sites industriels en France, des teneurs de PCDD/F supérieures à 20 pg TEQ/g de matière grasse ont été observées (Bodéan et Garrido, 2005). Dans le même contexte, en Allemagne, Schulz *et al.*, (2005) ont trouvé dans le lait de vache des teneurs en PCDD/F supérieures à 3 pg TEQ/g de matière grasse (niveau maximum fixé par CEE/2375/2001), après 4 semaines de pâturage dans deux sols avoisinant des sites industriels. Les concentrations de 2, 3, 7, 8-TCDD dans les sols étudiés étaient comprises entre 9,79 et 14,8 ng/kg de sol (en matière sèche). Par ailleurs, l'herbe contenait entre 0,06 et 0,25 ng/kg.

Dans une étude menée sur la contamination des grands lacs nord-américains par les dioxines plus particulièrement dans les zones des industries chimiques, il a été trouvé une concentration en TCDD comprise entre 70 et 170 ng/kg chez les goélands (*Larus argentatus*), entre 15 à 50 ng/kg chez les Salmonides (carnivores) et moins de 10 ng/kg pour les poissons omnivores (Ramade, 2007). Dans l'arctique Canadien, une concentration supérieure à 40 ng TCDD/kg a été trouvée chez les phoques (*Phoca hispida*) et plus de 18 ng/kg chez l'ours polaire (*Ursus maritimus*) (Braune and Simon, 2003).

1.4.4. DEVENIR DES PCDD/F DANS LES SOLS

Le sol est le récepteur principal de pollution par les dioxines émis dans l'atmosphère via les cheminées des installations industrielles ou des incinérateurs. Toutefois, il a été démontré que les processus de déposition atmosphérique jouent un rôle clé dans le transport et l'effet des polluants organiques persistants. De plus, la distribution des PCDD/F entre les phases gazeuse et particulaire détermine leur effets, car les radicaux hydroxyles libres (OH[•]) réagissent généralement dans la phase gazeuse, cependant les particules liées ne restent pas longtemps dans l'atmosphère. Les dépôts peuvent être donc gazeux ou particuliers ce qui implique des mécanismes de fixation différents tels que; l'adsorption, la précipitation ou l'incorporation au sol (Wang *et al.*, 2010).

Par ailleurs, l'effet de la variation des paramètres météorologiques sur la déposition sèche ou humide des PCDD/F sur les sols, a été abordé par plusieurs chercheurs. Il ressort qu'un dépôt important de l'atmosphère vers les sols est observé en hiver (Wang *et al.*, 2010, Katsoyiannis *et al.*, 2010). Dans le même contexte de saisonnalité des PCDD/F, Coutinho *et*

al. (2007) ont estimé un ratio de PCDD/F dans l'air entre été : hiver de 1 : 3, dans des sites au Portugal.

Étant donné que les PCDD/F sont insolubles dans l'eau, elles vont être adsorbées par les particules du sol et notamment sur la matière organique limitant ainsi leur transfert. Toutefois, il a été prouvé que l'équilibre d'adsorption du 2378-TCDD dans un sol, contenant une faible teneur en matière organique, est atteint après 5 à 10 jours de contact (Fan *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré que les mécanismes de désorption et de migration des PCDD/F sont très faibles ce qui limite leur présence à l'horizon supérieur du sol (0-10 cm) tel qu'estimé par Hagenmair *et al.*, (1992) (figure 8).

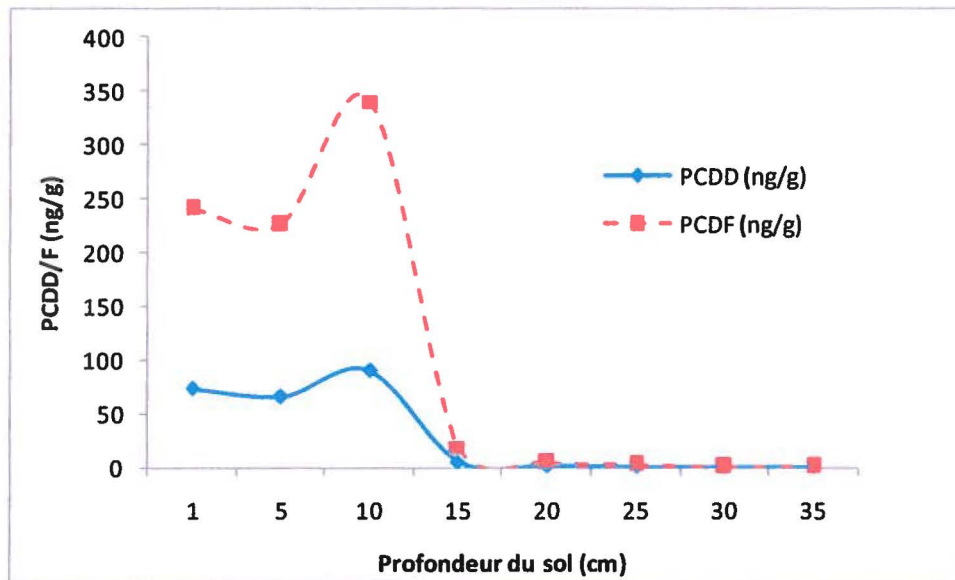


Figure 8: Distribution des PCDD/F dans un sol en fonction de la profondeur (inspirée de Hagenmair *et al.*, 1992)

Un grand nombre d'études ont entrepris de dresser des bilans des teneurs de PCDD/F dans les sols au niveau mondial. En effet, Green *et al.* (2003) ont réalisé une étude historique très importante sur la distribution et la nature des congénères de PCDD/F dans les sols de différents pays depuis 1900. Ce travail était basé sur l'exploitation de données archivées ainsi que sur l'analyse des échantillons conservés depuis des décennies et d'autres prélevés récemment. Cette étude a permis de tracer des patrons globaux de PCDD/F à différentes profondeurs du sol. Pour le Canada, trois régions ont été abordées par les chercheurs soient;

Brandon (0-23 cm), Winnipeg1 (0-23 cm) et Winnipeg2 (23-46 cm) (Figure 9). Il en ressort que les homologues tétra, penta et hexa-CDD contribuent à plus de 90% des dioxines présents à la surface des sols de Winnipeg. Les mêmes dioxines sont présentes dans les sols de Brandon en addition de l'octa-CDD.

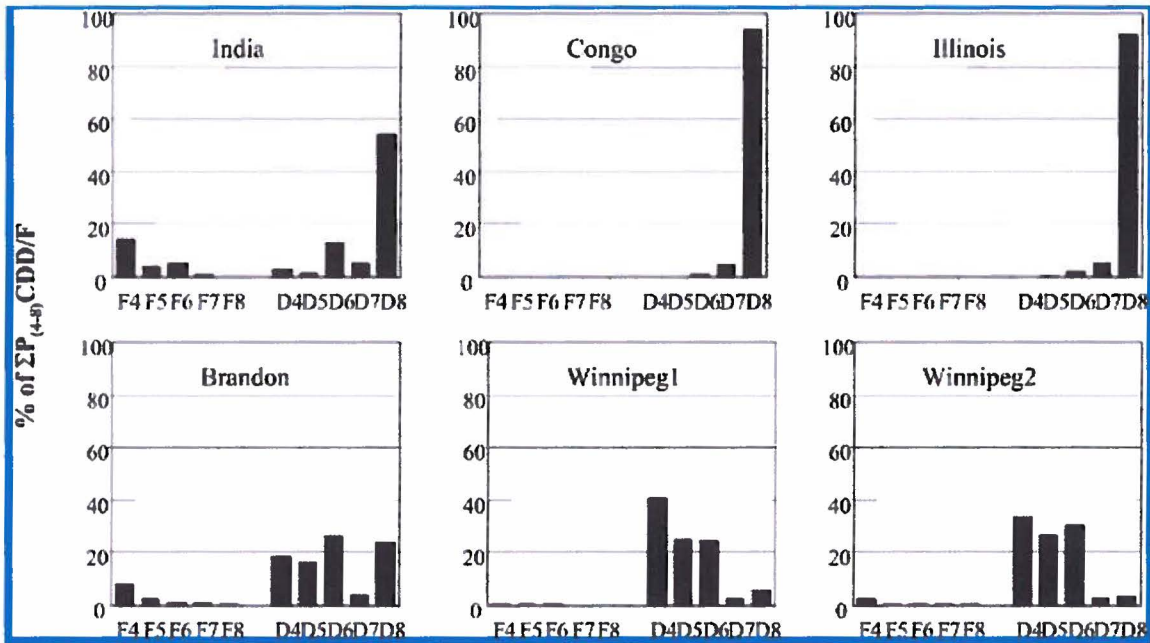


Figure 9: Patrons des homologues de PCDD/F dans les sols (Green *et al.*, 2003)

(F: Furane; D: dioxine; 4, 5, 6, 7, 8 : Nombre de Chlore; tétra, penta, hexa, hepta et octa, respectivement)

Un des problèmes actuels en Europe résulte de la contamination de l'atmosphère par les rejets de dioxines produits par les incinérateurs. En 1999, les rejets vers les sols ont été estimés à 38,23 kg TEQ dont plus de 6,8 kg TEQ uniquement en France (Ramade, 2007).

Au Japon, dans le cadre de l'établissement d'un inventaire historique sur la contamination de l'environnement Japonais par les PCDD/F, il a été observé que les principales sources d'apport vers les sols étaient l'application de pesticides et les émissions des incinérateurs de déchets municipaux et industriels. La contamination par les PCDD/F provenant des pesticides a été estimée à 460 kg TEQ entre 1950 et 1998 (Weber *et al.*, 2008).

Dans une étude, à long terme, sur la persistance des PCDD/F dans les sols, il a été démontré que 50% des dioxines présentes dans les sols (0-15 cm) en 1972 étaient présents en 1990 dans des sols amendés par des boues en Grande Bretagne. De plus, les concentrations de tous les congénères diminuent graduellement de manière similaire. Cette atténuation a été liée aux facteurs physiques tels que le ruissellement ou l'érosion. Un temps de demi-vie pour la disparition des PCDD/F a été estimé à 20 ans (Maclachlan *et al.*, 1996).

D'après la littérature, il a été constaté une atténuation dans le temps des teneurs en PCDD/F dans les sols. Cette atténuation est attribuée à différents phénomènes soient :

- le déplacement de la pollution par; volatilisation des PCDD/F du sol vers l'air, l'érosion, l'ingestion par les animaux et la captation par les végétaux (Hagenmair *et al.*, 1992, Green *et al.*, 2003),

- la dégradation chimique par photolyse : la pénétration des rayons ultraviolets dans le sol permet la dégradation des molécules organiques. En fait, il s'agit d'une déchloration de la molécule qui va perdre un ou plusieurs atomes de chlore ce qui va déstructurer ses cycles carbonés. Ce sont les congénères les plus chlorés qui sont les plus photodégradés. De plus, le congénère OCDF est photochimiquement moins stable que l'OCDD (Bodénan et Garrido, 2005)

- la dégradation biologique : des études ont montré que le taux de biodégradation des dioxines par les micro-organismes diminue lorsque le nombre de chlore de la molécule augmente. Les congénères qui sont aisément biodégradés sont les mono, di et tri-chlorés. Parmi les principales espèces bactériennes isolées des sols ou de sédiments et impliquées dans la dégradation des PCDD/F, on retrouve : *Pseudomonas* (Habe *et al.*, 2001), *Sphingomonas* et *Ralstonia* (Schreiner *et al.*, 1997) et *Terrabacter* (Habe *et al.*, 2002).

1.5. LES DIOXINES DANS LES VERS DE TERRE

1.5.1. BIOACCUMULATION

La bioaccumulation est le phénomène d'absorption par lequel l'organisme peut accumuler des substances nutritives ou des polluants toxiques présents dans son

environnement. Ce processus démontre que non seulement les organismes causent la dispersion de substances toxiques dans l'environnement mais peuvent aussi les concentrer dans leurs tissus, ce qui augmente les risques toxicologiques (Ramade, 2007). La bioaccumulation est exprimé par un facteur de bioaccumulation (FBA) qui représente le rapport entre la concentration d'un polluant dans les tissus d'un organisme donné sur sa concentration dans le biotope.

Chez les vers de terre, la bioaccumulation est la résultante de l'absorption par voies digestive et cutanée. Dépendant du niveau de contamination et du type de sol, des valeurs élevées du FBA de PCDD/F comprises entre 0,09 et 1,1 ont été trouvées pour des vers de terre provenant de sols agricoles, en Suède (Matscheko *et al.*, 2002). Cependant, des valeurs faibles (0,09-0,28) ont été trouvées pour des vers *N. virens* dans des sédiments (Schrock *et al.*, 1997). Dans une étude récente, des chercheurs ont déterminé le FBA des PCDD/F par des vers *E. foetida*, dans deux sols provenant d'une plaine inondable du Midland, en Norvège. Des valeurs de 0,17 pour 2, 3, 7, 8-TCDD à 0,02 pour les congénères les plus chlorés, ont été obtenues. Les taux de matières organiques dans les deux sols étudiés étaient différents soient; 5,6 et 0,38 %, respectivement. Dans cette même étude, l'effet d'un amendement par charbon actif (CA) sur la bioaccumulation des PCDD/F a été étudié. Des résultats très prometteurs ont été obtenus. En effet, il apparaît que l'amendement du sol riche en matière organique avec 2 et 5% CA réduit le TEQ chez les vers de 78 et 91%, respectivement. Aussi, l'amendement du sol pauvre en matière organique avec 2 et 5% CA montre plus de 99% de réduction du TEQ dans les vers de terre (Fagervold *et al.*, 2010).

1.5.2. TOXICITÉ

En dépit de l'intérêt croissant pour la toxicologie des dioxines, peu d'études ont été réalisées sur les invertébrés. En effet, la toxicologie des dioxines chez les vers de terre a été rarement abordée, et les travaux publiés concernent surtout la bioaccumulation. Néanmoins, une ancienne étude menée par Reinecke et Nash (1984) a porté sur la bioaccumulation et la toxicité du 2, 3, 7, 8-TCDD chez les oligochètes *Allolobophora catiginosa* et *Lumbricus rubellus*. Ces vers de terre étaient exposés à des sols enrichis de 0,05 à 5 µg TCDD/g sol, pendant 85 jours. Aucune létalité ou d'autres effets toxicologiques observables n'ont été notés.

Cependant, il a été observé que dans les sols contenant 0,05 µg/g, la concentration de TCDD accumulée par les vers était 5 fois plus que celle du sol, après 7 jours d'exposition.

Récemment, Bu *et al.* (2010) ont étudié les effets des BPC dioxines-like sur les activités physiologiques des vers de terre *Eisenia fætida* incluant la SOD, la CAT, le GST et d'autres activités biochimiques telles que; la GSH et le MDA. Les vers *E. fætida* ont été exposés, pendant 28 jours, à un sol artificiel enrichi de dioxines-like à des concentrations allant de 0,1 à 1000 µg/kg. Les résultats ont révélé une induction de l'activité de la SOD, la CAT, le GST et une augmentation significative des niveaux du GSH et du MDA. Ainsi une relation significative dose-réponse a été démontrée entre les concentrations de dioxines-like et les activités physiologiques ($p < 0,001$).

Concernant le métabolisme des dioxines dans les vers de terre, aucune donnée n'est disponible. Cependant, des études suggèrent l'existence du cytochrome P450 dans les vers de terre (Berghout *et al.*, 1990; Zhang *et al.*, 2006). En outre, Li *et al.* (2011) ont étudié l'effet de l'acide arsénique sur l'activité des enzymes du CYP450 dans les vers de terre *E. andrei*. Leurs résultats ont révélé une inhibition des enzymes; Benzoxy-resorufin-O-dealkylase (BROD), Pentoxyresorufin-O-dealkylase (PROD) et Methoxyresorufin-O-deethylase (MROD). Dans une autre étude sur l'effet de l'Oxytétracycline (OTC) sur des enzymes du CYP450 dans les vers de terre *E. andrei*; une inhibition du BROD et du PROD a été observée avec les plus fortes concentrations d'OTC (Li *et al.*, 2011). Brown *et al.* (2004) ont utilisé l'activité de l'Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) comme biomarqueur pour évaluer l'écotoxicité de l'exposition au Pyrène (Py), mais leurs résultats démontrent que l'EROD n'a pu être détecté dans les vers de terre *Lumbricus rubellus*. Ces résultats suggèrent donc que le CYP450 total ne peut être utilisé comme biomarqueur de la contamination des sols chez les vers de terre, mais il est préférable d'étudier les enzymes spécifiques (ex. :BROD, PROD).

1. 6. TOXICOLOGIE DES DIOXINES

1.6.1. MÉCANISME D'ACTION

Chez les vertébrés, le mécanisme d'action des dioxines est basé sur la présence d'un récepteur cytosolique AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) qui a une tendance à se lier au

TCDD. Habituellement, au niveau du cytoplasme, le AhR forme un complexe avec la protéine du choc thermique Hsp90, mais une fois liée au TCDD, il subit une translocation nucléaire, se dissocie de la protéine Hsp90, migre vers le noyau et se lie à la protéine Arnt (Ah Receptor Nuclear Translocator). Le nouveau complexe ainsi formé s'associe au promoteur XRE (élément de réponse aux xénobiotiques) qui module l'activité transcriptionnelle de gènes impliqués dans la défense cellulaire contre le stress oxydatif et le contrôle du cycle cellulaire. Parmi ces gènes, celui codant pour le cytochrome P450 (CYP1A1) (Mimura *et al.*, 1999, Maurin *et al.*, 2005). Le CYP1A1 est une enzyme qui favorise l'hydroxylation du TCDD. Toutefois, la formation d'un nombre important de dérivés oxygénés au sein de la cellule provoque un stress oxydatif pouvant engendrer une altération de l'ADN et favoriser l'apoptose (Maurin *et al.*, 2005, Po-Hsiung *et al.*, 2007).

Chez les invertébrés, peu de données sont disponibles sur la présence de récepteurs AhR-like et leur TCDD-dépendance. Par ailleurs, des homologues-AhR ont été récemment observés chez des nématodes (*Caenorhabditis elegans*), des mollusques (*Mya arenaria*) et des arthropodes (*Drosophila melanogaster*) (Powell-Coffman *et al.*, 1998; Butler *et al.*, 2001; McMillan and Bradfield, 2007). Concernant les vers de terre, des efforts ont été fait pour identifier des homologues-AhR chez *Eisenia fætida*, par RT-PCR, mais les résultats n'étaient pas prometteurs (Wiesner *et al.*, 2003).

1.6.2. CONCEPT D'ÉQUIVALENCE TOXIQUE

Étant donné que les dioxines se trouvent toujours en mélange, et afin de différencier la toxicité de chaque congénère, un facteur d'équivalence toxique (TEF) a été défini pour chaque congénère. Il s'agit d'une pondération permettant de tenir compte des toxicités relatives par rapport à la substance la plus toxique soit la 2, 3, 7, 8-TCDD. En effet, l'organisation mondiale de santé (OMS) a défini ces facteurs pour les dix-sept dioxines toxiques. Celles-ci sont présentées dans le tableau 3 (Srogi, 2007).

Par ailleurs, une autre approche pour quantifier la toxicité est la quantité équivalente toxique (TEQ) qui consiste à multiplier la concentration de chaque congénère détecté par son facteur d'équivalence toxique (Pollit, 1999).

Dans un échantillon contenant un mélange de dioxines, le TEQ est illustré par la formule suivante :

$$\text{TEQ} = \sum_{i=1}^{i=n} (\text{concentration} \times \text{TEF})_i$$

n: Nombre de congénères se trouvant dans l'échantillon

Le résultat est exprimé en ng (10^{-9} g), pg (10^{-12} g) ou fg (10^{-15} g) de TEQ par gramme de poids ou de volume. Il est important de noter que les valeurs des équivalents toxiques ont été déterminées en se basant sur des données toxicologiques, des tests *in vitro* et *in vivo* et la similarité structurelle des dioxines (Srogi, 2007).

Tableau 3: Facteurs d'équivalence toxique de PCDD/F selon l'OTAN (1989) et l'OMS (1998) (Van der Berg *et al.*, 1998).

Congénère	OTAN-TEF (1989)	OMS-TEF (1998)
2, 3, 7, 8-TCDD	1	1
1, 2, 3, 7, 8-PeCDD	0,5	1*
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDD	0,1	0,1
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDD	0,1	0,1
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDD	0,1	0,1
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDD	0,01	0,01
OCDD	0,001	0,0001*
2, 3, 7, 8-TCDF	0,1	0,1
1, 2, 3, 7, 8-PeCDF	0,05	0,05
2, 3, 4, 7, 8-PeCDF	0,5	0,5
1, 2, 3, 4, 7, 8-HxCDF	0,1	0,1
1, 2, 3, 6, 7, 8-HxCDF	0,1	0,1
2, 3, 4, 6, 7, 8-HxCDF	0,1	0,1
1, 2, 3, 7, 8, 9-HxCDF	0,1	0,1
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-HpCDF	0,01	0,01
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9-HpCDF	0,01	0,01
OCDF	0,001	0,0001*

* valeur modifiée entre 1989 et 1998

1.6.3. TOXICOCINÉTIQUE DES DIOXINES

- *Absorption* : la principale source d'exposition de l'être humain aux dioxines est, à plus de 90%, l'alimentation d'origine animale (lait et dérivés : 40%, viande : 10-20%, produits de la mer : 20-30%, œufs et dérivés : 6%) (Schmid *et al.*, 2002, Mato *et al.*, 2007). Ces substances sont donc absorbées par voie digestive et concentrées dans la matrice lipidique. Cependant on ne peut discriminer l'inhalation et la contamination cutanée dues à l'exposition professionnelle ou accidentelle.

- *Distribution* : À caractère lipophile, les dioxines vont se concentrer dans les tissus riches en lipides. Une analyse d'échantillons maternels a montré un passage placentaire facile avec une concentration élevée par rapport au lait maternel (matière grasse), tissus adipeux, sang, et sang du cordon ombilical. Un ordre décroissant de la concentration en TEQ des

PCDD a été établi soit; placenta> sang maternel> lait maternel> tissu adipeux> sang du cordon ombilical (Suzuki *et al.*, 2005).

- *Élimination* : Il a été démontré chez des vaches que l'élimination est effectuée par excrétion lactée ou via les selles. En effet, des concentrations élevées étaient détectées dans les selles, particulièrement les congénères les plus chlorés. Par ailleurs, des échantillons de lait contenaient principalement des hexa-chloro-furanes. De plus, il a été observé que le colostrum peut contenir 16 fois plus de PCDD/F que le lait (Schulz *et al.*, 2005). Chez l'être humain, l'élimination est effectuée surtout par voie biliaire ou par excrétion lactée pour les femmes qui allaitent (ATSDR, 2006). En effet, l'allaitement diminue la dose interne de la mère mais augmente celle du nourrisson. La demi-vie des dioxines dans le corps humain est d'environ 7 à 12 ans chez l'adulte d'âge moyen (ATSDR, 2006).

1.6.4. EFFETS DES DIOXINES SUR L'ORGANISME HUMAIN

Les dioxines révèlent des effets nocifs sur l'être humain à différents niveaux soient; hormonal, immunitaire, reproductif, nerveux, cardio-respiratoire et présentent aussi un caractère cancérigène.

- *Effets cancérigènes* : En 1997, le Centre International de recherche contre le cancer (IARC, 1997) a classé la 2, 3, 7, 8-TCDD comme cancérigène pour l'être humain. En effet plusieurs études ont montré que la TCDD représente un risque carcinogène, dont celle de Valic *et al.* (2004), menée sur deux patients accidentellement intoxiqués par la TCDD. Les effets génotoxiques ont été étudiés sur une période de 13 mois suite à l'accident et des dommages de l'ADN causés directement ou indirectement par la TCDD ont été observés.

L'exposition accidentelle au TCDD, lors de l'accident de Seveso en Italie, a révélé une augmentation de l'incidence des cancers du foie, du poumon et du sein (Steeland *et al.*, 2004).

- *Effets sur le système immunitaire* : chez l'être humain, les tests d'immunotoxicité des POP sont effectués *in vitro*. La majorité des résultats montrent des effets immunomodulateurs (activation, suppression) (Holmstrup *et al.*, 2010). Parmi les effets des dioxines décrits dans la littérature, on retrouve l'immunosuppression liée à une diminution du nombre de monocytes et de polynucléaires (Ten Tusscher *et al.*, 2004).

- *Effets sur la croissance de l'embryon et du nouveau-né* : Nombre d'études ont montré qu'une exposition aux dioxines en période périnatale pouvait provoquer des perturbations du métabolisme thyroïdien et du développement cérébral, se traduisant par des retards mentaux, des difficultés de concentration et de compréhension verbale associées à une déficience de la mémoire visuelle (Koopman-Esseboom *et al.*, 1994, Stewart *et al.*, 2003, Ten Tusscher *et al.*, 2004).

- *Effets sur le développement dentaire* : Des études réalisées sur des personnes exposées aux dioxines durant leur enfance, ont montré un fort taux de prévalence d'hypominéralisation de l'émail et d'hyodonties. Les dents les plus touchées sont les incisives latérales et les secondes prémolaires (Holtta *et al.*, 2001, Billings *et al.*, 2004, Alaluusua *et al.*, 2004, Maurin *et al.*, 2005).

- *Effets biochimiques et cellulaires* : Plusieurs effets ont été cités dans la littérature; l'activation des enzymes de détoxification telles que celles codant pour le cytochrome P450: CYP1A1, CYP1A2 et CYP1B1 (Maurin *et al.*, 2005) et la génération d'espèces oxygénées très réactives à l'intérieur de la cellule conduisant ainsi à un stress oxydatif (Mimura *et al.*, 1999, Po-Hsiung *et al.*, 2007).

- *Atteintes cutanées*: Le Chloracné est une manifestation bien connue d'intoxication aiguë aux dioxines (ATSDR, 2006).

1.6.6. VALEURS TOXICOLOGIQUES DE RÉFÉRENCE

- L'OMS a établi un seuil de précaution pour une exposition quotidienne au TCDD; il s'agit d'une dose journalière admissible (DJA) de 1 à 4 pg/kg de poids pour un adulte de 70 kg (ATSDR, 2006).

- L'USEPA suggère qu'une dose journalière admissible de 0,006 pg/kg de poids corporel limiterait le risque du cancer à un cas sur un million (USEPA, 2000).

Autres valeurs:

- Le comité Européen de Normalisation impose une valeur limite à l'émission de 0,1 ng/m³ en dioxines aux installations d'incinération (CEN, 1994).

- Pour les sols : les recommandations canadiennes pour la qualité de l'Environnement (le bureau National des recommandations et des normes d'environnement Canada en

collaboration avec le conseil canadien des ministres de l'environnement CCME) suggère 4 ng TEQ (PCDD/F)/kg de sol (EC, 2005).

- L'exposition à une concentration environnementale de 1 ng/g 2, 3, 7, 8-TCDD dans le sol peut causer le cancer (Pohl *et al.*, 1995).

1.7. L'IMMUNOTOXICOLOGIE CHEZ LES VERS DE TERRE ET SANTÉ ENVIRONNEMENTALE

L'immunotoxicologie environnementale est l'étude des effets toxiques des substances chimiques sur le système immunitaire des animaux. Les conséquences des atteintes immunologiques considérées suite à cette exposition chimique sont; l'immunosuppression, l'immunostimulation, l'hypersensibilité et l'autoimmunité (Fournier *et al.*, 2004). Les effets toxiques de certains polluants organiques et inorganiques, sur le système immunitaire des vers de terre ont déjà été étudiés en laboratoire. En effet, des études immunotoxicologiques résumées dans le tableau 4, ont réalisé des expositions *in vivo* et *in vitro* afin d'estimer la toxicité d'un ou de plusieurs polluants. Il a été démontré que la suppression de l'activité phagocytaire, ou la diminution de la viabilité des cœlomocytes réduit la résistance des animaux aux infections. De plus, cette immunodéficiance est considérée comme un signe d'effets toxiques de polluants environnementaux (Fournier *et al.*, 2000).

En dépit des preuves de contamination des sols par les dioxines aux alentours des incinérateurs et leurs impacts sur la faune terrestre et sur la santé, ces polluants ont reçu peu d'attention pour la recherche chez les vers de terre. En effet, aucune exploration immunotoxicologique n'a été réalisée. Toutefois, ces molécules se révèlent immunotoxiques tant pour l'être humain que pour les animaux (Pohl *et al.*, 1995).

Tableau 4: Récapitulatif des études sur les substances chimiques immunotoxiques chez les vers de terre

Référence	Substance chimique	Paramètres immunologiques étudiés
Goven <i>et al.</i> , 1994	BPC	phagocytose
Ville <i>et al.</i> , 1995	BPC	phagocytose
Suzuki <i>et al.</i> , 1995	BPC	activité des cellules NK
Fugère <i>et al.</i> , 1996	HgCl ₂ , CH ₃ Hg, CdCl ₂ , ZnCl ₂ PbCl ₂ , (CH ₃ COO) ₄ Pb	Viabilité cellulaire et phagocytose
Komiyama <i>et al.</i> , 2003	HAP	cytotoxicité, phagocytose
Hendawi <i>et al.</i> , 2004	CH ₃ HgCl	viabilité cellulaire et phagocytose
Sauvé and Fournier, 2005	CH ₃ HgCl	viabilité cellulaire et phagocytose
Massicote <i>et al.</i> , 2003	Rejets de cimenterie	viabilité cellulaire et phagocytose

CHAPITRE 2 : CONTEXTE DE L'ÉTUDE

2.1. PROBLÉMATIQUE DE MERCIER

Mercier est une région agricole située à moins de 25 km au sud ouest de Montréal. Elle subit depuis 1968 les effets de la contamination des lagunes et des eaux souterraines par les déversements de déchets toxiques, et subit depuis 1972, les impacts cumulatifs des rejets de l'incinérateur de déchets dangereux installé sur le même site de la Ville de Mercier (BAPE 1994, Gareau *et al.* 2005, Vandelac 2006, Laberge 2007).

Il est important de rappeler ici les éléments clés du développement et de la propagation de la contamination de la région de Mercier tels que développés dans les travaux bilan de l'étude préliminaire (BAPE 1994, Garreau *et al.* 2005).

Les pouvoirs publics ont présenté à la population de la région de Mercier le projet de construire, de façon temporaire, un incinérateur privé de déchets dangereux, sur le site des lagunes contaminées par le déversement des déchets toxiques (Laberge, 2007). Cet incinérateur de Mercier a donc été présenté à la population comme ayant pour objectif premier de détruire, par oxydation thermique, les déchets liquides organiques qui avaient été déversés, avec l'aval des autorités, dans les lagunes par la compagnie Lasalle oïl Carriers depuis 1968 et qui furent ensuite déversés illégalement pendant plusieurs années par certains propriétaires de l'incinérateur (Ibid). Ces déchets étaient composés surtout d'huiles et de solvants usés ainsi que de résidus de distillation du pétrole, si bien que la contamination des lagunes de Mercier s'est propagée par la voie de l'air grâce à l'incinérateur qui rejette constamment des polluants dans l'atmosphère via ses effluents gazeux. En plus, il est à noter que durant la période allant de 1973 à 1987, l'absence d'un système de filtration performant à l'incinérateur laisse croire que la contamination de la région de Mercier a été significative (BAPE 1994, Garreau *et al.* 2005).

Par la suite, au fil des années, le ministère de l'environnement du Québec a autorisé l'augmentation de la capacité de l'incinérateur à brûler des déchets dangereux, accroissant ainsi les flux de polluants vers l'atmosphère (BAPE 1994, Garreau *et al.* 2005, Laberge 2007). D'autres déchets dangereux dont il est difficile de connaître avec précision l'origine et la provenance sont destinés à cet incinérateur; on retrouve des liquides organiques, des hydrocarbures, des solvants, des polymères et des déchets organochlorés (BAPE 1994,

Garreau *et al.* 2005). Ainsi, l'incinérateur de Mercier comme tous les types d'incinérateurs, ne résout pas le problème des matières toxiques présentes dans les déchets, mais il leur donne d'autres formes, dont certaines peuvent être potentiellement plus toxiques encore que la matière d'origine.

Soulignons qu'au cours des dernières années, les effets sur l'environnement et sur la santé humaine de l'incinération de déchets dangereux se sont imposés comme étant un problème très significatif. Ces effets ont été mis en évidence par un très grand nombre d'études menées sur l'émission de POPs (Colborn *et al.*, 1996, Vandelac et Bacon, 1999), et particulièrement sur l'émission de dioxines et furanes dont l'incinération constitue l'une des premières sources. Gardons à l'esprit que l'incinération est aussi reconnue comme source majeure de libération de métaux lourds et d'autres substances toxiques organiques et inorganiques dans l'environnement.

L'intérêt particulier porté aux dioxines et furanes est motivé par le comportement même de ces substances aux effets cumulatifs et persistants très toxiques pour les êtres humains. En effet, une fois ces substances transférées aux humains par le biais de l'inhalation d'air contaminé et à plus de 90% par le biais de l'alimentation (Santé Canada in Vandelac et Bacon 1999), elles peuvent contribuer à des perturbations du système immunitaire, du système reproducteur et affecter le développement intellectuel et comportemental. De plus, ces polluants peuvent également provoquer des maladies du cœur, des anomalies congénitales et des cancers (Allsopp *et al.*, 2001).

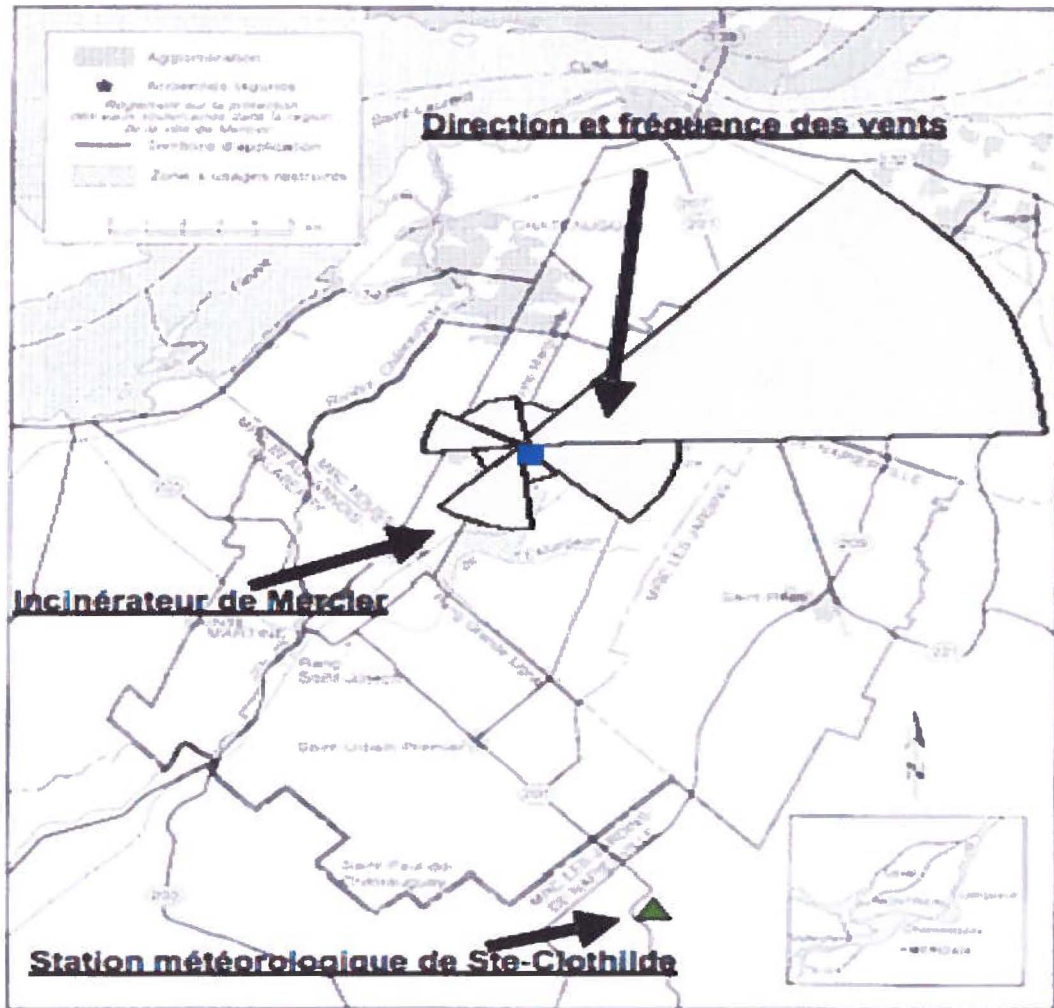
Il est important de noter qu'aucune étude n'a été réalisée sur l'impact des émissions atmosphériques de l'incinérateur privé Clean Harbors de Mercier et peu de données sont disponibles relativement à l'émanation des dioxines et furanes. Les seules informations que nous disposons sont les résultats du projet AMR (animaux morts sur la route) et l'INRP (Inventaire National des Rejets de Polluants) mentionnés ci-dessous.

2.2. DONNÉES SCIENTIFIQUES DISPONIBLES

2.2.1. PROJET AMR

Tel que abordé dans le rapport de Vandelac *et al.* (2010), ce projet consistait à la collecte d'animaux morts sur la route aux alentours de l'incinérateur et l'évaluation des niveaux de contamination par des substances toxiques en particulier les dioxines et furanes dans le gras de ces animaux. Toutefois, afin de sélectionner les sites d'échantillonnage dans le but d'une analyse en fonction d'un gradient d'exposition potentielle basé sur les vents dominants, un projet pilote a été mis en place afin de comprendre et d'estimer la dispersion des contaminants pour en constituer le panache généré par l'incinérateur. En effet, une cartographie des vents fournie par la station météorologique de Sainte-Clothilde a permis l'identification des sites susceptibles aux retombées atmosphériques de l'incinérateur dans une périphérie couvrant un rayon d'environ 35 km. À partir des données horaires de la direction des vents pour les années 2004 et 2005, un diagramme de la direction des vents a été établi (figure 10).

Au cours de l'opération AMR, 25 animaux dont 23 rats laveurs ont été collectés entre 2004 et 2005. Les résultats d'analyse ont mis en évidence des niveaux élevés de dioxines dans les tissus graisseux des rats laveurs (tableau A en annexe 1). L'importance de la contamination en dioxines/furannes par rapport au panache de l'incinérateur a été schématisée dans la figure 11. Les résultats ont révélé une concentration importante en OCDD et OCDF dans le gras des rats collectés sous le panache. Par ailleurs, des concentrations aussi importantes de Hexa et Hepta CDD ont été trouvées pour ceux collectés à l'extérieur du panache. Cependant, la Tétra CDD n'a pas été détecté.



Source : d'après de documents RQVAD, DNF, Figure 2.1

Figure 10 : Le diagramme de direction des vents. Le panache illustré ici a été conçu, à partir des données de la fréquence de la direction des vents collectés en 2004 et 2005, grâce au logiciel Wind plot (Vandelac *et al.*, 2010).

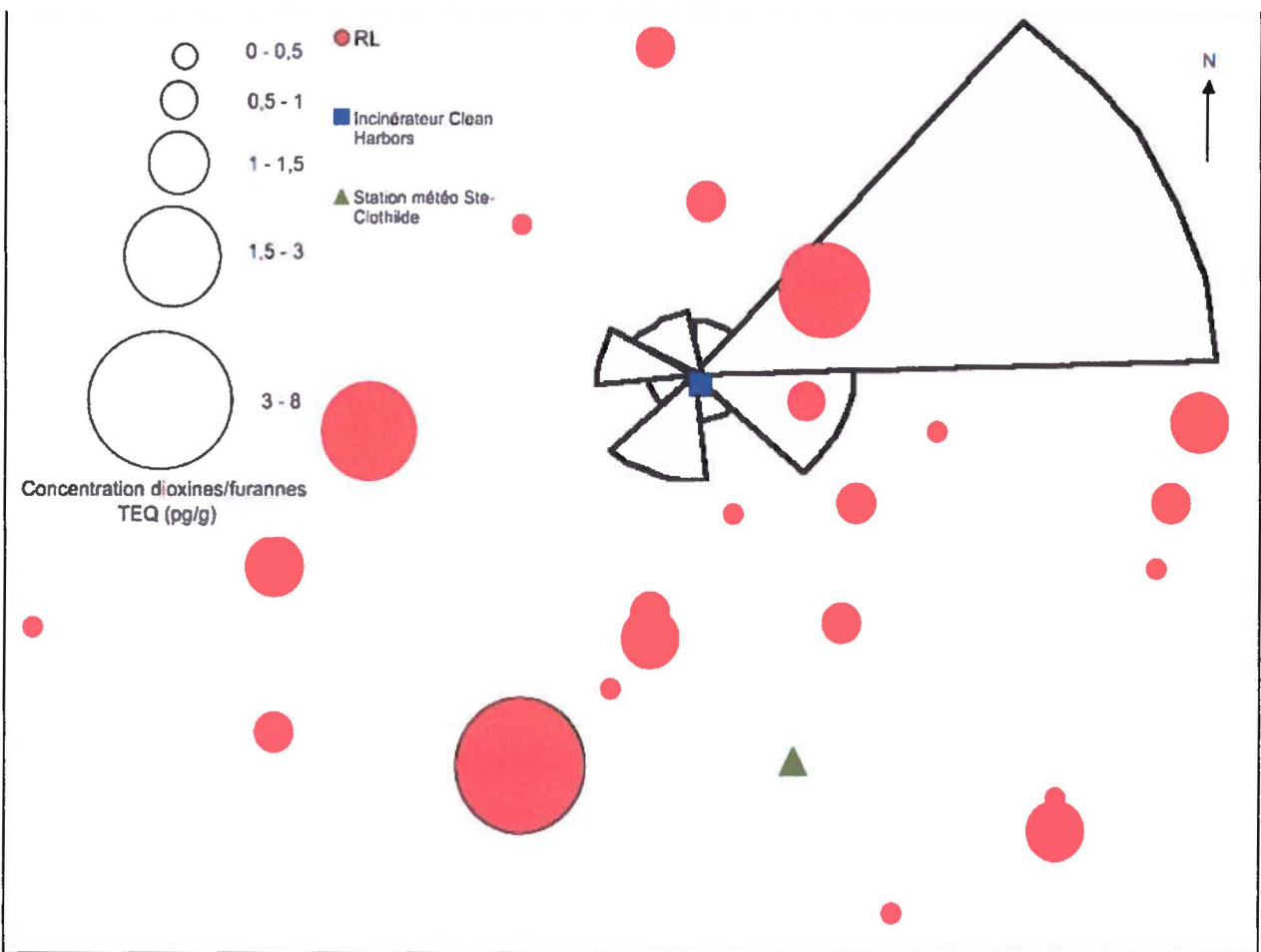


Figure 11 : Positionnement spatial par GPS et état de la contamination en dioxines/furannes TEQ dans le tissu graisseux des 23 rats laveurs (RL) récoltés en 2004 et 2005 (Vandelac *et al.*, 2010)

2.2.2. INVENTAIRE NATIONAL DES REJETS DE POLLUANTS

Selon les rapports historiques des substances émises par l'incinérateur et déclarées par Clean Harbors Mercier, Inc., une concentration totale en dioxines/furanes de 0,471 g TEQ a été rejetée dans l'atmosphère en 2010. Une quantité de 0,344 g TEQ était prévue pour chacune des années 2011 et 2012. L'inventaire des rejets entre 2002 et 2010 fait état d'une quantité totale de 1,46 g TEQ (INRP, 2011).

2.3. OBJECTIFS DE RECHERCHE

L'examen des données disponibles dans la littérature relatives à la problématique de Mercier permet de constater qu'aucune étude d'impact de la contamination sur les milieux biogéochimiques (air, eau, sol) et biologiques (faune et flore) n'a été réalisée. Ceci implique qu'une étude écotoxicologique du site s'impose. Étant donné que le sol est un récepteur principal des retombées atmosphériques, il semble important d'évaluer son état de contamination aux alentours de l'incinérateur. Toutefois, l'absence de données a permis aussi de développer des réflexions pour contribuer à cette évaluation, ainsi qu'à l'étude de l'ampleur et de l'impact de la contamination des sols de Mercier sur la faune terrestre. Les modèles classiques pour une telle exploration décrits dans de nombreuses études nationales et internationales qui ont abordé le risque de contamination des sols consistent à évaluer la toxicité chez les vers de terre (Robidoux *et al.*, 1999, 2000, 2001, 2004a, b, Lukkari *et al.*, 2005, Lowe 2007, Reddy and Rao, 2008). En effet, ces derniers présentent 60 à 80% de la faune terrestre et jouent un rôle important dans le maintien de la structure et la fertilité du sol. Dans ce contexte, des tests standardisés de toxicité ont été développés pour l'étude de l'effet sur la croissance, la mortalité et la reproduction des vers de terre. Les espèces sentinelles exploitées étaient; *Lumbricus terrestris*, *Eisenia fetida* et *Eisenia andrei* (OECD 1984, ISO 1993). Par la suite, une batterie de biomarqueurs biochimiques et immunologiques a été étudiée par plusieurs chercheurs afin de mieux comprendre la toxicité des sols chez ces espèces sélectionnées.

Dans cette optique, pour mieux cadrer ce projet visant l'évaluation de la qualité des sols en périphérie de l'incinérateur de Mercier, deux études ont été réalisées soient; l'immunotoxicologie des dioxines chez les vers de terre *Eisenia andrei*, et l'écotoxicologie

des sols de Mercier. La première étude vise à mieux comprendre le potentiel immunotoxique des dioxines et d'évaluer leur influence en relation avec la contamination environnementale. La deuxième étude est basée sur des tests standards de toxicité des sols de Mercier sur la même espèce de vers de terre présélectionnée soit *Eisenia andrei*, suivis d'étude de biomarqueurs. La stratégie globale pour la réalisation de ce projet est donc tracée de manière à répondre à deux objectifs principaux;

Le **premier objectif** concerne l'étude des effets immunotoxiques des dioxines chez les vers de terre *E. andrei*. En se basant sur les principes d'une exploration immunotoxicologique décrits dans la littérature (Fournier *et al.*, 2004), deux approches ont été définies; l'exploration *in vitro* et *in vivo*. Ainsi découlent deux volets de recherche, soit;

- **Volet 1** : explorer *in vitro* l'impact immunotoxique d'un mélange de dioxines sur les cellules immunitaires (cœlomocytes) des vers de terre. Les paramètres immunitaires étudiés sont l'activité phagocytaire des cœlomocytes et l'activité des cellules NK-like. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'articles dans le chapitre « Immunotoxicologie des dioxines » (sous chapitre 3.1) afin de faciliter par la suite leur soumission dans des journaux à comité de lecture.

Cette étude *in vitro* vise la compréhension de la réponse aux dioxines de deux importants paramètres du système immunitaire des *E. andrei* (la phagocytose et l'activité des cellules NK) ce qui permettra ultérieurement une prévision de l'immunotoxicité.

- **Volet 2** : explorer *in vivo* les effets immunotoxiques des dioxines chez les vers de terre *E. andrei*. Dans cette deuxième étape de l'exploration immunotoxicologique, les animaux sont soumis à des expositions contrôlées aux dioxines, en laboratoire. Deux études ont été réalisées; test de toxicité-contact papier filtre et test de toxicité-contact sol traité par les dioxines. Les biomarqueurs immunologiques abordés sont la cellularité, la viabilité cellulaire, la phagocytose et l'activité des cellules NK-like. Les deux études *in vivo* sont détaillées et rédigées sous forme d'articles dans le chapitre 3.2.

L'étude *in vivo* permet de se rapprocher des conditions d'exposition réelle dans l'environnement du ver de terre.

Le **deuxième objectif** consiste à évaluer la qualité des sols entourant l'incinérateur de Mercier.

• **Volet 1** : Étudier les effets de la contamination sur certains biomarqueurs, la létalité, la croissance et la reproduction chez des vers de terre *Eisenia andrei*, exposés à ces sols. L'immunotoxicité des sols est aussi abordée. Pour ce faire, des expériences sont réalisées au laboratoire, sous des conditions contrôlées, et d'autres *in-situ* (mésocosmes), c'est-à-dire sous les conditions du terrain. La partie préliminaire de cette étude a été réalisée en collaboration avec le groupe d'Écotoxicologie de l'Institut de Recherche en Biotechnologie du Conseil National de Recherche du Canada.

• **Volet 2** : Quantifier la contamination par les dioxines et les métaux lourds dans les sols et les vers de terre étudiés (exposés aux sols de Mercier).

Les résultats du deuxième objectif sont décrits dans le chapitre 4 « Écotoxicologie des sols de Mercier ».

L'article intitulé « Ecotoxicological study of field soils from the vicinity of Mercier incinerator in Quebec » est soumis au journal «Soil biology and biochemistry» (chapitre 4.1). Toutefois, l'article regroupant les résultats de l'étude *in situ* est en préparation (chapitre 4.2).

Enfin, une analyse des données disponibles dans la littérature, dans les travaux et les résultats expérimentaux des recherches en cours au CINBIOSE et au CIRÉ permettra d'élargir notre compréhension et de mieux situer les résultats de nos propres travaux afin de contribuer à identifier les principales substances dangereuses pour l'être humain, issues de l'incinérateur de Mercier et de qualifier l'environnement sous le panache de l'incinérateur.

2.4. HYPOTHÈSES

Objectif 1

De nombreuses études sur des animaux de laboratoire ont démontré que des composés organochlorés de structure similaire à la 2, 3, 7, 8-TCDD ont provoqué une myélosuppression, une immunosuppression, une atrophie du tymus et une inhibition des composantes du système du complément (Kouassi *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré que la 2, 3, 7, 8-TCDD seule ou en mélange modulait la réponse phagocytaire chez les mammifères marins (Levin *et al.*, 2005, 2007). Ainsi, notre hypothèse est que les dioxines, à des concentrations sublétales, modulent le système immunitaire du ver de terre. On présage donc des manifestations immunotoxiques telles que l'inhibition de la phagocytose.

Objectif 2

La présence de contaminants organiques ou inorganiques avec des taux élevés ou non dans les sols par rapport aux valeurs limites, peut avoir des effets directs sur la croissance et la survie chez les organismes y vivant (les vers de terre) se manifestant par une diminution de poids ou même une mortalité. La contamination peut avoir aussi des effets remarquables sur la reproduction chez les vers de terre. En effet, on présage une faible production de cocons ou production de cocons non fertiles, ainsi qu'une réduction du taux de production de juvéniles par cocon.

L'exposition permanente du ver de terre aux polluants environnementaux présents dans le sol, même à de faibles concentrations, peut affaiblir son système immunitaire et donc diminuer sa performance à se défendre vis-à-vis des agents pathogènes. Ainsi on s'attend à des effets sur l'immunocompétence et sur la stabilité de la membrane lysosomiale. De nombreuses études ont montré que la présence de particules étrangères dans l'organisme du ver peut entraîner un stress oxydatif. Par ailleurs, dans la caractérisation chimique, on prévoit que les teneurs des sols en dioxines sont variables en fonction de la distance des points d'échantillonnage par rapport à l'incinérateur. En général, les plus lourdes dioxines (OCDD, OCDF) sont retrouvées sous ou près du panache.

**CHAPITRE 3 : IMMUNOTOXICOLOGIE
DES DIOXINES CHEZ LES VERS DE
TERRE *EISENIA ANDREI***

3. 1. ÉTUDE *IN VITRO* DES EFFETS IMMUNOTOXIQUES DES PCDD/F SUR LES CELLULES IMMUNITAIRES DES *E. ANDREI*

3. 1. 1. INTRODUCTION

Tel que décrit par Fournier *et al.* (2004), l'approche classique dans une exploration immunotoxicologique consiste à explorer *in vitro* les effets immunotoxiques des xénobiotiques sur les cellules immunitaires de l'espèce faunique d'intérêt. Les xénobiotiques peuvent être considérés seuls ou en mélange. La valeur prédictive de certains tests *in vitro* a été déjà standardisée par des études inter-laboratoires. Parmi les tests immunologiques les plus fiables; l'activité phagocytaire et le test de cytotoxicité des cellules NK. Dans ce contexte, nous avons examiné dans cette partie de notre étude l'effet d'un mélange de PCDD/F sur la réponse immunitaire des coelomocytes en particulier sur la phagocytose et sur l'activité des cellules NK-like chez les vers de terre *E. andrei*. Cette approche nous permet d'identifier et de comprendre si les PCDD/F en mélange ont la capacité de moduler le système immunitaire dans les vers de terre, et aussi d'établir une gamme de concentrations pour lesquelles les PCDD/F sont immunotoxiques sans être cytotoxiques.

Pour le choix de concentrations de PCDD/F testées dans nos expériences, nous nous sommes basé sur le travail d'Omara *et al.* (1998) qui ont exposé des leucocytes de rats Fischer à une gamme de 1-15 pg/ml pour étudier la phagocytose, et aussi sur les limites reportées pour l'utilisation des dioxines en phase aqueuse soit 10-50 ng/litre (<http://www.dioxin.sgs.com/reporting-limit-methods-dioxin>).

Il est important de noter que les résultats de l'étude dose-réponse réalisée pour l'optimisation du temps d'incubation pour la phagocytose sont présentés en annexe B.

3. 1. 2. EFFETS SUR LA PHAGOCYTOSE

Article 1

Titre

Effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans on phagocytic response of *Eisenia andrei* cœlomocytes

Auteurs

Hayet Belmeskine, Pauline Brousseau, Sami Haddad, Louise Vandelac, Michel Fournier

Publié dans le journal

Journal of xenobiotics 2011; volume 1:e6; doi : 10.4081/xeno.2011.e6

Contribution personnelle

J'ai rédigé cet article à titre d'auteur principal. De plus, j'ai participé à la planification des expériences, j'ai réalisé toutes les expériences, analysé et interprété les résultats.

Contribution des coauteurs

Mme Pauline Brousseau a participé à la correction de l'article. Mes codirecteurs Sami Haddad et Louise Vandelac ont participé à l'analyse des résultats et à la correction du manuscrit. Mon directeur de recherche Michel Fournier a participé à la planification des expériences et à l'analyse des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

Remarque : Cet article regroupe les résultats des effets sur la phagocytose des tests *in vitro* et *in vivo*. Ceci a été due suite aux recommandations des réviseurs de l'article (comité de lecture du journal) afin d'enrichir l'article pour sa publication.

RÉSUMÉ

Les effets immunotoxicologiques des PCDD/F sur les vers de terre *Eisenia andrei* n'ont jamais été étudiés. Dans cette étude nous avons exploré ces effets, via des tests *in vitro* et *in vivo*, en utilisant la viabilité cellulaire et l'activité phagocytaire comme biomarqueurs immunologiques en exploitant la cytométrie en flux pour l'analyse. Les résultats de l'exposition *in vitro*, ont révélé un effet cytotoxique du mélange C5 contenant 50×10^{-3} ng/ml de 2, 3, 7, 8- TCDD et une induction de l'activité phagocytaire par le mélange C4 contenant 25×10^{-3} ng/ml de 2, 3, 7, 8- TCDD. Dans l'exposition *in vivo*-contact papier filtre, nous avons évalué l'immunocompétence des vers de terre *E.andrei* après trois heures d'exposition à un mélange de PCDD/F présent à différentes concentrations soient; C1, C2, C3 et C4 contenant 0,05, 0,3, 0,5 et 0,83 ng 2378-TCDD/cm², respectivement. En plus des observations morphologiques, la cellularité, la viabilité cellulaire, l'activité et l'efficacité phagocytaire ont été évaluées. Les observations morphologiques ont montré une sécrétion excessive du mucus et des lésions dermiques chez les vers exposés aux plus fortes concentrations (C3 et C4) ce qui explique que ces organismes ont été affectés via la voie cutanée et/ou par ingestion. Les niveaux de cellularité ont diminué significativement pour toutes les concentrations testées comparés aux témoins. Cependant, la viabilité des cellules semble ne pas être affectée par les différentes concentrations de PCDD/F. Il a été démontré aussi que l'exposition à C2, C3 et C4 avait inhibé l'activité et l'efficacité phagocytaires des cœlomocytes.

ABSTRACT

The immunotoxicological effects of PCDD/Fs mixtures on *Eisenia andrei* earthworms have never been studied. In this work we investigated these effects both for *in vitro* and *in vivo* exposure, using the viability and the phagocytic activity of coelomocytes as immunological biomarkers and the flow cytometry was used for analysis. The *in vitro* exposure revealed a cytotoxic effect of PCDD/Fs mixture (C2) containing 50×10^{-3} ng/ml of 2, 3, 7, 8-TCDD and an induction of the phagocytic capacity at the mixture (C1) containing 25×10^{-3} ng/ml of 2, 3, 7, 8-TCDD. In the *in vivo* filter paper exposure, the immunocompetence of earthworms was assessed after 3 hours-exposure to mixtures of PCDD/Fs at the levels of C1, C2, C3 and C4 containing about; 0.05, 0.3, 0.5 and 0.83 ng of 2, 3, 7, 8-TCDD/cm², respectively. Morphological observations showed an excessive secretion of mucus and body surface lesions in worms exposed to higher concentrations (C3 and C4) which revealed that these organisms were affected by PCDD/Fs either through skin and/or by feeding. The levels of the extruded cell yield decreased significantly at all the concentrations tested. However, the cell viability was shown to be unaffected by PCDD/Fs concentrations. It was also shown, that exposure to the highest PCDD/Fs concentrations; C2, C3 and C4 inhibited both phagocytic activity and efficiency.

Keywords: PCDDs/Fs, earthworms, *Eisenia andrei*, immunosuppression, phagocytosis, coelomocytes.

1. INTRODUCTION

Earthworms have been extensively used as standard test organisms in soil toxicity testing¹. They have been used to assess environmental impact from heavy metals^{2,3,4}, pesticides⁵ and some persistent organic pollutants (POPs) such as; PCBs, dioxin-like PCBs and PAHs^{6,7,8,9,10}. However, the knowledge on toxic effects of persistent organic pollutants (POPs) upon the worms is still very limited^{11,12}. For example, there is paucity in the literature describing the toxicity of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) in earthworms which play an important role in soil formation processes and are

considered as interesting bio-indicators for soil contamination. It is well recognized that PCDDs and PCDFs represent the most toxic anthropogenic chemicals in the environment where they enter as by-products of combustion processes. Their toxicity is associated to their stability, lipophilicity, bioaccumulation and high persistence. In addition, previous studies have reported that prolonged exposure to TCDD presents adverse health effects, including immunotoxicity, neurotoxicity, hepatotoxicity and carcinogenesis^{13,14,15,16,17}. Moreover, the international Agency for Research on Cancer (IARC) evaluated TCDD as a Group 1 carcinogen i.e., a human carcinogen^{18,19,20}. Environmental exposure concentrations of 1 ng 2378-TCDD/g soil were considered “a level of concern” for causing cancer²¹. Thus, the presence of these toxic contaminants in soils may have direct harmful effects to the terrestrial ecosystem.

Previous studies have reviewed a large battery of biomarkers to measure the sub-lethal effects of chemicals in earthworms, such as the immunological responses. Since the immune responses are important host defense mechanisms, their modulation may result in increased incidence of infections that could influence the survival of individuals and their populations²². It has been demonstrated that many chemicals, including organic and inorganic trace elements, may adversely affect the immune system of earthworms²³. In fact, it has been shown that the exposure to mercury, cadmium or zinc was toxic and affected cell viability and phagocytosis^{23,24,25,26}. In addition, Goven *et al.* (1994) and Ville *et al.* (1995) showed that the phagocytic competence was also inhibited by polychlorinated biphenyls (PCBs)^{6,7}. Thus, the suppression of the phagocytic activity or reduction of cœlomocytes viability decreases animal resistance to infection²³. This deficiency in immune functions is considered as a sign of toxic effects of environmental pollutants²³.

To date, the immunotoxicological effects of PCDD/Fs on earthworms have not been studied. Thus, the objective of the present study was to investigate, *in vitro* and *in vivo*, the effects of PCDD/Fs mixtures on the immunocompetence of *oligochaete Eisenia andrei* using the phagocytosis assay as immunological biomarker.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

The mixture of PCDDs/Fs in nonane solution was obtained from Wellington laboratories (Ontario, Canada) and stored at 1°C. Dimethyl sulfoxide 99.5% (DMSO), Formaldehyde 37% and phosphate buffer solution (PBS) were obtained from Sigma-Aldrich (USA). Bovine serum albumin (BSA) was purchased from MP Biomedicals, LLc (Ohio, USA) and sodium azide (NaN₃) from FicherChemical, USA. Purified water was obtained from a Milli-Q water purification system.

2.2. Earthworms

The earthworms, *Eisenia andrei* were purchased from the Carolina Biological Supply (Burlington, NC, USA). Prior to the experiment, the animals were maintained in earthworm bedding (Magic Products, Amherst, Jct, WI) at 20 ± 1°C, 70-80% (w/w) moisture and 12:12 h light/dark cycle, and fed once a week with cereals (Magic Worm Food, Magic Products).

2.3. Cell extrusion

Coelomocytes were extracted by inserting a single worm into a 15-ml tube containing 3 ml of *Lumbricus* balanced salt solution (LBSS) composed of 1.5 mM NaCl, 4.8 mM KCL, 1.1 mM MgSO₄.7H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.3 mM Na₂PO₄.7H₂O, 3.8 mM CaCl₂, and 4.3 mM NaHCO₃^{27,28,24}. The liquid medium in the tube was submitted to a 6 V current for 20- 30 s using aluminium wires²⁵. Following the electric shock, a higher turbidity was observed in the solution. Then, the worm was removed from the tube and the solution was gently shaken.

Total number of cells and initial cell viability were determined by diluting 20 µl of cell suspension with 20 µl of 0.4% trypan blue (Sigma-Aldrich, USA) and this cell suspension was placed into an improved Neubauer haemocytometer which was microscopically observed^{24,25}.

2. 4. The phagocytosis assay

The phagocytic activity of cœlomocytes was measured in each worm, based on the protocol of Brousseau *et al.* (1999)²⁸. For each cell suspension, 1.716- μ m fluorescent latex beads (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) were added in a bead: cell ratio of 100:1. The beads were previously sonicated for 5 min at room temperature to get rid of doublet and triplet beads. The cells (with beads) were then incubated for 18 h at room temperature. To remove the beads that were not phagocytosed, the cell suspension was layered over a 3% bovine serum albumin (BSA) and centrifuged at 150 g, 4°C and for 8 min. The cells collected in the pellet were then resuspended in 500 μ l of hemataill (Fisher Scientific, Ottawa, Ont, Canada) containing 0.185% formaldehyde and 0.2% sodium azide. Then, the phagocytosis was measured by flow cytometry in FL1 (Becton Dickinson, San José, USA)²⁸ and for each sample, the fluorescence of 5000 events was recorded. Approximate instrument settings were presented on table 1. Results were analysed with the Cell Quest Pro software (Becton Dickinson) to determine the percentage of cells that engulfed one bead and more (phagocytic activity) or three beads and more (phagocytic efficiency). The results were expressed as the percentage of phagocytosis.

Table 1:

Approximate parameters used for acquisition of phagocytosis Data by flow cytometry

Parameters	value
Forward scatter (FSC Lin)	1.00
FSC threshold	52
Side scatter (SSC log)	227
Fluorescence (FL1 log)	273
Fluorescence (FL3 log)	650

2.5. Exposure protocol

In our study, we carried out two experiments. The first one consists to study the effects of the PCDDs/Fs dose on viability and phagocytic activity of cœlomocytes, after an *in vitro* exposure. In the second experiment, we used a filter paper-contact assay to evaluate the *in vivo* response (viability and phagocytic activity) of the worms.

2. 5. 1. *In vitro* exposure to PCDD/Fs

Before contaminant exposure, the cell solution of each worm was adjusted to 0.5×10^6 cells/ml. To establish the *in vitro* dose-response curves, two series of glass tubes containing the cell suspension were exposed to dilutions of a PCDDs/Fs mixture; C1 and C2 (table 2). These dilutions were done in DMSO (final concentration 0.004% per tube). This DMSO concentration showed no effects on function cell. So, a set of tubes with DMSO (vehicle) was added as negative control and an other set of tubes containing untreated cœlomocytes was added to monitor their viability during the experiments. Cells were exposed for 3 hours to PCDDs/Fs and then the latex beads were added to quantify phagocytosis. The preincubation time of 3 hours was previously optimized (data not shown). PCDD/Fs-incubated cell viability was also monitored in the same time of phagocytosis. It was determined by adding 5 μ l of PI (1 mg/L) to the cell suspensions (PI final concentration 10 μ g/L) and measuring fluorescence by flow cytometry in FL3 using a FACSCalibur cytometer (Becton Dickinson, San José, USA)^{27,28}. Data are expressed as a percentage of viable cells. Six worms were used and the experiment was repeated two times.

Table 2PCDDs/Fs concentrations used for dose-response curves: test *in vitro*

PCDDs/Fs	C1 (ng/ml)x10 ⁻³	C2 (ng/ml)x10 ⁻³
2378-TCDD	25	50
2378-TCDF	25	50
12378-PeCDD	62,5	125
12378-PeCDF	62,5	125
123678-HxCDD	62,5	125
123678-HxCDF	62,5	125
1234678-HpCDD	62,5	125
1234678-HpCDF	62,5	125
OCDD	125	250
OCDF	125	250

2. 5. 2. *In vivo* exposure to PCDD/Fs

The contact toxicity assay was performed following the method described in the OECD guidelines for the testing of chemicals^{1,29}. Three hours prior to the exposure, the worms were removed from the culture, rinsed with water, dampened on filter paper and kept in the dark at 20±1°C in order to allow the removal of the gut content.

Then, volumes of 10, 50, 100 and 150 µl of initial mixture solution of PCDD/Fs (diluted in DMSO < 0.01%) containing; 0.625 ng (2378-TCDD)/µl, 0.625 ng (2378-TCDF)/µl, 1.562 ng (12378-PeCDD)/µl, 1.562 ng (12378-PeCDF)/µl, 1.562 ng (123678-HxCDD)/µl, 1.562 ng (123678-HxCDF)/µl, 1.562 ng (1234678-HpCDD)/µl, 1.562 ng (1234678-HpCDF)/µl, 3.125 ng OCDD/µl and 3.125 ng OCDF/µl, were added to 6-cm diameter plastic Petri dishes containing a No. 3 Whatman filter paper. The resulting exposure concentrations for each volume were illustrated in table 3. Negative controls received just deionized water (200 µl) were included along the test with controls received DMSO (without PCDD/Fs) to test for any effect due to the solvent (vehicle). Then, the worms were individually rinsed with distilled water, blotted dry on a paper towel, weighed (between 0.3 and 0.6 g), and placed in the dish.

Four replicates per treatment were used, consisting of one earthworm per Petri dish. All experiments were realized in the dark at $20 \pm 1^\circ\text{C}$ for 3 hours. The assay was done in duplicate. After 3 hours-exposure duration, the worms were again rinsed with distilled water, blotted and individually weighed. Cell extrusion was carried out and the cell yield, viability and phagocytosis were then determined as described above.

Table 3

Initial concentrations of PCDD/Fs in Petri dishes: *in vivo* exposure

PCDD/F	C1 (ng/cm ²)	C2 (ng/cm ²)	C3 (ng/cm ²)	C4 (ng/cm ²)
2378- TCDD	0,055	0,276	0,553	0,829
2378-TCDF	0,055	0,276	0,553	0,829
12378- PeCDD	0,138	0,691	1,382	2,073
12378- PeCDF	0,138	0,691	1,382	2,073
123678- HxCDD	0,138	0,691	1,382	2,073
123678- HxCDF	0,138	0,691	1,382	2,073
1234678-HpCDD	0,138	0,691	1,382	2,073
1234678-HpCDF	0,138	0,691	1,382	2,073
OCDD	0,276	1,382	2,765	4,147
OCDF	0,276	1,382	2,765	4,147

2. 6. Statistical analysis

The data were expressed as arithmetic means \pm standard deviations. Statistical significances of differences among treatments were determined by ANOVA one-way followed by Tukey HSD post-hoc test for specific comparison of means ($p < 0.05$), significantly different from the vehicle control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. The software Statistica, Version 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK) was used.

3. RESULTS

To distinguish cœlomocyte populations by flow cytometry, based on a dot plot of complexity versus the size of the cells, two gates were drawn around cœlomocytes. We observed a

population of smaller, complex cells following the SSC axis, corresponding to chloragocytes (G1), and population of larger, simple cells following the FSC axis corresponding to amoebocytes (G2) (Fig. 1. a). Debris represents the part not gated in Figure 1.a. Furthermore, it was also shown that G1 cells do not represent phagocytic activity (Fig. 1. b) but G2 represents the delimitation of phagocytic cell population (Fig. 1. c).

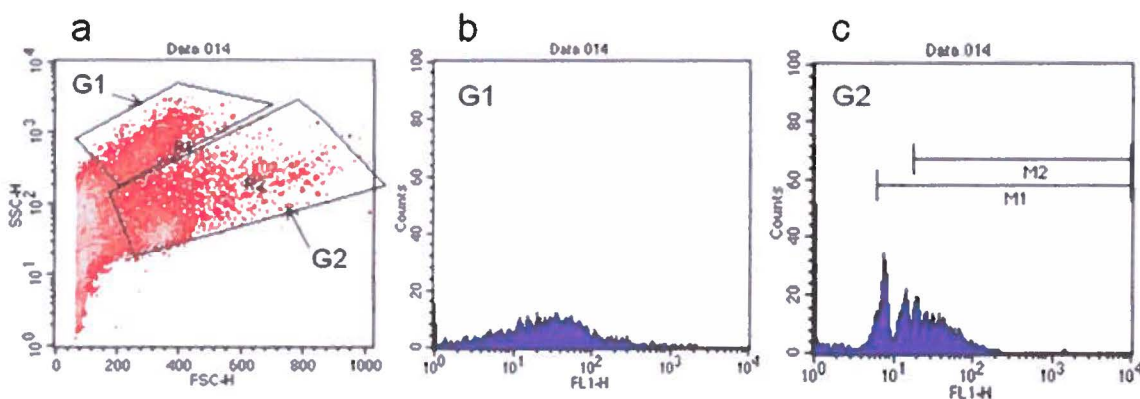


Figure 1: Pattern (a) and fluorescence histograms of *Eisenia andrei* coelomocytes after the phagocytosis assay (b: Chloragocytes, c: amoebocytes, M1: cells have engulfed one bead and more, M2: cells have engulfed three beads and more).

3.1. *In vitro* exposure

In this experiment, cells were exposed to two concentrations of PCDDs/Fs mixture (C1 and C2) during 3 hours before the incubation with beads. The effects of selected concentrations were evaluated by determining cell viability and phagocytic activity. Figures 2 and 3 showed that an increase of PCDDs/Fs concentration can induce changes in viability and phagocytosis profiles, respectively. In fact, a decrease of 10% in viability of treated cells with C1, compared to vehicle control, was shown in Fig. 2. However, a significant decrease ($p < 0.01$), greater than 50% in viability of treated cells with C2 compared to vehicle control was also observed in Fig.2. A significant induction ($p < 0.05$) of phagocytic activity was shown, in Fig. 3, for cells exposed to C2.

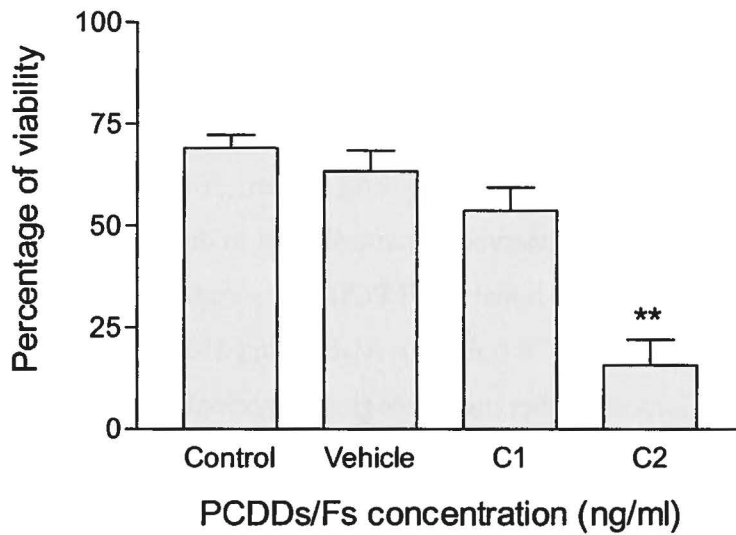


Figure 2: Viability of cœlomocytes following 3 hours of preincubation with PCDDs/Fs and 18 hours with beads. Data are presented as mean \pm SD (n=6), asterisks indicate significant difference ($p < 0.01$) from vehicle.

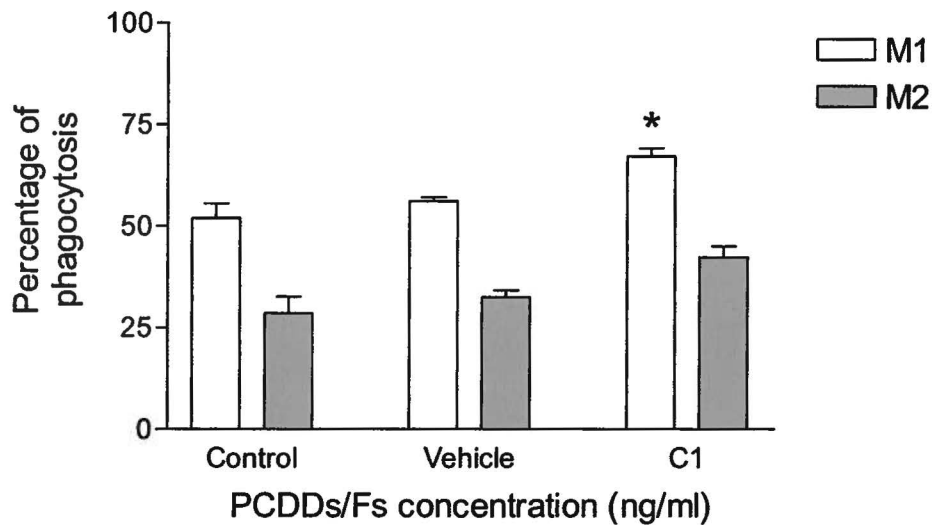


Figure 3: Phagocytic response of cœlomocytes following 3 hours of preincubation with PCDDs/Fs and 18 hours with beads (M1: cells engulfed one bead and more, M2: cells engulfed three beads and more). Data are presented as mean \pm SD (n=6) and asterisk indicates significant difference ($p < 0.05$) from vehicle.

3. 2. *In vivo* exposure

Acute toxicity of PCDD/Fs on *E. andrei* earthworms was carried out by paper contact method. In the first minutes of exposure some observations were noticed about worms comportmental as lifting the body and getting longer. After 3 hours-exposure duration, no mortality of earthworms was observed in controls and in dishes contaminated with PCDD/Fs. However, mucus secretion was noted in all PCDD/Fs - exposed worms and was excessive for worms exposed to C2, C3 and C4 (table 3). Also, about 80% of exposed worms to C3 and C4 exhibited surface lesions and other morphological abnormalities like coiling and curling.

The extruded cell yields of worms exposed to the various PCDD/Fs concentrations tested (C1, C2, C3 and C4) were significantly ($p < 0.05$) lower from the vehicle controls (Fig. 4). While, the cell viability (Fig. 5) was shown to be unaffected by PCDD/Fs concentrations used in this experiment.

Phagocytic activity (Fig. 6) and efficiency (Fig. 7) were significantly inhibited, when worms were exposed to C2, C3 and C4 which contained 0.276, 0.553 and 0.829 ng 2378-TCDD/cm², respectively, compared to vehicle controls.

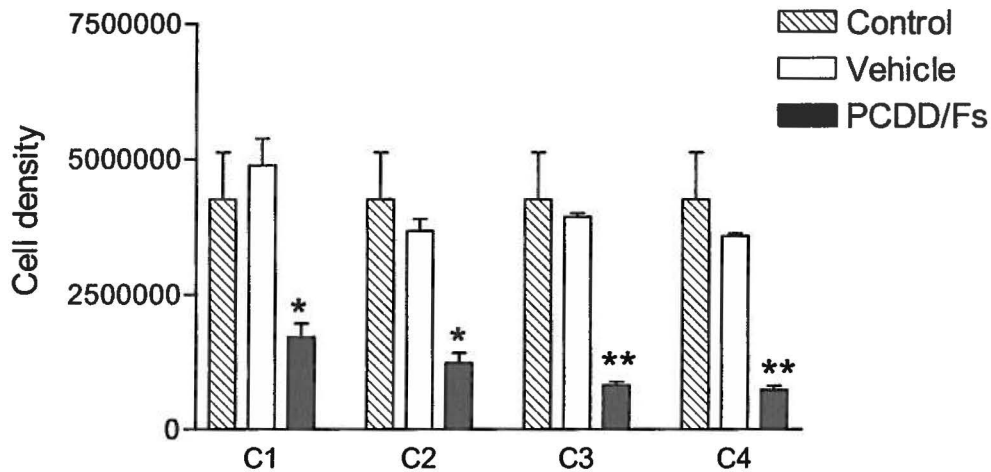


Figure 4: Effects of various concentrations of PCDD/Fs on extruded cell yield of *E. andrei* earthworms. Asterisks represent significant difference compared with vehicle controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

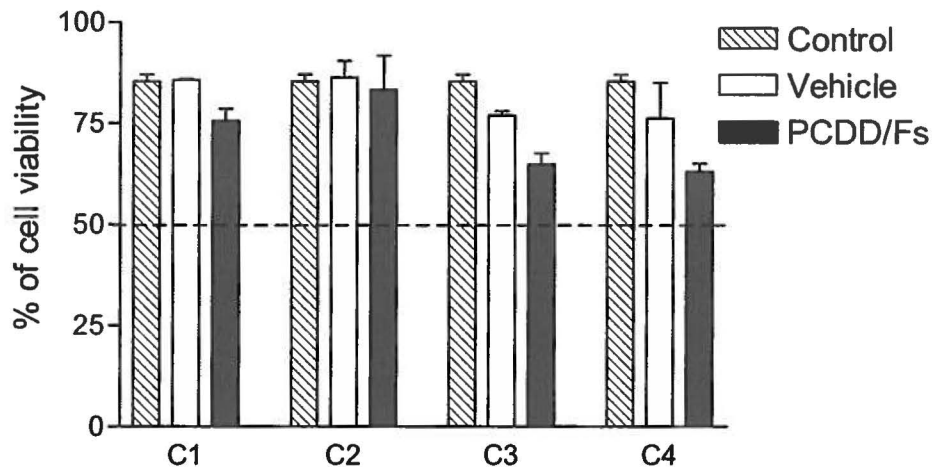


Figure 5: Effects of various concentrations of PCDD/Fs on the viability of the extruded cells of *E. andrei* earthworms.

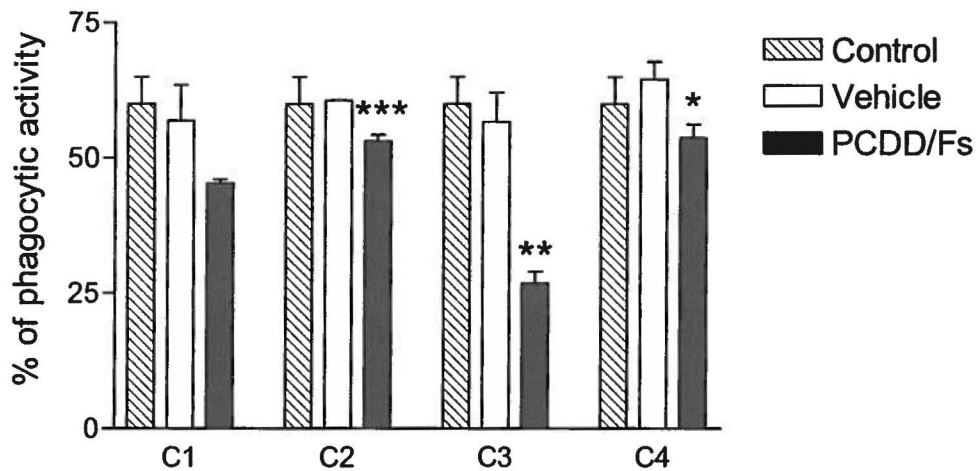


Figure 6: Effects of various concentrations of PCDD/Fs on the phagocytic activity of the extruded cells of *E. andrei* earthworms. Asterisks represent significant difference compared with vehicle controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

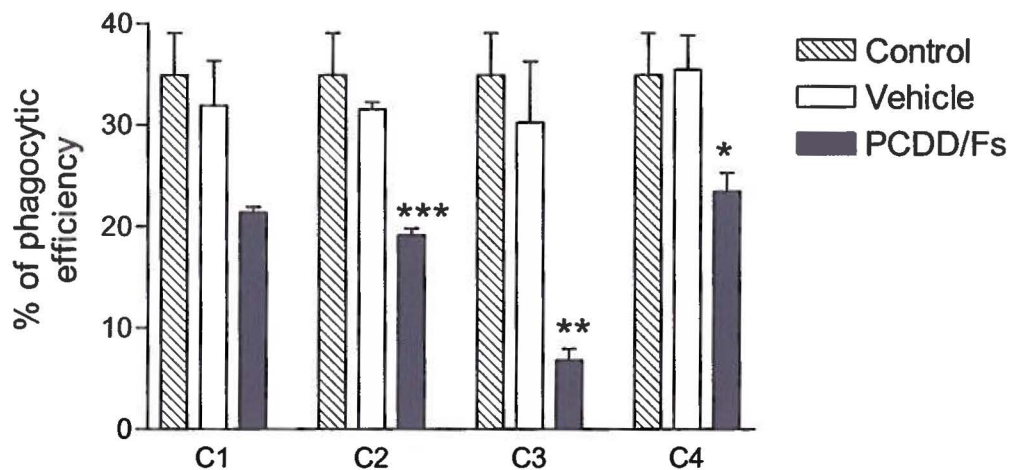


Figure 7: Effects of various concentrations of PCDD/Fs on the phagocytic efficiency of the extruded cells of *E. andrei*. Asterisks represent significant difference compared with vehicle controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

DISCUSSION

In *Eisenia andrei* earthworms, two populations are distinguished; chloragocytes and amœbocytes (small and large or granular and hyaline)³⁰. The gates used to delimitate the phagocytic cell populations showed that only G2 (amœbocytes) which present a phagocytic activity (Fig. 1). These results confirm the reported data which showed that in *Oligochaeta* (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia foetida*, *Eisenia andrei*), all cœlomocyte types, with the exception of chloragocytes (chloragogen cells), produce pseudopodia and are capable of phagocytosis³¹. However, no peaks of fluorescence by cells engulfing beads were obtained for G1 (chloragocytes), the autofluorescence obtained in figure 1.b was due to riboflavin^{32,33} so the chloragocytes had been excluded from analysis in all our experiments.

The results of the *in vitro* exposure showed that C2 presents a cytotoxic effect on cœlomocytes (mortality was greater than 50%) (Fig. 2). In addition, the evaluation of phagocytosis in cells exposed to C1 showed an induction of the phagocytic activity (capacity of cells to engulf one bead and more) compared to vehicle control (Fig. 3). The PCDD/Fs-

associated immuno-stimulation observed in our study was considered as an immunotoxicological effect, since it may result in the loss of regulation within the immune system and can lead to adverse outcomes including autoimmune disease, anergy, and cancer^{34,35}. Also, these stimulatory effects caused by normally inhibitory and toxic substances such as PCDD/Fs may be interpreted as hormesis phenomenon. In fact, hormesis was previously observed in mammalian laboratory models exposed to dioxins^{36,37}. For example; in female Sprague-Dawley rats exposed to single and multiple doses of 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8-heptachlorodibenzo-*p*-dioxin (HpCDD) to study its chronic toxicity and carcinogenicity in lifetime experiments, it was noted that the lowest doses prolonged the life of rats, while higher doses resulted in a shortening of their life³⁶.

To the best of our knowledge, no other studies examined the effects of PCDD/Fs on phagocytic activity using an invertebrate model, but using just mammalian model. Also, few data of the PCDDs/Fs effects on the phagocytosis are available. Omara *et al.* (1998) have exposed leucocytes from male Fischer rats to PCDDs/Fs mixtures (1-15 pg/ml) to study the effects on phagocytosis³⁸. Their results indicate that *in vitro* exposure to this range of concentrations had no suppressive effects on the immune functions assayed, and thus produced no additive immunotoxicity.

The impacts of PCDDs/Fs on vertebrates are known to be mediated through the ligation and activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR). The specific effects of AHR activation by PCDDs/Fs on an immune response are determined by the cell types involved, their activation status, and the type of antigenic stimulus³⁹. However, for the invertebrates, few data are available on the presence of AHR-like and their TCDD dependence. Indeed, AHR-homologs have recently been shown for nematodes (*Caenorhabditis elegans*)⁴⁰, mollusks (*Mya arenaria*)⁴¹ and arthropods (*Drosophila melanogaster*)⁴². Concerning earthworms, some efforts to identify an AHR-homolog in *Eisenia fetida* with RT-PCR analysis were not successful⁴³.

The filter paper exposure assay showed that earthworms exposed to higher concentrations of PCDD/Fs (C3 and C4) exhibited surface lesions; this reflected that worms were affected by dioxins either through skin and/or by feeding. Previous studies have demonstrated that

earthworm skin has direct contact with the contaminated soils and is considered as a significant route to uptake of toxicants^{44,45}. It was also suggested that these toxicants passing through the skin reach the coelomic fluid and were then transported into all the body⁴⁶. In our study, the observable morphological abnormalities like coiling and mucus secretion revealed that the contact toxicity of PCDD/Fs through skin of *E. andrei*, increased with increasing concentration. Our results were consistent with the work of Chakra Reddy *et al.* (2008) on the contact toxicity of profenofos pesticide (PFF) through skin of *E. foetida*, in which, it was found that the toxicity of PFF increased with increasing concentration, and the same observations were noticed.

Cœlomocyte cell yield, quantified using a light microscope, showed significant low levels at all the various PCDD/Fs concentrations tested compared to controls (Fig. 4). Numerous studies have demonstrated the relationship between cell yield and worm weight and proved that cell yield is a linear function of body weight²⁶. However, in the present experiments, the time of exposure was very short (3 hours) and the weight lost was very negligible and this parameter (body weight) was not considered (data not shown). In a recent study on mammalian laboratory model, it was found that TCDD exposure of mice immunized with ovalbumin (OVA) decreased the splenocyte numbers and also decreased the production of cytokines by splenocytes at lower doses of TCDD⁴⁷.

The viability of extruded cœlomocytes seems to be not affected by the PCDD/Fs concentrations (Fig. 5). This indicated that the adverse effects noted were not the result of decreased cell viability.

The measurement of the phagocytic response of earthworm's cœlomocytes revealed that PCDD/Fs inhibited the phagocytic activity (Fig. 6) and efficiency (Fig. 7) at C2, C3 and C4 containing 0.276, 0.553 and 0.829 ng 2378-TCDD/cm², respectively. Since PCDDs/Fs and PCBs belong to persistent organic pollutants (POPs) class, our results may be consistent with two published reports on the toxicity of PCBs^{6,7} which showed that phagocytic competence was inhibited by polychlorinated biphenyls (PCBs). A decrease in immune function may have adverse effects on the survival of organisms. Furthermore, chemical-induced immune suppression may increase susceptibility, incidence and severity of infectious diseases^{23,34,35}.

In summary, our study showed that the effects of PCDD/Fs mixtures on phagocytosis tested *in vitro* were somewhat difficult to quantify because of hormesis and cell mortality. However, the *in vivo* effects include not only the inhibition of the phagocytosis, but also exhibited significant morphological changes in the body wall which suggested that further histopathological study is necessary to develop our understanding of morphological alterations and histological responses caused by PCDD/Fs-exposure.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was conducted in the environmental immunotoxicology laboratory at Institut Armand Frappier (IAF-INRS). The financial support has been provided by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. Michel Fournier). The authors are thankful to Marlene Fortier and also appreciate her excellent technical assistance. We wish to thank Dr Pierre Yves Robidoux (CNRC-IRB), Louis Martel and Elloise Veilleux (CEAEQuebec) for earthworms donations.

REFERENCES

1. OECD. Guidelines for testing of chemicals. Earthworm reproduction tests (*Eisenia fetida/andrei*). Paris, France: Organization for Economic Cooperation and development; Draft Document, January 2000.
2. Homa J, Olchawa E, Stürzenbaum SR, John Morgan A, Plytycz B. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environ Pollut.* 2005;135(2):275-80.
3. Asensio V, Kille P, Morgan AJ, Soto M, Marigomez I. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. *Eur J Soil Biol.* 2007;43(Supplement 1):S233-S8.
4. Lee BT, Kim KW. Arsenic accumulation and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida* affected by chloride and phosphate. *Environ Toxicol Chem.* 2008;27(12):2488-95.
5. Cooper EL, Roch P. Earthworm immunity: a model of immune competence: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia.* 2003;47(5-6):676-88.
6. Goven AJ, Shing Chong C, Fitzpatrick LC, Venables BJ. Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomic fluid and coelomocytes: Enzyme assay for immunotoxicity of xenobiotics. *Environ Toxicol Chem.* 1994;13(4):607-13.

7. Ville P, Roch P, Cooper EL, Masson P, Narbonne JF. PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *J Invertebr Pathol.* 1995;65(3):217-24.
8. Komiyama K, Okaue M, Miki Y, Ohkubo M, Moro I, Cooper EL. Non-specific cellular function of *Eisenia fetida* regulated by polycyclic aromatic hydrocarbons: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia.* 2003;47(5-6):717-23.
9. Vermeulen F, Covaci A, D'Haven H, Van den Brink NW, Blust R, De Coen W, et al. Accumulation of background levels of persistent organochlorine and organobromine pollutants through the soil-earthworm-hedgehog food chain. *Environ Int.* 2010;36(7):721-7.
10. Bu YQ, Luo YM, Shan ZJ, Teng Y, Li ZG. Effect of dioxin-like PCBs on physiological activities of earthworms (*Eisenia fetida*). *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environ Sci.* 2010;30(5):699-704.
11. Reinecke AJ, Nash RG. Toxicity of 2,3,7,8-TCDD and short-term bioaccumulation by earthworms (oligochaeta). *Soil Biol Biochem.* 1984;16(1):45-9.
12. Patel M, Francis J, Cooper EL, Fuller-Espie SL. Development of a flow cytometric, non-radioactive cytotoxicity assay in *Eisenia fetida*: An in vitro system designed to analyze immunosuppression of natural killer-like coelomocytes in response to 7, 12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA). *Eur J Soil Biol.* 2007;43(SUPPL. 1).
13. Alaluusua S, Calderara P, Gerthoux PM, Lukinmaa PL, Kovero O, Needham L, et al. Developmental dental aberrations after the dioxin accident in Seveso. *Environ health perspect.* 2004;112(13):1313.
14. Baccarelli A, Pfeiffer R, Consonni D, Pesatori AC, Bonzini M, Patterson Jr DG, et al. Handling of dioxin measurement data in the presence of non-detectable values: Overview of available methods and their application in the Seveso chloracne study. *Chemosphere.* 2005;60(7):898-906.
15. Eskenazi B, Warner M, Marks AR, Samuels S, Gerthoux PM, Vercellini P, et al. Serum dioxin concentrations and age at menopause. *Environ health perspect.* 2005;113(7):858-62.
16. Wyde ME, Cambre T, Lebetkin M, Eldridge SR, Walker NJ. Promotion of altered hepatic foci by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 17 β -estradiol in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 2002;68(2):295-303.

17. Lin PH, Lin CH, Huang CC, Chuang MC, Lin P. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress, DNA strand breaks, and poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation in human breast carcinoma cell lines. *Toxicol lett.* 2007;172(3):146-58.
18. IARC. Polychlorinated dibenzo-para-dioxine and polychlorinated dibenzofurans. In: WHO, IARC ed. France: International Agency for Research on Cancer; 1997.
19. ATSDR. Toxicological profile for chlorinated dibenzo-p-dioxins. USA: department of health and human services, public health service; December 1998.
20. ATSDR. Dioxins. USA: Division of toxicology and environmental medicine (DTEM), march 2006.
21. Pohl H, DeRosa C, Holler J. Public health assessment for dioxins exposure from soil. *Chemosphere.* 1995;31(1):2437-54.
22. Goven AJ, Fitzpatrick LC, Venables BJ. Chemical toxicity and host defense in earthworms. An invertebrate model. *Ann N Y Acad of Sci.* 1994;712:280-300.
23. Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Brousseau P. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *Am Zool.* 2000;40(3):412-20.
24. Sauvé S, Hendawi M, Brousseau P, Fournier M. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2002;52(1):21-9.
25. Massicotte R, Robidoux PY, Sauvé S, Flipo D, Fournier M, Trottier B. Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory. *J Environ Monit.* 2003;5(5):774-9.
26. Sauvé S, Fournier M. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: Exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2005;60(1):67-72.
27. Brousseau P, Fugère N, Bernier J, Coderre D, Nadeau D, Poirier G, et al. Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (*Oligochaeta*). *Soil Biol Biochem.* 1997;29(3-4):681-4.
28. Brousseau P, Payette Y, Tryphonas H, Blakley B, Boernaus H, Flipo D, et al. Manual of immunological methods. Ed. FL, USA: CRC Press in Boca Raton; 1999.

29. OECD. Guidelines for testing of chemicals. Earthworm acute toxicity tests. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and development; 1984.
30. Vernile P, Fornelli F, Bari G, Spagnuolo M, Minervini F, de Lillo E, et al. Bioavailability and toxicity of pentachlorophenol in contaminated soil evaluated on coelomocytes of *Eisenia andrei* (Annelida: Lumbricidae). *Toxicology in Vitro*. 2007;21(2):302-7.
31. Stein E, Avtalion RR, Cooper EL. The coelomocytes of the earthworm *Lumbricus terrestris*: Morphology and phagocytic properties. *J Morphol*. 1977;153(3):467-77.
32. Homa J, Bzowska M, Klimek M, Plytycz B. Flow cytometric quantification of proliferating coelomocytes non-invasively retrieved from the earthworm, *Dendrobaena veneta*. *Develop Comp Immunol*. 2008;32(1):9-14.
33. Plytycz B, Kielbasa E, Grebosz A, Duchnowski M, Morgan AJ. Riboflavin mobilization from eocyte stores in the earthworm *Dendrodrius rubidus* inhabiting aerially-contaminated Ni smelter soil. *Chemosphere*. 2010;81(2):199-205.
34. Descotes J, Choquet-Kastylevsky G, Van Ganse E, Vial T. Responses of the immune system to injury. *Toxicol Pathol*. 2000;28(3):479-81.
35. Frouin H, Lebeuf M, Saint-Louis R, Hammill M, Pelletier E, Fournier M. Toxic effects of tributyltin and its metabolites on harbour seal (*Phoca vitulina*) immune cells in vitro. *Aquat Toxicol*. 2008;90(3):243-51.
36. Rozman KK, Lebofsky M, Pinson DM. Chronic toxicity and carcinogenicity of 1,2,3,4,6,7,8-heptachlorodibenzo-p-dioxin displays a distinct dose/time toxicity threshold ($c \times t = k$) and a life-prolonging subthreshold effect. *Food Chem Toxicol*. 2005;43(5):729-40.
37. Zapponi GA, Marcello I. Low-dose risk, hormesis, analogical and logical thinking. *Ann N Y Acad of Sci*. 2006;1076, p. 839-57.
38. Omara FO, Flipo D, Brochu C, Denizeau F, Brousseau P, Potworowski EF, et al. Lack of suppressive effects of mixtures containing low levels of methylmercury (MeHg), polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), and Aroclor biphenyls (PCBs) on mixed lymphocyte reaction, phagocytic, and natural killer cell activities of rat leukocytes in vitro. *J Toxicol Environ Health - Part A*. 1998;54(7):561-77.
39. Marshall NB, Kerkvliet NI. Dioxin and immune regulation: Emerging role of aryl hydrocarbon receptor in the generation of regulatory T cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2010, p. 25-37.

40. Powell-Coffman JA, Bradfield CA, Wood WB. Caenorhabditis elegans orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(6):2844-9.
41. Butler RA, Kelley ML, Powell WH, Hahn ME, Van Beneden RJ. An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, Mya arenaria: evidence that invertebrate AHR homologues lack 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. Gene. 2001;278(1-2):223-34.
42. McMillan BJ, Bradfield CA. The Aryl Hydrocarbon Receptor sans Xenobiotics: Endogenous Function in Genetic Model Systems. Mol Pharmacol. 2007 September 1, 2007;72(3):487-98.
43. Wiesner L, Hahn ME, Karchner SI, Cooper EL, Kauschke E. Does an ARYL HYDROCARBON RECEPTOR (AHR)-like molecule exist in earthworms? Some implications for immunity. Pedobiologia. 2003;47(5-6):646-50.
44. Saxe JK, Impellitteri CA, Peijnenburg WJGM, Allen HE. Novel model describing trace metal concentrations in the earthworm, Eisenia andrei. Environ Sci Technol. 2001;35(22):4522-9.
45. Jager T, Fleuren RHLJ, Hogendoorn EA, de Korte G. Elucidating the Routes of Exposure for Organic Chemicals in the Earthworm, Eisenia andrei (Oligochaeta). Environ Sci Technol. 2003;37(15):3399-404.
46. Chakra Reddy N, Venkateswara Rao J. Biological response of earthworm, Eisenia foetida (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. Ecotoxicol Environ Saf. 2008;71(2):574-82.
47. Ao K, Suzuki T, Murai H, Matsumoto M, Nagai H, Miyamoto Y, et al. Comparison of immunotoxicity among tetrachloro-, pentachloro-, tetrabromo- and pentabromo-dibenzo-p-dioxins in mice. Toxicology. 2009;256(1-2):25-31.

3. 1. 3. EFFETS DES PCDD/F SUR L'ACTIVITÉ DES CELLULES NK-LIKE

Article 2

Titre

In vitro effects of PCDD/Fs on NK-like cell activity of *Eisenia andrei* earthworms

Soumis au journal (accepté pour publication)

Journal of xenobiotics

Auteurs

Hayet Belmeskine, Sami Haddad, Louise Vandelac et Michel Fournier

Contribution personnelle

J'ai rédigé cet article à titre d'auteur principal. De plus, j'ai participé à la planification des expériences, j'ai réalisé toutes les expériences, analysé et interprété les résultats.

Contribution des coauteurs

Mes codirecteurs Sami Haddad et Louise Vandelac ont participé à l'analyse des résultats et la correction de l'article. Mon directeur de recherche Michel Fournier a participé à la planification des expériences et à l'analyse des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

RÉSUMÉ

Les effets potentiels des polychlorodibenzo-p-dioxines et dibenzofuranes (PCDD/Fs) sur le système immunitaire des vers de terre n'ont pas encore été étudiés. Dans cette étude, nous avons évalué *in vitro* ces effets sur l'activité des cellules NK-like chez *Eisenia andrei* en utilisant la cytométrie en flux pour l'analyse. Les coelomocytes isolées, utilisés comme cellules effectrices, étaient exposées à différentes concentrations du mélange PCDD/F; C1 (6.25×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml), C2 (12.5×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml) et C3 (25×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml), avant d'être en contact avec des cellules tumorales humaines (K562) utilisées comme cibles. Le pourcentage de cellules cibles lysées par les NK-like est déterminé. Les résultats ont montré une stimulation significative de l'activité des NK-like quand les PCDD/F n'ont pas été éliminées des cellules effectrices avant contact avec les cellules cibles. Cependant, aucun effet n'a été observé lorsque les cellules effectrices ont été lavées ou fixées avant contact avec les K562. L'évaluation de la viabilité des K562 exposées seules aux concentrations C1, C2 et C3 du mélange PCDD/F a révélé que ces trois concentrations étaient cytotoxiques pour les K562. Les résultats trouvés dans cette étude suggèrent que la gamme de concentrations testée est faible pour induire un effet suppressif de l'activité des cellules NK-like.

ABSTRACT

In this study, we assessed *in vitro* the effects of PCDD/Fs on the NK-like cell activity in *Eisenia andrei* earthworms using flow cytometry for analysis. NK-like coelomocytes isolated from *E. andrei* and used as effectors were exposed to various concentrations of PCDD/Fs mixture; C1 (6.25×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml), C2 (12.5×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml) and C3 (25×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml), before being in contact with human tumoral cells (K562) used as targets. The percentage of targets lysed by NK-like was determined. The results showed a significant stimulation of the NK-like activity at C3 when PCDD/Fs were not removed from effectors before contact with targets, while no effects were noted when the effectors were washed (PCDD/Fs removed) or fixed. The assessment of the viability of the targets (K562) exposed alone and separately from effectors, to the three concentrations of PCDD/Fs (C1, C2 and C3), revealed that all these concentrations were cytotoxic for K562. Results suggest that PCDD/Fs concentrations tested in this assay may be considered too low to induce suppressive effects on the immune function; the NK-like activity in *E. andrei* earthworms.

Keywords: PCDD/Fs, immunosuppression, NK-like activity, flow cytometry, earthworms

1. INTRODUCTION

Earthworms play an important role in soil formation processes and in maintaining soil structure and fertility. They are interesting bio-indicators in soils due to their ability to ingest organic and inorganic particles¹. Currently, *Eisenia andrei* is more recommended in standardized acute toxicity protocols² because of its sensitivity and its ability to concentrate some insecticides^{3,4}, heavy metals^{5,6,7} and persistent organic pollutants (POPs)⁸ in their body tissue. Moreover, this species were used to evaluate the sublethal effects of several xenobiotics⁹. In addition, numerous studies, investigated on the mode of action of chemicals on a variety of acute toxic endpoints and subchronic-chronic processes, have demonstrated that a spectrum of chemicals alters the immune system of earthworms^{10,11,12,13,14}. Thus, the immune system's potential was defined as a target organ system for use in assessing the toxicity of exposure to xenobiotics¹⁵. Because the immune responses are important host

defense mechanisms, their modulation may result in increased incidence of infections that could influence the survival of individuals and their populations¹⁵. Subcellular, cellular and organismal immunological indicators were previously used as assessment tools. Recently, there is specific interest in effector molecules in antimicrobial and cytotoxic responses. Published data demonstrated cellular cytotoxic effects of coelomocytes in xenogeneic and allogeneic culture of earthworm coelomocytes as well as coelomocyte cytotoxicity against mammalian tumor cell lines^{16,17}. It was also demonstrated, in cell-mediated cytotoxicity studies, that some persistent organic pollutants such as PCBs¹⁸ and PAHs¹⁹ exerted immunosuppressive effects on NK-like effector cells.

To date, there is paucity in the literature describing the immunotoxicity of PCDDs/Fs in earthworms or in other invertebrate model, but just in mammalian models²⁰. It is well recognized that PCDDs and PCDFs enter the environment as by-products of combustion processes, and represent the most toxic anthropogenic chemicals in the environment associated to their stability, lipophilicity, bioaccumulation and high persistence. In addition, numerous studies have reported that prolonged exposure to TCDD presents adverse health effects, including immunotoxicity, neurotoxicity, hepatotoxicity and carcinogenesis^{21,22,23,24,25}. Moreover, the international Agency for Research on Cancer (IARC) evaluated TCDD as a Group 1 carcinogen i.e., a human carcinogen^{26,27,28}. Environmental exposure concentrations of 1 ng 2378-TCDD/g soil were considered “a level of concern” for causing cancer²⁹. Thus, the presence of these toxic contaminants in soils may have direct harmful effects to the terrestrial ecosystem.

The objective of our study is to investigate, *in vitro*, the effects of a mixture of PCDDs/Fs on NK-like cell activity of *E. andrei* earthworm coelomocytes to lyse human tumor cells (K562), using the flow cytometry for analysis.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents

The mixture of PCDDs/Fs in nonane solution was obtained from Wellington laboratories (Ontario, Canada) and stored at 1°C. Dimethyl sulfoxide 99.5% (DMSO) was obtained from

Sigma-Aldrich (USA). RPMI 1640, containing 25 mM HEPES buffer, L-glutamine and sodium bicarbonate, was supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. K562 (Sigma Aldrich) was cultured in this complete RPMI. The 3, 3'-dioctadecyloxycarbocyanine (DiO) was dissolved in DMSO to yield 3 mM. A stock solution of Propidium Iodide (PI) of 1 mg/ml in water was prepared. Purified water was obtained from a Milli-Q water purification system.

2.2. Earthworms

The earthworms, *E. andrei* were initially purchased from the Carolina Biological Supply (Burlington, NC, USA) and were used to establish the laboratory culture. Prior to the experiment, the animals were maintained in earthworm bedding (Magic Products, Amherst, Jct, WI) at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 70-80% (w/w) moisture and 16:8 h light/dark cycle, and fed once a week with cereal (Magic Worm Food, Magic Products).

2.3. Cell extrusion

Before the experiments, the earthworms were placed for 24 h on moist Whatman filter paper in Petri dishes³⁰ to extract ingested soil prior to cell extrusion. Six purged earthworms were used for the measurement of the NK-like cell activity, and the assay was done on duplicate. A single worm was inserted into a 15-ml tube containing 3 ml of Lumbricus balanced salt solution (LBSS) composed of 1.5 mM NaCl, 4.8 mM KCL, 1.1 mM MgSO₄.7H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.3 mM Na₂PO₄.7H₂O, 3.8 mM CaCl₂, and 4.3 mM NaHCO₃^{12,31,32}. Coelomocytes were extracted using an electrical extrusion method which consists to submit the liquid medium to a 6 V current (lantern battery) for 20- 30 s using aluminium wires¹³. The worm was then removed from the tube and the solution was gently shaken.

Cell yield and initial cell viability were determined by diluting 50 µl of cell suspension with 50 µl of 0.4% trypan blue (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). This mixture was placed into an improved Neubauer hemacytometer which was microscopically observed (table 1)^{12,13}.

Table 1: Mean values of worm weights, cell yield and cell viability

weight of worms (g)	Cell yield	Cell viability (%)
0.43 ± 0.09	(6.75 ± 2.88) x 10 ⁶	85.03 ± 5.41

2.4. Preparation of effector cells

The procedure to prepare the effector cells was performed following Brousseau *et al.* (1999) protocol³². The coelomocyte concentration was adjusted in supplemented RPMI at 1x10⁶ cells/ml and the dilutions were prepared according to the respective effector: target (E: T) ratios needed as shown in table 2.

2.5. Preparation of target cells

The target cells were prepared based on the protocol of Brousseau *et al.* (1999)³². Briefly, after 2 to 3 days culture, the concentration and viability of the K562, at exponential phase, were determined. The viability measured was greater than 95% (the condition to continue the test). The cells (1 x 10⁷) were then centrifuged at 300 x g for 10 min at room temperature in order to pellet. The supernatant and loosen pellet were discarded using a Pasteur pipette with gentle motions. Aliquots of 10 µl of 3 mM DiO were placed into polystyrene tubes; then 1 ml of the K562 cells was added forcefully to disperse the dye (DiO). The tubes were incubated at 37°C in 5% CO₂ for 20 min; then washed twice with RPMI and the cells were resuspended in RPMI at a concentration of 1 x 10⁶ cells/ml.

Table 2: Effector and target cell ratios

Ratio (E: T)	Number of effector cells	Number of target cells
40: 1	4.0 x 10 ⁵ (400 µl)	1.0 x 10 ⁴ (10µl)
20: 1	2.0 x 10 ⁵ (200 µl)	1.0 x 10 ⁴ (10 µl)

2.6. Exposure protocol

To establish the *in vitro* dose-response curves, three series of glass tubes containing the effector cell suspension (each ratio separately) were exposed to three different dilutions of a PCDDs/Fs mixture; C1, C2 and C3 (table 3), respectively. These dilutions were done in DMSO (final concentration 0.004% per tube). So a set of tubes containing coelomocytes with DMSO (vehicle) was added as control. Negative controls received no PCDD/Fs were included along the test with controls received DMSO (without PCDD/Fs) to test for any effect due to the solvent (vehicle). Effector cells were exposed for 3 hours to PCDDs/Fs and then the target cells were added to measure the NK-like cell activity. Effectors and targets were incubated together in dark for other 3 h at ratios of 40:1 and 20:1 (table 2). After 3 h of incubation, 15 µl of PI (1 mg/ml) was added to each tube followed by a centrifugation at 1000 x g for 30 s to pellet the cells; then the tubes were incubated in dark for 1 h before flow cytometric analysis. To identify and understand the effects of the contaminated cell washing before contact with target cells, we carried out two experiments. In the first test, the contaminated effector cells were not washed (PCDD/Fs were not removed) and put directly in contact with K562. The second one consisted to wash the effector cells two times with RPMI before contact with K562. Also, another test was added to understand if chemical particles not eliminated by cells and present in cell suspension can exert effects on K562. So, effector cells were fixed with a fixation solution composed of formaldehyde 37% and sodium azide, before to be in contact with K562. In parallel of these tests, the effects of PCDD/Fs mixtures on the viability of the target cells (K562) were studied separately.

Table 3: Final concentrations of PCDD/Fs in tubes before incubation for 3 h

PCDDs/Fs	C1 (ng/ml)x10 ⁻³	C2 (ng/ml)x10 ⁻³	C3 (ng/ml)x10 ⁻³
2378-TCDD	6,25	12,5	25
2378-TCDF	6,25	12,5	25
12378-PeCDD	15,625	31,25	62,5
12378-PeCDF	15,625	31,25	62,5
123678-HxCDD	15,625	31,25	62,5
123678-HxCDF	15,625	31,25	62,5
1234678-HpCDD	15,625	31,25	62,5
1234678-HpCDF	15,625	31,25	62,5
OCDD	31,25	62,5	125
OCDF	31,25	62,5	125

2.7. Determination of NK-like activity

In order to evaluate the effects of PCDD/Fs on NK-like cell activity, the lysis of human erythroleukemic tumor cell line (K562) was determined by a flow cytometry method³². This method uses two fluorescent dyes to discriminate between effectors and target cells, and between live and dead target cells. DIO, green fluorescent dye, was used to label the membranes of K562, while PI (red fluorescent dye) was added during the assay when K562 membranes are disrupted by effectors. Data were acquired by FACScalibur (Becton Dickinson, San José, USA) flow cytometer, and analysed by the CellQuest Pro software (Becton Dickinson) to determine target cell death. A minimum of 5000 events was acquired for each sample³². The results were expressed in percentage of target cells (K562) lysis.

2.8. Statistics

The data were expressed as arithmetic means \pm standard deviations. Statistical significances of differences among treatments were determined by ANOVA one-way followed by Tukey HSD post-hoc test for specific comparison of means ($p < 0.05$), significantly different from the

vehicle control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. The software Statistica, Version 6.0 (StatSoft, Tulsa) was used.

3. RESULTS

The analyses of target cells were illustrated in Fig. 1. In a forward vs. Side scatter dot plot, a gate (R1) was drawn around the target cells. A single parameter FL-1 histogram (gated on R1) was created. Fig 1.A showed the negative control (the cells before label to DiO) (left peak), while Fig. 1.B represented DiO-labeled targets (right peak). After incubation of effectors-DiO-labelled targets-PI, the analysis was performed using FL-1 (DiO) vs. FL-3 (PI) dot plots gated on R1 (Fig. 2). The right panel in Fig. 2 represented DiO-labeled targets after exposure to contaminated effectors with PCDD/Fs. The upper right quadrant indicated that the targets were double positive which mean that targets were lysed. The lower right quadrant indicated DiO⁺ representing intact target cells. Results from the first assay (PCDD/Fs not removed from effector cells before contact with targets) are shown in Fig. 3. The profiles of NK-like cell function were similar between the 40:1 and 20:1 ratios. The results showed a significant increase ($p < 0.01$) of the percentage of K562 lysis in coelomocytes exposed to the higher PCDD/Fs concentrations C3 (containing 25×10^{-3} ng 2378-TCDD/ ml). In the second assay, performed with washed effector cells, just the ratio 40:1 was considered. No significant differences were observed at any PCDD/Fs mixture concentrations (Fig. 4). In the third assay where the effectors contaminated with PCDD/Fs were fixed before to be in contact with targets, the higher concentration C3 was tested (Fig. 5). No significant difference was observed at C3 compared to controls. In parallel of these tests, the direct effects of the same concentrations of PCDD/Fs mixture (C1, C2 and C3) were tested on the target cells (K562) alone (1×10^6 cell/ml). The results illustrated in Fig. 6 showed significant decrease of the K562 viability at all concentrations C1, C2 and C3, compared to controls ($p < 0.001$).

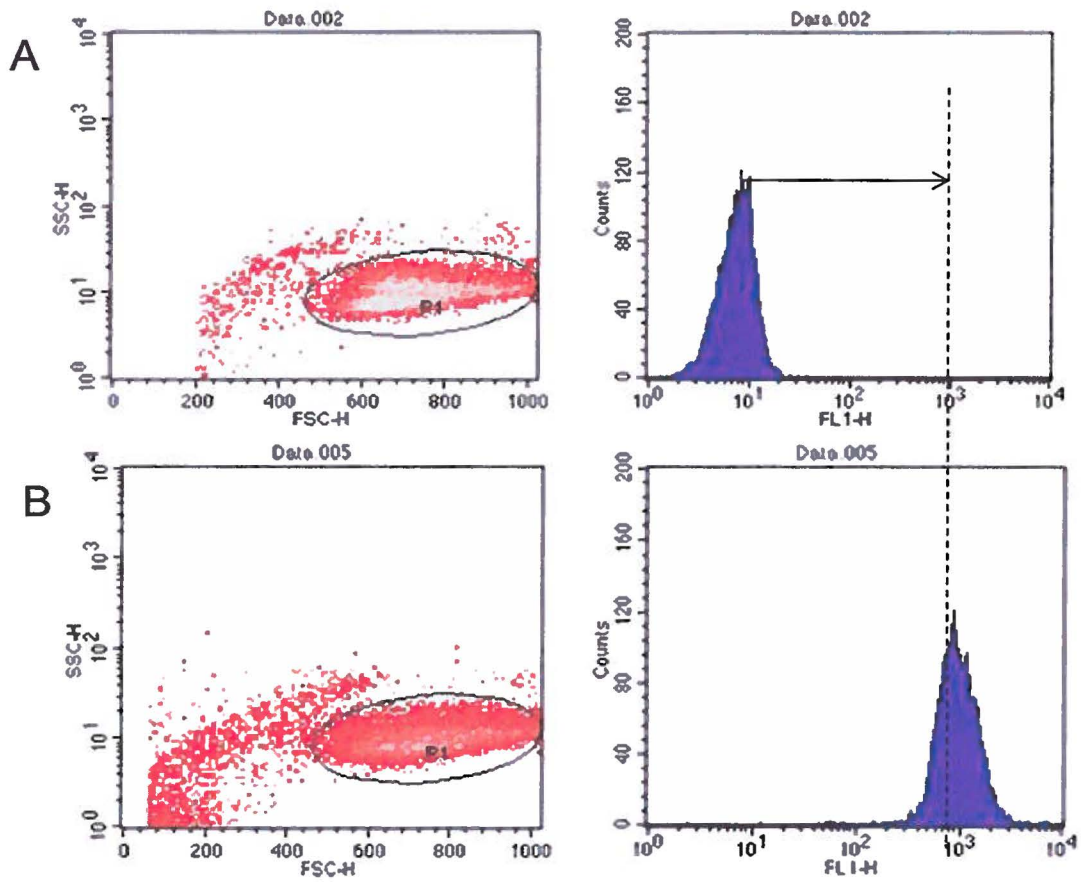


Figure 1: Flow cytometric analysis of DiO-labeled target cells. (A) Negative control (left peak). (B) DiO positive events identified (right peak).

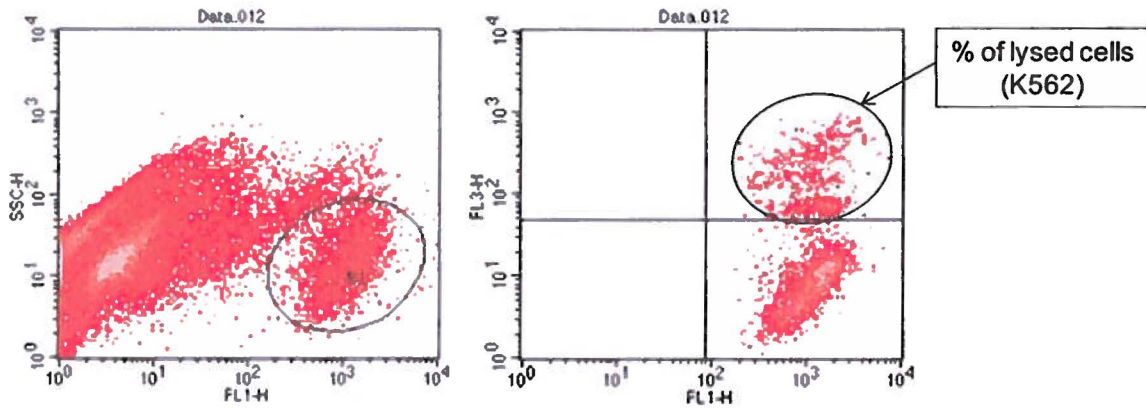


Figure 2: Flow cytometric analysis of target cells using FL-1 vs. FL-3 dot plots gated on R1. The right panel illustrated the DiO-labeled targets after exposure to effectors. The upper right quadrant represents events (targets) double positive. The lower right quadrant represents events DiO-positive (intact targets)

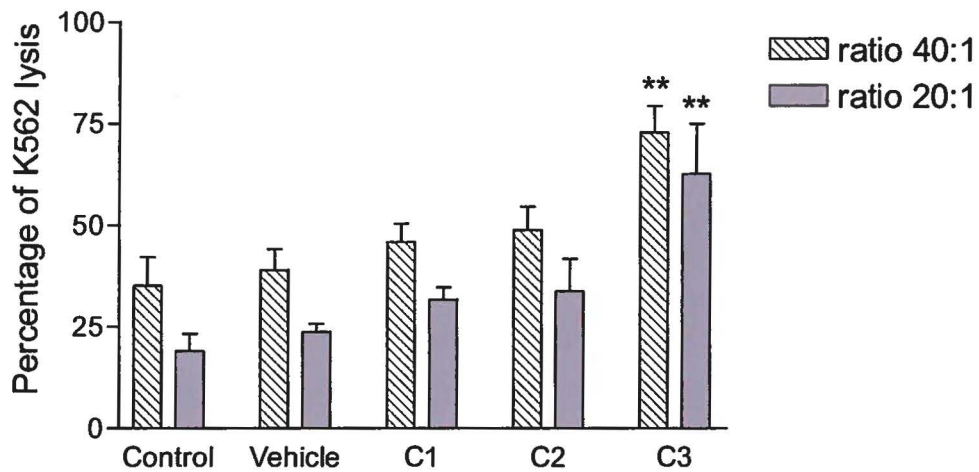


Figure 3: Effects of various concentrations of PCDD/Fs mixture on the *E. andrei* NK-like cell activity to lyse the human tumor cells (K562). The effectors were not washed to remove PCDD/Fs before contact with K562. Asterisks represent significant difference compared with vehicle controls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n = 6$).

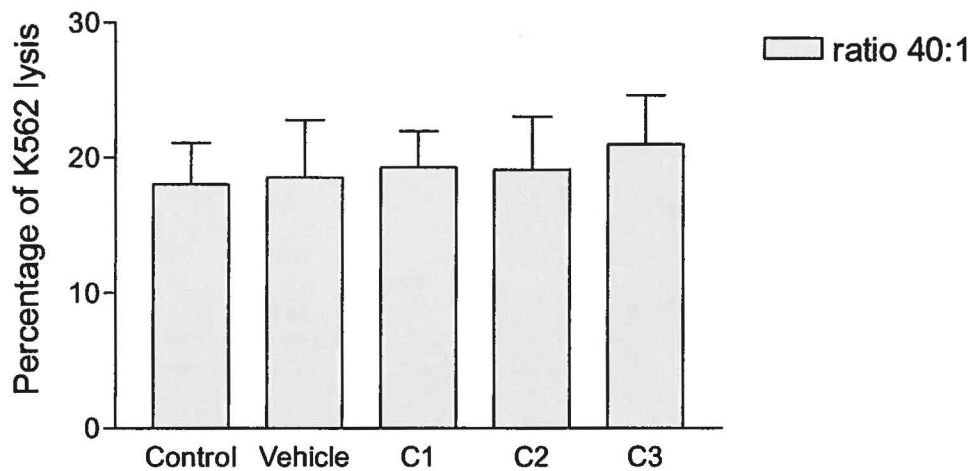


Figure 4: Effects of various concentrations of PCDD/Fs mixture on the *E. andrei* NK-like cell activity to lyse the human tumor cells (K562). The effectors were washed from PCDD/Fs before contact with K562 (n=6).

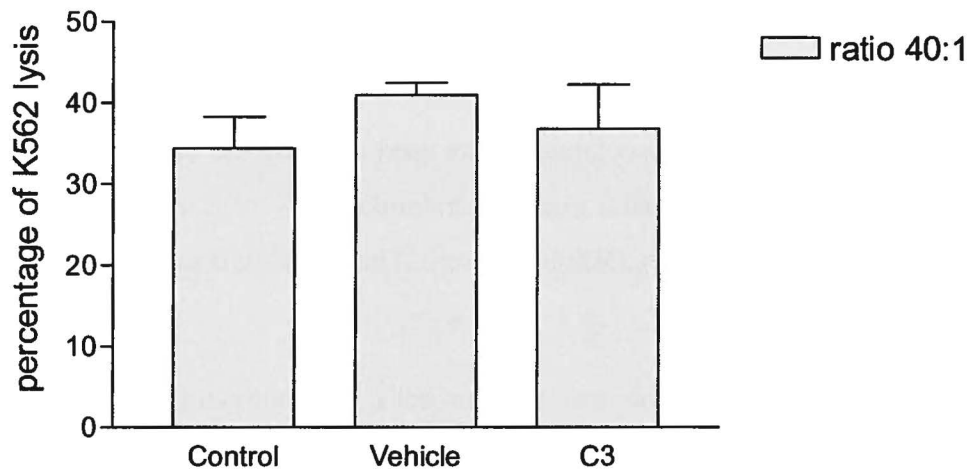


Figure 5: Effects of the higher concentration of PCDD/Fs mixture (C3) on the *E. andrei* NK-like cell activity to lyse the human tumor cells (K562). The effectors were fixed before contact with K562 (n=6).

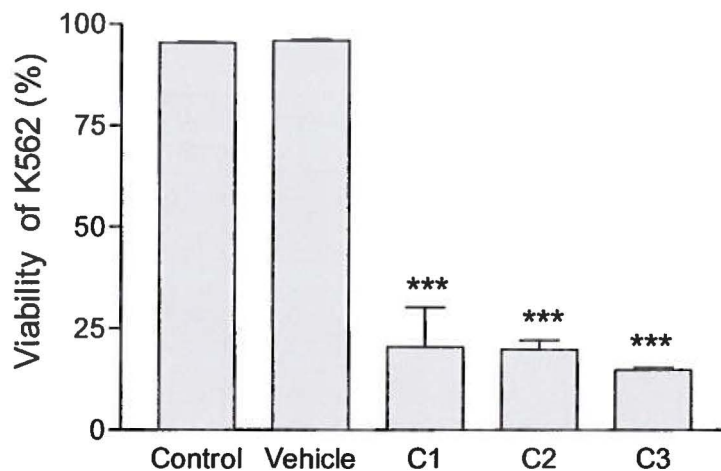


Figure 6: Effects of various concentrations of PCDD/Fs mixture on the human tumor cells (K562) after 3 h of *in vitro* exposure. Asterisks represent significant difference compared with vehicle controls (***) $p < 0.001$, $n = 6$).

4. DISCUSSION

In the present work, the flow cytometry was used to study the cell-mediated cytotoxicity of earthworm NK-like cells isolated from the coelomic cavity of *E. andrei* and exposed *in vitro* to various concentrations of PCDDs/Fs mixture. The target cells used were human tumor cells (K562).

Without washing the contaminated effector cells (coelomocytes), the *in vitro* PCDDs/Fs exposure stimulated significantly NK-like cell activity at C3 (25×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml) compared to controls, while no effect was showed at C1 and C2 (Fig. 3). Generally, the enhancement of the NK cell activity was shown for low concentrations³³. Comparable results have been reported with a mammalian laboratory models exposed to an endocrine disruptor and persistent contaminant; tributyltin chloride (TBTCl). This *in vivo* study observed enhancing effects of TBTCl on NK cell activity only in the low dose group (0.025 mg/kg/day) in old female rats³³. Thus, the results concluded that the increase in NK cell activity was non-linear dose-response. The PCDD/Fs-associated immunostimulation observed in our study at

concentrations of C3 was considered as immunotoxicological effect, since it may result in the loss of regulation within the immune system and can lead to adverse outcomes including autoimmune disease, anergy, and cancer^{34,35}. In the second assay, it was noted that washing contaminated effectors before adding to DiO-labeled K562 targets did not conduct here to effects and no statistically differences were observed between groups (Fig. 4). Similar results were obtained for the third assay where the contaminated effectors were fixed (no active). So, the cell fixation did not present any effect on the percentage of K562 lysis (Fig. 5). This cell fixation assay was conducted to verify if the PCDD/Fs were rejected by cells when fixed and could kill the targets, because like it was demonstrated in Fig. 6, the PCDD/Fs alone were cytotoxic for K562 at the various concentrations used. In fact, a significant inhibition was observed for all concentrations compared to controls.

To our knowledge, this is the first study on immunotoxicological effects of a mixture of dioxins and furans on NK-like cell activity in earthworms. Thus, the absence of data is not helpful for us to compare our results. However some studies on persistent organic pollutants (POPs) were carried out. It was demonstrated that PCBs¹⁸ and PAHs¹⁹ exerted immunosuppressive effects on NK-like effector cells. It is important to note here that Patel *et al.* (2007)¹⁹ have tested washed and non-washed effectors before adding DiO-labeled targets and they have demonstrated that in the two cases, the exposure to the polycyclic aromatic hydrocarbon DMBA resulted in statistically significant immunosuppression of NK-like cell activity in earthworms. Concerning mammalian laboratory models, different results were shown for dioxins depending on doses, species, and sex. For example, in mice, Wang *et al.* (2009)³⁶ have demonstrated that acute 30 µg TCDD/kg-treatment of female mice suppressed the NK cell activity. While, Funseth and Ilbäck (1992)³⁷ have shown that TCDD induces an increased activity of NK cells of male A/J mice after a loading dose of 5 µg TCDD/kg body wt, followed by 3 weekly maintenance doses of 1.42 µg TCDD/kg b.w. In humans, it is not yet elucidated whether dioxins have any effects on the NK cells activity. Some studies have compared the quantitative levels of immune components such as NK cells (CD16+, CD56+) in breast-fed and bottle-fed infants whose mothers were exposed to PCDDs/Fs and PCBs. It was shown that the content of dioxins in breast milk is not enough to induce any change in these-examined immunological parameters during the first year of life^{38, 39}.

In conclusion of our *in vitro* study, it would appear that the PCDDs/Fs presented enhancing effects on NK-like cell activity in the dose of 25×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml in *E.andrei* earthworms. This effect may be explained as a compensatory activation of the body's defences brought about by disturbances in the function of other arms of the immune system³⁷.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was conducted in the environmental immunotoxicology laboratory at Institut Armand Frappier (IAF-INRS). The financial support has been provided by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. Michel Fournier). The authors are thankful to Marlene Fortier and also appreciate her excellent technical assistance. We wish to thank Dr Pierre Yves Robidoux (CNRC-IRB) for earthworms donations.

REFERENCES

1. Edwards CA. The importance of earthworms as key representatives of the soil fauna. In : Edwards CA, editor. Earthworm ecology, second edition. Florida: CRC Press, Boca Raton; 2004. pp. 3-11.
2. OECD Guideline for the testing of chemicals. Earthworm reproduction Test (*Eiseniafetida/andrei*) Draft Document, January 2000.
3. Cooper EL, Roch P. Earthworm immunity: a model of immune competence: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002. *Pedobiologia*. 2003;47(5-6):676-88.
4. Chakra Reddy N, Venkateswara Rao J. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2008;71(2):574-82.
5. Homa J, Olchawa E, Stürzenbaum SR, John Morgan A, Plytycz B. Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions. *Environ Pollut*. 2005;135(2):275-80.

6. Asensio V, Kille P, Morgan AJ, Soto M, Marigomez I. Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd. *Eur J Soil Biol.* 2007;43(Supplement 1):S233-S8.
7. Lee BT, Kim KW. Arsenic accumulation and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida* affected by chloride and phosphate. *Environ Toxicol Chem.* 2008;27(12):2488-95.
8. Vermeulen F, Covaci A, D'Haven H, Van den Brink NW, Blust R, De Coen W, et al. Accumulation of background levels of persistent organochlorine and organobromine pollutants through the soil-earthworm-hedgehog food chain. *Environ Int.* 2010;36(7):721-7.
9. Reinecke AJ, Reinecke SA. Earthworms as test organisms in ecotoxicological assessment of toxicant impacts on ecosystems. In: Edwards CA, editor. *Earthworm ecology*, second edition. Florida: CRC Press, Boca Raton; 2004. pp.299-320.
10. Ville P, Roch P, Cooper EL, Masson P, Narbonne JF. PCBs increase molecular-related activities (lysozyme, antibacterial, hemolysis, proteases) but inhibit macrophage-related functions (phagocytosis, wound healing) in earthworms. *J Invertebr Pathol.* 1995;65(3):217-24.
11. Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H, Brousseau P. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. *Am Zool.* 2000;40(3):412-20.
12. Sauvé S, Hendawi M, Brousseau P, Fournier M. Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2002;52(1):21-9.
13. Massicotte R, Robidoux PY, Sauvé S, Flipo D, Fournier M, Trottier B. Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory. *J Environ Monit.* 2003;5(5):774-9.
14. Sauvé S, Fournier M. Age-specific immunocompetence of the earthworm *Eisenia andrei*: Exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2005;60(1):67-72.
15. Goven AJ, Fitzpatrick LC, Venables BJ. Chemical toxicity and host defense in earthworms. An invertebrate model. *Ann N Y Acad of Sci.* 1994;712:280-300.

16. Cooper EL, Cossarizza A, Suzuki MM, Salvioli S, Capri M, Quaglino D, et al. Autogeneic but Not Allogeneic Earthworm Effector Coelomocytes Kill the Mammalian Tumor Cell Target K562. *Cell Immunol.* 1995;166(1):113-22.
17. Suzuki MM, Cooper EL. Killing of intrafamilial leukocytes by earthworm effector cells. *Immunol Lett.* 1995;44(1):45-9.
18. Suzuki MM, Cooper EL, Eyambe GS, Goven AJ, Fitzpatrick LC, Venables BJ. Polychlorinated biphenyls (PCBs) depress allogeneic natural cytotoxicity by earthworm coelomocytes. *Environ Toxicol Chem.* 1995;14(10):1697-700.
19. Patel M, Francis J, Cooper EL, Fuller-Espie SL. Development of a flow cytometric, non-radioactive cytotoxicity assay in *Eisenia fetida*: An in vitro system designed to analyze immunosuppression of natural killer-like coelomocytes in response to 7, 12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA). *Eur J Soil Biol.* 2007;43(SUPPL. 1).
20. Ao K, Suzuki T, Murai H, Matsumoto M, Nagai H, Miyamoto Y, et al. Comparison of immunotoxicity among tetrachloro-, pentachloro-, tetrabromo- and pentabromo-dibenzo-p-dioxins in mice. *Toxicology.* 2009;256(1-2):25-31.
21. Alaluusua S, Calderara P, Gerthoux PM, Lukinmaa PL, Kovero O, Needham L, et al. Developmental dental aberrations after the dioxin accident in Seveso. *Environ health perspect.* 2004;112(13):1313.
22. Baccarelli A, Pfeiffer R, Consonni D, Pesatori AC, Bonzini M, Patterson Jr DG, et al. Handling of dioxin measurement data in the presence of non-detectable values: Overview of available methods and their application in the Seveso chloracne study. *Chemosphere.* 2005;60(7):898-906.
23. Eskenazi B, Warner M, Marks AR, Samuels S, Gerthoux PM, Vercellini P, et al. Serum dioxin concentrations and age at menopause. *Environ health perspect.* 2005;113(7):858-62.
24. Wyde ME, Cambre T, Lebetkin M, Eldridge SR, Walker NJ. Promotion of altered hepatic foci by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 17 β -estradiol in male Sprague-Dawley rats. *Toxicol Sci.* 2002;68(2):295-303.
25. Lin PH, Lin CH, Huang CC, Chuang MC, Lin P. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress, DNA strand breaks, and poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation in human breast carcinoma cell lines. *Toxicology letters.* 2007;172(3):146-58.

26. IARC. Polychlorinated dibenzo-para-dioxine and polychlorinated dibenzofurans. In: WHO, editor. IARC ed. France: International Agency for Research on Cancer; 1997.
27. ATSDR. Toxicological profile for chlorinated dibenzo-p-dioxins. USA: department of health and human services, public health service; 1998.
28. ATSDR. Dioxins. USA: Division of toxicology and environmental medicine (DTEM), march 2006.
29. Pohl H, DeRosa C, Holler J. Public health assessment for dioxins exposure from soil. *Chemosphere*. 1995;31(1):2437-54.
30. Furst A, Nguyen Q. Cadmium-induced metallothionein in earthworms (*Lumbricus terrestris*). *Biol Trace Elem Res*. 1989;21:81-5.
31. Brousseau P, Fugère N, Bernier J, Coderre D, Nadeau D, Poirier G, et al. Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta). *Soil Biol Biochem*. 1997;29(3-4):681-4.
32. Brousseau P, Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boernaus, H., Flipo, D., Fournier, M., editor. *Manual of immunological methods 1 edition ed.* FL, USA: CRC Press in Boca Raton; 1999.
33. Tryphonas H, Cooke G, Caldwell D, Bondy G, Parenteau M, Hayward S, et al. Oral (gavage), in utero and post-natal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride: Part II: Effects on the immune system. *Food Chem Toxicol*. 2004;42(2):227-41.
34. Descotes J, Choquet-Kastylevsky G, Van Ganse E, Vial T. Responses of the immune system to injury. *Toxicol Pathol*. 2000;28(3):479-81.
35. Frouin H, Lebeuf M, Saint-Louis R, Hammill M, Pelletier E, Fournier M. Toxic effects of tributyltin and its metabolites on harbour seal (*Phoca vitulina*) immune cells in vitro. *Aquat Toxicol*. 2008;90(3):243-51.
36. Wang XH, Zhou XQ, Xu JP, Wang Y, Lu J. The effects of vitamin e on NK cell activity and lymphocyte proliferation in treated mice by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009;31(3):432-8.
37. Funseth E, Ilbäck N-G. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on blood and spleen natural killer (NK) cell activity in the mouse. *Toxicol Lett*. 1992;60(3):247-56.

38. Kaneko H, Matsui E, Shinoda S, Kawamoto N, Nakamura Y, Uehara R, et al. Effects of dioxins on the quantitative levels of immune components in infants. *Toxicol Indus Health*. 2006;22(3):131-6.

39. Weisglas-Kuperus N, Sas TCJ, Koopman-Esseboom C, Van der Zwan CW, De Ridder MAJ, Beishuizen A, et al. Immunologic effects of background prenatal and postnatal exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls in Dutch infants. *Pediatr Res*. 1995;38(3):404-10.

3. 1. 4. SYNTHÈSE

L'étude *in vitro* des effets immunotoxiques d'un mélange de PCDD/F sur la réponse immunitaire chez les vers de terre *E. andrei* a mis en exergue que les dioxines modulent le système immunitaire des *E. andrei*. En effet une immunostimulation de l'activité phagocytaire et de l'activité des cellules NK-like a été observée pour une concentration du mélange contenant 25×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml, 25×10^{-3} ng 2378-TCDF/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 12378-PeCDD/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 12378-PeCDF/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 123678-HxCDD/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 123678-HxCDF/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 1234678-HpCDD/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 1234678-HpCDF/ml, 125×10^{-3} ng OCDD/ml et 125×10^{-3} ng OCDF/ml. Cependant, le test de viabilité a montré un effet cytotoxique des dioxines pour une concentration du mélange contenant 50×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml, 50×10^{-3} ng 2378-TCDF/ml, 125×10^{-3} ng 12378-PeCDD/ml, 125×10^{-3} ng 12378-PeCDF/ml, 125×10^{-3} ng 123678-HxCDD/ml, 125×10^{-3} ng 123678-HxCDF/ml, 125×10^{-3} ng 1234678-HpCDD/ml, 125×10^{-3} ng 1234678-HpCDF/ml, 250×10^{-3} ng OCDD/ml et 250×10^{-3} ng OCDF/ml.

3.2. ÉTUDE *IN VIVO* DES EFFETS IMMUNOTOXIQUES DES PCDD/F SUR LES VERS DE TERRE *E. ANDREI*

3.2. 1. INTRODUCTION

Après les tests *in vitro*, il est recommandé d'effectuer une confirmation du potentiel immunotoxique du xénobiotique par des études *in vivo*. De là, découle le deuxième principe de l'exploration immunotoxicologique qui consiste à exposer des animaux de l'espèce faunique d'intérêt à des expositions contrôlées de laboratoire (Fournier *et al.*, 2004). En effet dans cette partie de notre étude, nous avons exposé les vers de terre *E.andrei* directement à différentes concentrations du mélange de PCDD/Fs. Deux types d'expositions ont été réalisés. La première exposition était effectuée dans des boîtes à pétri où le ver était en contact avec un papier filtre contaminé par les dioxines, par contre la deuxième exposition a été réalisée dans des pots contenant du sol artificiel contaminé par les dioxines. Dans les deux cas, les vers peuvent être contaminés par les dioxines par ingestion et par voie cutanée. Dans le test contact- papier filtre, nous avons étudié l'effet des PCDD/F sur la cellularité, la viabilité cellulaire et sur l'activité et l'efficacité phagocytaire. Dans le test contact-sol, nous avons étudié l'effet sur la cellularité, la viabilité cellulaire, sur l'activité et l'efficacité phagocytaire ainsi que sur l'activité des cellules NK-like. De plus, nous avons évalué la biodisponibilité des dioxines.

3. 2. 2. TEST DE TOXICITÉ: CONTACT-PAPIER FILTRE

Dans cette partie, en utilisant le test de toxicité basé sur le contact-papier filtre (Fig. 1), nous avons évalué l'immunocompétence des vers de terre *E.andrei* après exposition à un mélange de PCDD/F présent à différentes concentrations soient; C1, C2, C3 et C4 contenant 0,05, 0,3, 0,5 et 0,83 ng 2378-TCDD/cm², respectivement.

Note : tel que mentionné dans la section 3.1.2 (Effets sur la phagocytose), les résultats obtenus dans l'exposition *in vivo* ont été combinés à ceux obtenus dans les tests *in vitro* (présentés dans l'article 1).

Donc, les détails concernant le Matériel et méthodes pour cette partie (section 3.2.2) sont très bien décrits dans l'article 1 de la thèse.

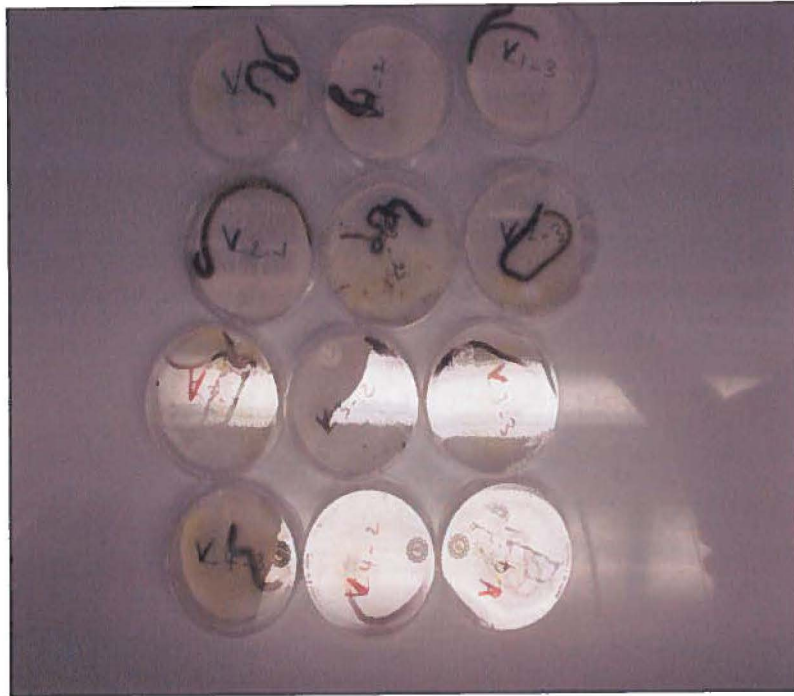


Figure 1: Disposition des vers de terre *E.andrei* dans les boites à petri lors de l'exposition aux PCDD/F

3. 2. 3. TEST DE TOXICITÉ: CONTACT-SOL

Manuscrit 3

Titre

Toxic effects of PCDD/Fs on *Eisenia andrei* earthworms

Auteurs

Hayet Belmeskine, Sami Haddad, Louise Vandelac, Sébastien Sauvé et Michel Fournier

Soumis dans le journal (en révision)

Ecotoxicology and Environmental Safety

Contribution personnelle

J'ai rédigé cet article à titre d'auteur principal. De plus, j'ai participé à la planification des expériences, j'ai réalisé toutes les expériences, analysé et interprété les résultats.

Contribution des coauteurs

Sami Haddad, Louise Vandelac et Sébastien Sauvé ont participé à l'analyse des résultats et à la correction de l'article. Michel Fournier a participé à la planification des expériences et à l'analyse des résultats ainsi qu'à la correction du manuscrit.

RÉSUMÉ

Les vers de terre *Eisenia andrei* ont été utilisés pour étudier la toxicité d'un mélange de PCDD/F pour les vers de terre durant 28 jours d'exposition. Les expériences ont été réalisées dans un sol artificiel contaminé avec des dioxines à des concentrations de C1 (0.1 ng 2378-TCDD/g soil), C2 (1 ng 2378-TCDD/g soil) et C3 (1.5 ng 2378-TCDD/g soil). Les effets des PCDD/F sur la survie, la croissance, la phagocytose et l'activité des cellules NK-like ont été évalués. Les résidus de PCDD/F dans les sols ont été mesurés pour évaluer la biodisponibilité. Après 28 jours d'exposition, aucune mortalité n'a été observée pour les faibles concentrations (C1). Cependant, des mortalités de 10 et 100% ont été notées pour les fortes concentrations C2 et C3, respectivement. Une diminution significative de la vitesse de croissance a été obtenue en C2 et aucun effet n'a été noté en C1. De plus, une inhibition de l'activité et l'efficacité phagocytaires a été observé en C2. Par ailleurs, une stimulation de l'activité des cellules NK-like a été notée en C1. La détermination des résidus de PCDD/F dans les sols avait indiqué une atténuation lente pour les plus fortes concentrations (C2 et C3). En se basant sur nos résultats, nous pouvons poser l'hypothèse que l'exposition à des concentrations supérieures ou égales à C2 induisent des effets néfastes sur le potentiel biotique et les fonctions immunitaires chez les vers de terre *E. andrei*.

ABSTRACT

The earthworms *Eisenia andrei* were used to study the toxicity of PCDD/Fs mixtures to earthworms during 28 days of exposure. The experiments were performed on artificial soil contaminated with dioxins at levels of C1 (0.1 ng 2378-TCDD/g soil), C2 (1 ng 2378-TCDD/g soil) and C3 (1.5 ng 2378-TCDD/g soil). Effects of PCDD/Fs on survival, growth rate and immune responses; phagocytosis and NK-like cell activity, were determined. Also, residues of PCDD/Fs were measured in soils to evaluate the availability. No mortality was observed at the lowest concentration (C1), while mortalities of 10 and 100% were noted at the highest concentrations tested C2 and C3, respectively. A significant reduction in growth rate was obtained at C2 and no effects at C1. Additionally, an inhibition of phagocytic activity and efficiency was observed at higher concentrations. In contrast, an enhancement of NK-like cell activity was shown at lower concentrations. The residues of PCDD/Fs in soils indicated slower disappearance at higher concentrations. Based on our results, we hypothesize that the PCDD/Fs mixtures tested at levels equal or higher to C2 (1 ng 2378-TCDD/g soil), lead to adverse effects on biotic potential and immune functions in *E. andrei* earthworms.

Keywords: dioxins, soil, toxicity, earthworms, phagocytosis, NK-like cells

Abbreviations: PCDDs: polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins; PCDFs: polychlorinated dibenzofurans; NK: natural killers; PCBs: polychlorinated biphenyls; PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons.

1. INTRODUCTION

In soil ecotoxicological studies, earthworms have been extensively used as bioindicators and test organisms for measuring the lethal and sub lethal effects of chemicals in the soil environment. The earthworms constitute approximately 60 to 80% of the terrestrial biomass and play an important role in soil formation processes and in maintaining soil structure and fertility. Most of these studies have used the compost worms *Eisenia foetida* or *Eisenia andrei* due to their availability and because they are relatively easy to handle in the laboratory. In addition to their sensitivity to chemicals; the tissues of earthworms can concentrate some insecticides (Cooper and Roch, 2003, Reddy and Venkateswara, 2008), trace metals (Homa *et al.*, 2005, Asensio *et al.*, 2006, Lee and Kim, 2008) and persistent organic pollutants (POPs) (Vermeulin *et al.*, 2010). To date, some studies on POPs have investigated the effects of PCBs (Goven *et al.*, 1994; Ville *et al.*, 1995), dioxin-like PCBs (Bu *et al.*, 2010) and PAHs (Komiya *et al.*, 2003) on earthworms, but few data have been reported on the effects of PCDDs/Fs (Reinecke and Nash, 1984). It is well recognized that PCDDs and PCDFs enter the environment either through unintentional application as by-products of combustion processes and represent one of the most toxic anthropogenic chemicals in the environment given their stability, lipophilicity, bioaccumulation potential and high persistence. In addition, numerous studies have reported that prolonged exposure to TCDD presents adverse health effects, including immunotoxicity, neurotoxicity, hepatotoxicity and carcinogenesis (Alaluusua *et al.*, 2004; Baccarelli *et al.*, 2005; Eskenazi *et al.*, 2005, Wyde *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2007). Moreover, the international Agency for Research on Cancer (IARC) has classified TCDD as a Group 1 carcinogen i.e., a human carcinogen (IARC 1997, ATSDR 1998, ATSDR 2006). Environmental exposure concentrations of 1 ng 2378-TCDD/g soil were considered “a level of concern” for causing cancer (Pohl *et al.*, 1995). Thus, the presence of these toxic contaminants in soils may have direct harmful effects to the terrestrial ecosystem.

In order to assess the ecological risks of contaminated soils with different environmental pollutants, standardized tests have been developed. A guideline for conducting soil toxicity tests has been reported by the Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD 1984, 2004) or by the International Standard Organization (ISO 1993, 1998, 2004). These toxicity tests are used to predict acute and/or chronic effects of chemicals into the

environment (Sanchez-Hernandez, 2006). Usually, the typical endpoints measured are survival, growth and reproduction rate. In addition to these parameters, earthworm performance may be evaluated through a biomarker approach (Scott-Fordsmand and Weeks, 2000) studied at cellular and tissue levels. Many biomarkers may be employed but in this study, the focus was on immunological biomarkers; phagocytic activity and NK-like cell activity. Since immune responses represent important host defense mechanisms, their modulation may result in increased incidence of infections that could influence the survival of individuals and their populations (Goven *et al.*, 1994).

Previously, the immune system parameters as phagocytosis and NK-like cell activity have been used as sensitive sub-lethal endpoints to assess toxicity of various chemicals to earthworms. It has been shown that the exposure to mercury, cadmium or zinc was toxic and affected cell viability and phagocytosis (Fournier *et al.*, 2000; Sauvé *et al.*, 2002; Massicotte *et al.*, 2003; Sauvé and Fournier, 2005). In addition, Goven *et al.* (1994) and Ville *et al.* (1995) showed that the phagocytic competence is also inhibited by polychlorinated biphenyls (PCBs). Thus, the suppression of the phagocytic activity or reduction of coelomocytes viability decreases animal resistance to infection (Fournier *et al.*, 2000). It was also demonstrated that PCBs (Suzuki *et al.*, 1995) and PAHs (Patel *et al.*, 2007) exerted immunosuppressive effects on NK-like effector cells. This deficiency in immune functions is considered as a sign of toxic effects of environmental pollutants (Fournier *et al.*, 2000).

The objectives of the present study were to investigate, in laboratory; whether PCDD/Fs exert toxic effects on growth, survival and immune system of earthworms.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Reagents

The mixture of PCDDs/Fs in nonane solution was obtained from Wellington laboratories (Ontario, Canada) and stored at 1°C. Dimethyl sulfoxide 99.5% (DMSO), formaldehyde 37%, and phosphate buffer solution (PBS) were obtained from Sigma-Aldrich (USA). The bovine serum albumin (BSA) was purchased from MP Biomedicals, LLc (Ohio, USA) and sodium azide (NaN₃) from FicherChemical, USA. RPMI 1640, containing 25 mM

HEPES buffer, L-glutamine and sodium bicarbonate, was supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin. K562 (Sigma Aldrich) was cultured in this complete RPMI media. The 3, 3'-dioctadecyloxacarbocyanine (DIO) was dissolved in DMSO to yield 3 mM. A stock solution of propidium iodide (PI) of 1 mg/ml in water was prepared. Purified water was obtained from a Milli-Q water purification system.

2.2. Earthworms

The earthworms, *Eisenia andrei* were initially purchased from the Carolina Biological Supply (Burlington, NC, USA) and were used to establish the laboratory culture. Prior to the experiment, the animals were maintained in earthworm bedding (Magic Products, Amherst, Jct, WI) at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 70-80% (w/w) moisture and 16:8 h light/dark cycle, and fed once a week with cereal (Magic Worm Food, Magic Products).

2.3. Soil toxicity tests

The soil toxicity test using *E. andrei* earthworms was carried out, on artificial soil, to determine the relative lethal and sublethal effects of PCDD/Fs-spiked soil samples following exposure by direct contact and by ingestion. The earthworm exposures were realised in standard conditions following the US EPA (1989a) and the OECD guidelines (1993). Briefly, the earthworms used in the toxicity tests were healthy adults, presenting clitellum and a body mass ranging from 300 to 600 mg fresh weight. The soil used was an artificial OECD- type soil consisting of 10% (w/w) sphagnum peat, 20% (w/w) kaolinite clay, 70% (w/w) quartz sand, and adjusted to pH 6.5 with CaCO_3 (OECD, 1993). The test soil was placed into clean 1-L glass jars at 500 g (dry weight) for each jar. The test mixture of PCDD/Fs was first dissolved in DMSO (final concentration 0.01%) before being spiked into the soil to make final concentrations of C1, C2 and C3, where 2378-TCDD concentrations were 0.1, 1 and 1.5 ng/g soil, respectively (table 1). The PCDD/Fs concentrations were chosen based on “the level of concern” of 2378-TCDD (1 ng/g soil) described in the literature (Pohl *et al.*, 1995). Three jars were prepared for each concentration. Negative controls received no PCDD/Fs were included along the test with controls receiving DMSO (without PCDD/Fs) to test for any effect due to the solvent (vehicle). The soil humidity was then adjusted to 75% of the total

water-holding capacity of the soil as described in Robidoux *et al.*, 1999. Before starting the test, the worms were acclimated for 24 h. Then, ten earthworms, individually washed and weighed, were placed in each replica glass jar. The jars were covered with a geotextile membrane and a perforated cap and were maintained at 20 °C with a 16:8 h light/dark cycle. The earthworms were fed weekly with 2 g of dry cereal.

The percentages of survival and growth rate were determined every week. The growth rate was determined using Eq. (1) of Martin (1986), where W_0 is the weight at the beginning of exposure and W_t the weight after t days of exposure.

$$\text{Relative growth rate} = \ln(W_t / W_0) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

After 28 days of exposure, the live worms were rinsed with deionized water, blotted dry and individually weighed before being placed for 3 hours on moist Whatman filter paper in Petri dishes (Furst and Nguyen, 1989) to extract ingested soil.

Table 1: Initial concentrations of PCDD/Fs mixtures in artificial soils

PCDD/Fs	C1 (ng/g)	C2 (ng/g)	C3 (ng/g)
2378- TCDD	0,1	1	1,5
2378-TCDF	0,1	1	1,5
12378- PeCDD	0,25	2,5	3,75
12378- PeCDF	0,25	2,5	3,75
123678- HxCDD	0,25	2,5	3,75
123678- HxCDF	0,25	2,5	3,75
1234678-HpCDD	0,25	2,5	3,75
1234678-HpCDF	0,25	2,5	3,75
OCDD	0,5	5	7,5
OCDF	0,5	5	7,5

2.4. Cell extrusion

Five purged earthworms from each jar were used for the measurement of the immunological biomarkers; phagocytosis and NK-like activity. A single worm was inserted into a 15-ml tube containing 3 ml of Lumbricus balanced salt solution (LBSS) composed of 1.5 mM NaCl, 4.8 mM KCL, 1.1 mM MgSO₄.7H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.3 mM Na₂PO₄.7H₂O, 3.8 mM CaCl₂, and 4.3 mM NaHCO₃ (Brousseau *et al.*, 1997b, 1999; Sauvé *et al.*, 2002). Coelomocytes were extracted using an electrical extrusion method which consists in submitting the liquid medium to a 6 V current (lantern battery) for 20-30 s using aluminium wires (Massicote *et al.*, 2003). The worm was then removed from the tube and the solution was gently shaken.

Cell concentration and initial cell viability were determined by diluting 50 µl of cell suspension with 50 µl of 0.4% trypan blue (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). This mixture was placed into an improved Neubauer hemocytometer which was microscopically observed (Sauvé *et al.*, 2002, Massicote *et al.*, 2003).

2.5. Phagocytosis

The phagocytic activity of coelomocytes was measured in each worm, based on the protocol of Brousseau *et al.* (1999). For each cell suspension, a volume of fluorescent latex beads (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) was added in a bead: cell ratio of 100:1. The beads were previously sonicated for 5 min at room temperature to get rid of doublet and triplet beads. The cells (with beads) were then incubated for 18 h at room temperature. To remove the beads that were not phagocytosed, the cell suspension was layered over a 3% bovine serum albumin (BSA) and centrifuged at 150 g, 4°C and for 8 min. The cells collected in the pellet were then resuspended in 500 µl of hematall (Fisher Scientific, Ottawa, Ont, Canada) containing 0.185% formaldehyde and 0.2% sodium azide. Thus, the phagocytosis was measured by flow cytometry in FL1 (Becton Dickinson, San José, USA) (Brousseau *et al.*, 1999) and for each sample, the fluorescence of 5000 events was recorded. Results were analysed with the Cell Quest Pro software (Becton Dickinson) to determine the percentage of cells that engulfed one bead and more (phagocytic activity) or three beads and more (phagocytic efficiency). The results were expressed as the percentage of phagocytosis.

2.6. Determination of NK-like activity

In order to evaluate the effects of PCDD/Fs on NK-like cell activity, the lysis of human erythroleukemic tumor cell line (K562) was determined by a flow cytometry method (Brousseau *et al.*, 1999). This method uses two fluorescent dyes to discriminate between effectors and target cells, and between live and dead target cells. DIO, green fluorescent dye, was used to label the membranes of K562, while PI (red fluorescent dye) was added during the assay when K562 membranes are disrupted by effectors. Thus, both membrane targets and effectors will be labelled by PI and exhibit red fluorescence, but only targets pre-labeled with DIO will exhibit green fluorescence and permit to differentiate between effectors and target cells (Patel *et al.*, 2007). When the membrane of a target cell is damaged by NK-like cell, PI can no longer be excluded and the target cell is stained by PI to become DiO⁺, PI⁺. In contrast, intact target cells unaffected by NK-like cells will exclude PI to remain DiO⁺, PI⁻ (Brousseau *et al.*, 1999). Data were acquired by FACScalibur (Becton Dickinson, San José, USA) flow cytometer, and analysed by the CellQuest Pro software (Becton Dickinson) to determine target cell death. The results were expressed in percentage lysis of target cells (K562).

2. 7. Residues of PCDD/Fs in soils

The residues of PCDD/Fs in soils were measured after 28 days of exposure by gas chromatography coupled to mass spectroscopy at high resolution (HRGC/HRMS) in the laboratory of industrial pollutions in Centre d'Expertise en Analyse Environnementale du Quebec (CEAEQ). The details on materials, extraction and analytical determinations of PCDD/Fs were available on the website of the laboratory (<http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA400DF10>).

2. 8. Statistics

The data were expressed as arithmetic means \pm standard deviations. Three independent replicates were carried out. For each replicate, the mean for the biomarkers was calculated from five individuals. Data represented on figures were the mean of the three replicates.

Statistical significances of differences among treatments were determined by ANOVA one-way followed by Tukey HSD post-hoc test for specific comparison of means ($p < 0.05$), significantly different from the vehicle control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$. The software Statistica, Version 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK) was used.

3. RESULTS

3.1. Survival and growth rate

After an exposure of 28 days, no mortality of earthworms was observed in controls and in soils contaminated with C1 (100 pg 2378-TCDD/g soil). However, 10 and 100% of mortality were noted in soils contaminated by C2 (1000 pg 2378-TCDD/g soil) and C3 (1500 pg 2378-TCDD/g soil), respectively (Fig. 1). In addition, Fig.2 showed that the growth rates of worms in controls were positives and the animal weight increased significantly during the exposure. For example, for vehicle controls, the mean body weight of the worms increased from 0.47 ± 0.04 g (at t0 days) to 0.71 ± 0.1 g (at t28 days). Less effect was observed on earthworms exposed to C1 while the worms exposed to C2 presented pronounced effects and they were significantly different from the controls. In fact, a reduction in growth rate was obtained at 7, 14 and 21 days and stable at 28 days.

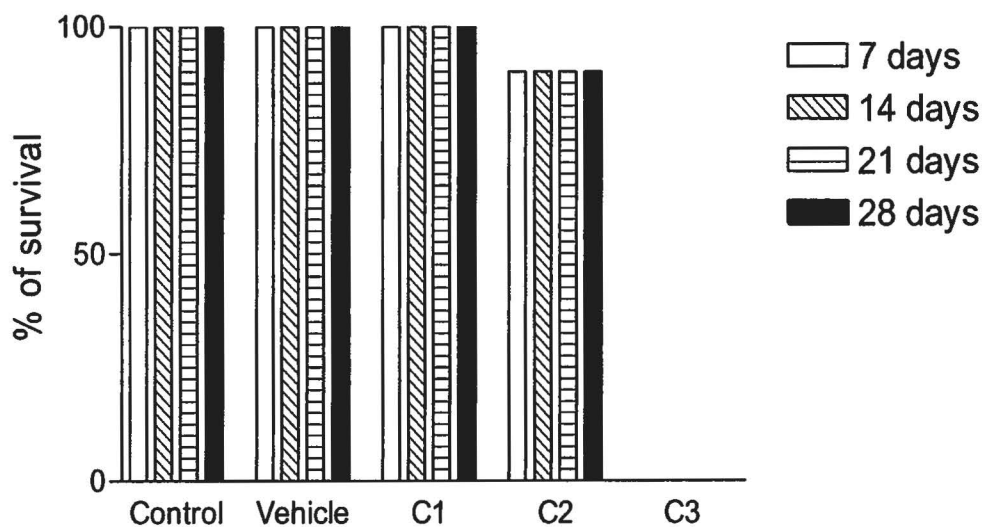


Figure 1: Effects of various concentrations of PCDD/Fs mixture on the percentage of survival of *Eisenia andrei* earthworms exposed 28 days in spiked soils (n=3).

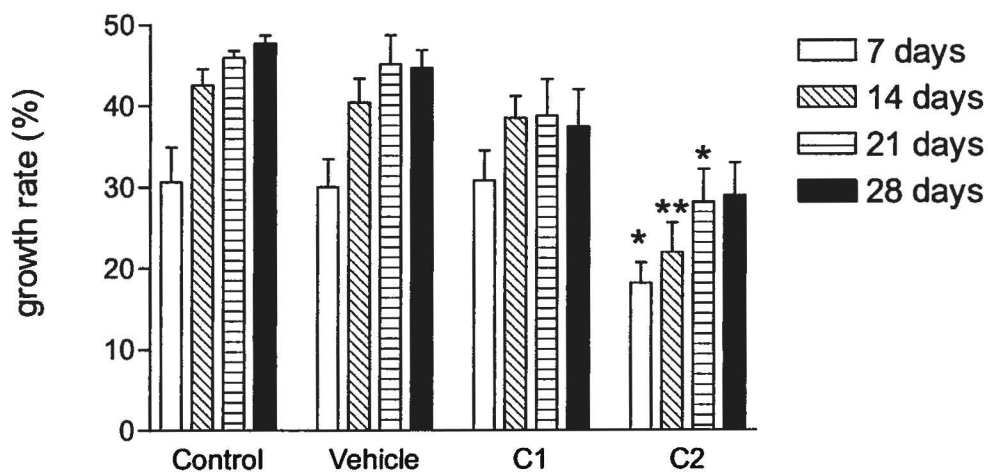


Figure 2: Effects of various concentrations of PCDD/Fs mixture on the relative growth rate of *Eisenia andrei* earthworms exposed 28 days in spiked soils (n=3). Asterisk represents a statistically significant difference compared with vehicle controls (* p<0.05; ** p<0.01).

3.2. Cell yield and viability

Extruded coelomocyte yield is illustrated on Fig. 3. No significant effects were observed in controls and soil contaminated with C1 (100 pg TCDD/ g soil). The cell yield of worms exposed to C2 (1000 pg TCDD/ g soil) was significantly ($p < 0.05$) lower from the controls. Cell viability was unaffected by PCDD/Fs concentrations used in this experiment (Fig. 4).

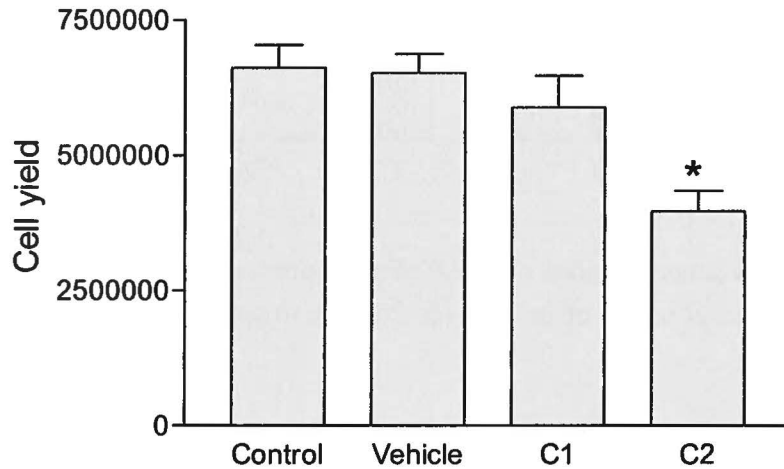


Figure 3 : Effects of various concentrations of PCDD/Fs mixture on the cell yield of *Eisenia andrei* earthworms exposed 28 days in spiked soils (n=3). Asterisk represents a statistically significant difference compared with vehicle (* $p < 0.05$).

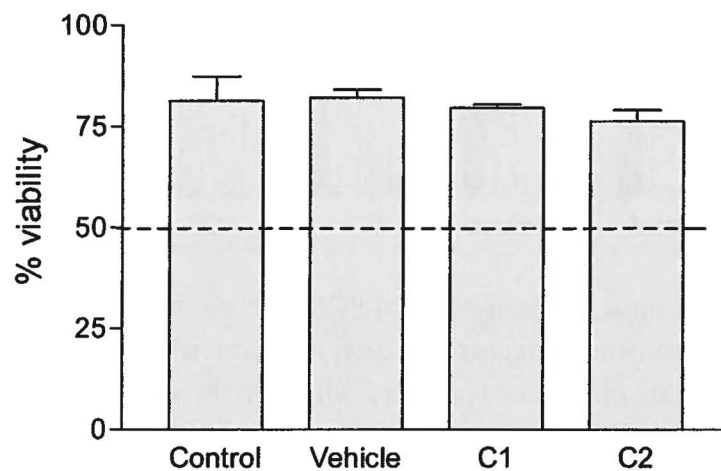


Figure 4: Effects of various concentrations of PCDD/Fs mixture on the viability of coelomocytes of *Eisenia andrei* earthworms exposed 28 days in spiked soils (n=3).

3.3. Effects on phagocytic activity

Exposure to the highest PCDD/Fs concentrations C2 (1000 pg TCDD/ g soil) significantly reduced phagocytic activity and cell efficiency compared to unexposed cells (Fig. 5). While, the exposure to C1 (100 pg TCDD/ g soil) had no significant effect on phagocytosis.

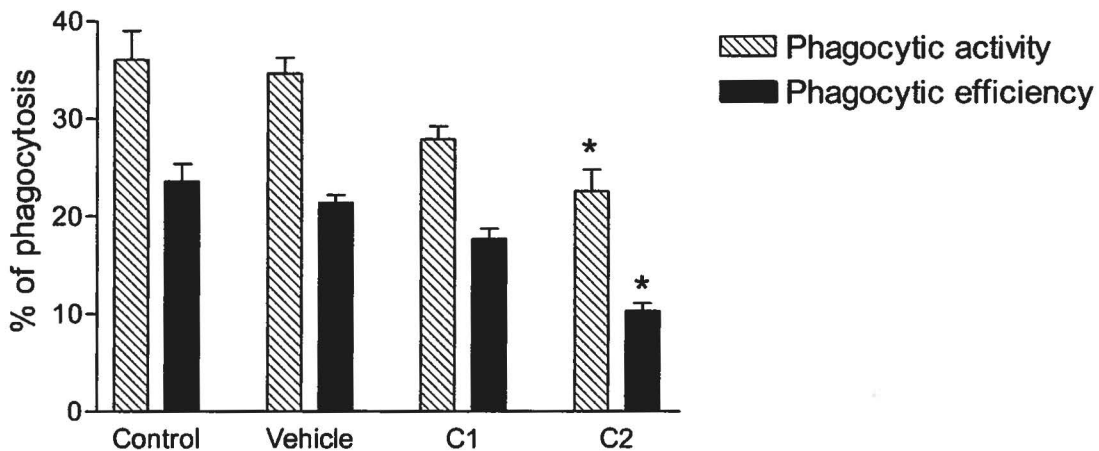


Figure 5: Effects of various concentrations of PCDD/Fs mixture on the phagocytic capacity of cœlomocytes in *Eisenia andrei* earthworms exposed 28 days in spiked soils (n=3). Asterisks represent statistically significant differences compared with vehicle (* p<0.05).

3.4. Cytotoxic function of NK-like cells

Effects of PCDD/Fs exposure on the ability of NK-like cells to lyse human tumor cells K562 are presented in Fig. 6. The profiles of inhibition on NK-like function were similar between the 40:1 and 20:1 ratios. The results showed a significant increase of the percentage of K562 lysis in earthworms exposed to the lower PCDD/Fs concentrations C1 (100 pg TCDD/ g soil).

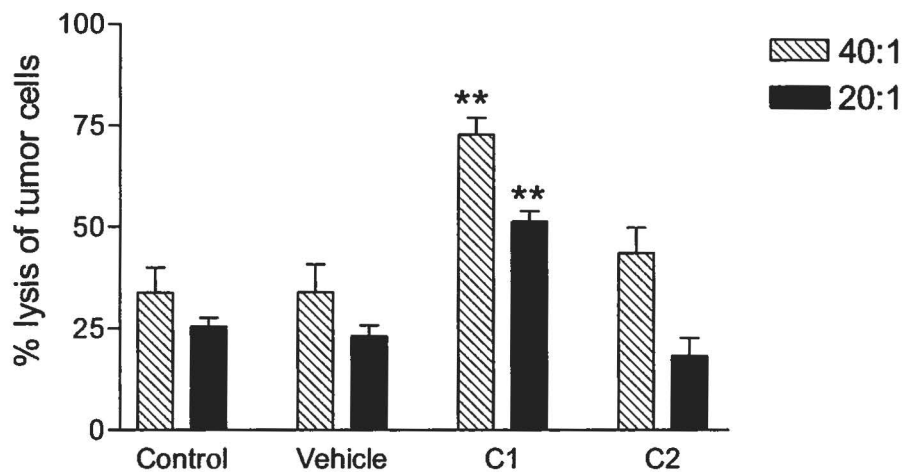


Figure 6: Effects of various concentrations of PCDD/Fs mixture on the *Eisenia andrei* NK-like cell activity to lyse the human tumor cells (K562) after 28 days of exposure in spiked soils (n=3). Asterisks represent statistically significant differences compared with vehicle (** p<0.01).

3. 5. Residues of PCDD/Fs in soils

The residues of PCDD/Fs were detected in soils after 28 days of exposure (Fig.7). The concentration of PCDD/Fs was not stable (Fig. 7) and decreased throughout the experiment. For example, the dioxin 2378-TCDD concentration decreased from 100 to 23 pg/g soil for the lowest mixture concentration and from 1500 to 780 pg/g soil for the highest mixture concentration tested after 28 days. It was also shown that PCDD/Fs residues were lowest in soils contaminated with low PCDD/Fs concentrations than those contaminated with high concentrations.

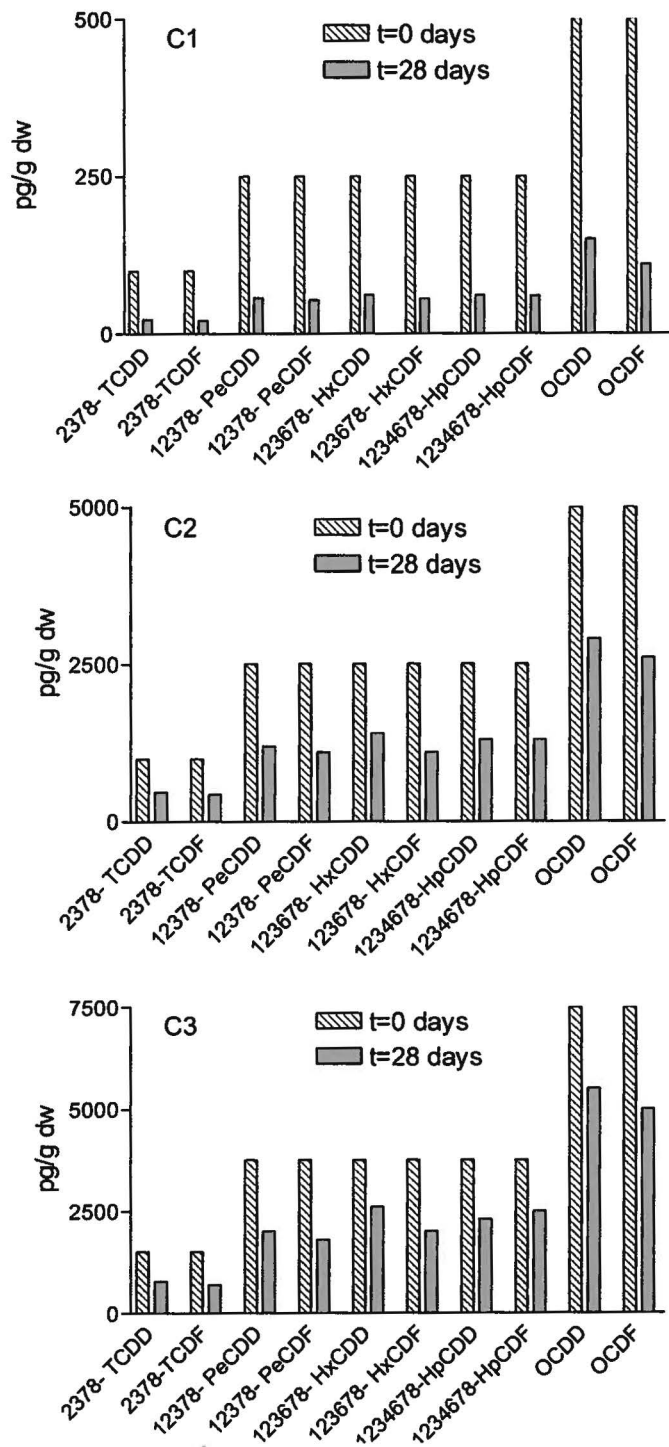


Figure 7: Changes over time in mean residue concentrations of PCDD/Fs in soils. Soils were initially spiked with three mixture concentrations; C1, C2 and C3 (C1<C2<C3).

4. DISCUSSION

In this study, we focused on toxicological effects of a PCDD/Fs mixture on earthworms using a spiked soil approach in the laboratory where the endpoints; growth and survival were measured. Immunotoxicological effects were also investigated using the phagocytosis and NK-like activity assays as biomarkers.

After 28 days of incubation, *Eisenia andrei* earthworms exposed to C1 were not killed nor did they show any other observable toxicological effects while those exposed to C2 and C3, presented mortality of 10 and 100%, respectively (Fig. 1). No previous studies have tested the lethal effects of PCDD/Fs mixture on *E. andrei* earthworms, except Reinecke and Nash (1984) whom studied the toxicity of 2, 3, 7, 8-TCDD on *Allolobophora catiginosa* and *Lumbricus rubellus* exposed to soil containing concentrations ranging from 0.05 to 5.0 µg/g soil. No mortality was observed after 85 days. However, in our spiked soils experiments, mortality was observed at lower concentrations of 2, 3, 7, 8-TCDD and exposure time (28 days). It is important to note here that in our test substance, 2, 3, 7, 8-TCDD was found with nine other congeners (2378-TCDF, 12378-PeCDD, 12378-PeCDF, 123678-HxCDD, 123678-HxCDF, 1234678-HpCDD, 1234678-HpCDF, OCDD and OCDF), so the toxic effect observed at C2 (1×10^{-3} µg TCDD/g soil) and C3 (1.5×10^{-3} µg TCDD/g soil) was the summation of the individual toxic effects of each congener. The results of the present study suggest that the differences in lethal response to dioxins in *E. andrei* compared to those obtained by Reinecke and Nash (1984) in *Allolobophora catiginosa* and *Lumbricus rubella* may be related to a number of factors, such as the form (e.g., TCDD used alone or in mixture), the interanimal variability (sensitivity), the differences in rates of diffusion of the toxicant and the physico-chemical interactions (e.g., solubility, chemical adsorption) between the toxicant and the soil matrix and also the potential synergistic effects of the congener combination.

The second endpoint measured in our study was the earthworm's growth rate (Fig. 2). PCDD/Fs caused a significant reduction of growth rate at the highest concentration C2, but this growth rate remained positive. This explained that worms did not lose weight but their growth was slowed compared to those in controls or in C1-spiked soils. Decrease in growth

rate was correlated with reduced feeding activity and it was suggested that reduced feeding may have been a strategy for the worms to avoid the exposure to the xenobiotics (Mosleh *et al.*, 2003; Ribeiro *et al.*, 2001).

Cœlomocyte cell yield, quantified using a light microscope, showed significant low levels at C2 compared to controls (Fig. 3). Numerous studies have demonstrated the relationship between cell yield and worm weight and proved that cell yield is a linear function of body weight (Sauvé and Fournier, 2005). Effectively, Earthworms exposed to C2 have the lower biomass after 28 days-exposure and the lower cell yield, too. The viability of extruded cœlomocytes does not seem to be affected by the PCDD/Fs concentrations (Fig. 4). This indicated that the adverse effects noted were not the result of decreased cell viability.

The measurement of the phagocytic response (Fig. 5) of earthworm's cœlomocytes indicated that PCDD/Fs inhibited the phagocytic activity and efficiency at C2 (1000 pg TCDD/g soil). To the best of our knowledge, no other studies examined the effects of PCDD/Fs on phagocytic activity using an invertebrate model, most other such studies use a mammalian model. Also, few data of the PCDDs/Fs effects on the phagocytosis are available. Omara *et al.* (1998) have exposed leucocytes from male Fischer rats to PCDDs/Fs mixtures (1-15 pg/ml) to study the effects on phagocytosis. Their results indicate that in vitro exposure to this range of concentrations had no suppressive effects on the immune functions assayed, and thus produced no additive immunotoxicity. Other studies have demonstrated that TCDD alone and in mixtures, modulate phagocytosis for marine mammals but does not seem to have the same effect in mouse (Levin *et al.*, 2005, 2007). Since PCDDs/Fs and PCBs belong to persistent organic pollutants (POPs) class, our results may be consistent with two published reports on the toxicity of PCBs (Goven *et al.*, 1994; Ville *et al.*, 1995) which showed that phagocytic competence was inhibited by polychlorinated biphenyls (PCBs). A decrease in immune function may have adverse effects on the survival of organisms. Furthermore, chemically-induced immune suppression may increase susceptibility, incidence and severity of infectious diseases (Descotes *et al.*, 2000; Fournier *et al.*, 2000; Frouin *et al.*, 2008).

PCDD/Fs exposure stimulated significantly NK-like cell activity at low dose C1 (100 pg TCDD/g soil) compared to controls, while no effect was showed at C2. However,

significant effects were observed between groups; C1 and C2. Comparable results have been reported with a mammalian laboratory models exposed to an endocrine disruptor and persistent contaminant; tributyltin chloride (TBTCI). This *in vivo* study observed enhancing effects of TBTCI on NK cell activity only in the low dose group (0.025 mg/kg/day) in old female rats (Tryphonas *et al.*, 2004). Thus, the results concluded that the increase in NK cell activity was a non-linear dose-response. The PCDD/Fs-associated immunostimulation observed in our study at low concentrations was considered as an immunotoxicological effect, since it may result in the loss of regulation within the immune system and can lead to adverse outcomes including autoimmune disease, anergy, and cancer (Descotes *et al.*, 2000, Frouin *et al.*, 2008).

The determination of PCDD/Fs residues in soils revealed a decrease over time (Fig. 7). The amounts found in soils indicated low levels for low initial concentrations while high levels were found for high concentrations, suggesting that the rate of PCDD/Fs disappearance was faster with low concentrations than with higher concentrations. These results were in agreement with the works of Helweg *et al.* (1998) and Mosleh *et al.* (2003) in which the disappearance of the herbicide isoproturon was slowest for highest initial concentrations in soil while it was rapid at lower concentrations.

5. CONCLUSION

We have demonstrated in the present study that PCDD/Fs concentrations of C1 (0,1 ng TCDD/g soil) were non-toxic to earthworms, but enhanced the NK-like cell activity. In contrast, concentrations higher or equal to C2 (1 ng TCDD/g soil) induced harmful effects to the earthworms as reduction of the survival (to 0% for C3), the growth rate and the inhibition of phagocytic activity. Our results have implications for the health of earthworms in response not only to PCDD/Fs but to other persistent organic pollutants (POPs) which still accumulate in the soils and that cause significant effects on the immune system of all terrestrial biota.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was conducted in the environmental immunotoxicology laboratory at Institut Armand Frappier (IAF-INRS). The financial support has been provided by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. Michel Fournier). The authors are thankful to Marlene Fortier and also appreciate her excellent technical assistance. We wish to thank Dr Pierre Yves Robidoux (CNRC-IRB), Louis Martel and Elloise Veilleux (CEAEQ, Quebec) for earthworm's donations.

REFERENCES

- Alaluu, S., P. Calderara, et al. (2004). "Developmental dental aberrations after the dioxin accident in Seveso." *Environ Health Perspect* **112** (13): 1313.
- Asensio, V., P. Kille, et al. (2007). "Metallothionein expression and Neutral Red uptake as biomarkers of metal exposure and effect in *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris* exposed to Cd." *Eur J Soil Biol* **43** (Supplement 1): S233-S238.
- ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry), Toxicological profile for chlorinated dibenzo-p-dioxins, US department of health and human services, public health service, December 1998.
- ATSDR (Agency for Toxic substances and disease registry). Dioxins, march 2006. Division of toxicology and environmental medicine (DTEM). <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts104.html>.
- Baccarelli, A., R. Pfeiffer, et al. (2005). "Handling of dioxin measurement data in the presence of non-detectable values: Overview of available methods and their application in the Seveso chloracne study." *Chemosphere* **60** (7): 898-906.
- Brousseau, P., N. Fugère, et al. (1997). "Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (*Oligochaeta*)." *Soil Biol Biochem* **29** (3-4): 681-684.
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boernaus, H., Flipo, D., Fournier, M., 1999. *Manual of Immunological Methods*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Bu, Y. Q., Y. M. Luo, et al. (2010) "Effect of dioxin-like PCBs on physiological activities of earthworms (*Eisenia fetida*)." *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environ Sci* **30** (5): 699-704.

- Chakra Reddy, N. and J. Venkateswara Rao (2008). "Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos." *Ecotox Environ Saf* **71** (2): 574-582.
- Cooper, E. L. and P. Roch (2003). "Earthworm immunity: a model of immune competence: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002." *Pedobiologia* **47** (5-6): 676-688.
- Descotes, J., Choquet-Kastylevsky, G., Van Ganse, E., Vial, T. (2000). Responses of the immune system to injury. *Toxicol Pathol* **28**, 479-481.
- Eskenazi, B., M. Warner, et al. (2005). "Serum dioxin concentrations and age at menopause." *Environ Health Perspect* **113** (7): 858.
- Fournier, M., Cyr, D., Blakley, B., Boermans, H., and Brousseau, P. (2000). Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xénobiotics. *Amer Zool* **40**:412-420.
- Frouin, H., M. Lebeuf, et al. (2008). "Toxic effects of tributyltin and its metabolites on harbour seal (*Phoca vitulina*) immune cells in vitro." *Aquat Toxicol* **90** (3): 243-251.
- Furst, A. and Q. Nguyen (1989). "Cadmium-induced metallothionein in earthworms (*Lumbricus terrestris*)." *Biol Trace Elem Res* **21**: 81-85.
- Goven, A. J., L. C. Fitzpatrick, et al. (1994). "Chemical toxicity and host defense in earthworms." *Ann NY Acad Sci* **712** (Primordial Immunity: Foundations for the Vertebrate Immune System): 280-300.
- Hankard, P. K., C. Svendsen, et al. (2004). "Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis." *Sci Tot Environ* **330** (1-3): 9-20.
- Helweg, A., Formsgaard, I.S., Reffstrup, T.K., Sorensen, H. (1998). Degradation of mecoprop and isoproturon in soil, influence of initial concentration. *Int J Environ Anal Chem* **70**, 133-148.
- Homa, J., E. Olchawa, et al. (2005). "Early-phase immunodetection of metallothionein and heat shock proteins in extruded earthworm coelomocytes after dermal exposure to metal ions." *Environ Pollut* **135** (2): 275-280.
- IARC (international agency for research on Cancer), polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans, vol.69, monograph 1997.
- ISO (1993) Soil quality-effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1: Determination of acute toxicity using artificial soil substrate. N°. 11268-1. ISO, Geneva, Switzerland.

- ISO (1998) Soil quality-effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: Determination of effects on reproduction. N°11268-2. ISO, Geneva, Switzerland.
- ISO (2004) Draft: Soil quality-avoidance test for evaluating the quality of soils and the toxicity of chemicals. Test with earthworms (*Eisenia fetida/ andrei*). ISO, Geneva, Switzerland.
- Komiyama, K., M. Okaue, et al. (2003). "Non-specific cellular function of *Eisenia fetida* regulated by polycyclic aromatic hydrocarbons: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002." *Pedobiologia* **47** (5-6): 717-723.
- Lee, B. T. and K. W. Kim (2008). "Arsenic accumulation and toxicity in the earthworm *Eisenia fetida* affected by chloride and phosphate." *Environ Toxicol Chem* **27** (12): 2488-2495.
- Levin, M., B. Morsey, et al. (2005). "PCBs and TCDD, alone and in mixtures, modulate marine mammal but not B6C3F1 mouse leukocyte phagocytosis." *J Toxicol Environ Health - Part A* **68**(8): 635-656.
- Levin, M., H. Leibrecht, et al. (2007). "Immunomodulatory effects of organochlorine mixtures upon in vitro exposure of peripheral blood leukocytes differ between free-ranging and captive southern sea otters (*Enhydra lutris*)." *Vet Immunol Immunopathol* **119** (3-4): 269-277.
- Lin, P. H., C. H. Lin, et al. (2007). "2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress, DNA strand breaks, and poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation in human breast carcinoma cell lines." *Toxicol Lett* **172** (3): 146-158.
- Martin, N.A. (1986). Toxicity of pesticides to *Allobophora caliginosa* (*Oligochaeta: Lumbricidae*). *N Z J Agric Res* **29**, 699-706.
- Massicotte, R., P. Y. Robidoux, et al. (2003). "Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory." *J Environ Monit* **5**(5): 774-779.
- Mosleh, Y. Y., S. Paris-Palacios, et al. (2003). "Effects of the herbicide isoproturon on survival, growth rate, and protein content of mature earthworms (*Lumbricus terrestris* L.) and its fate in the soil." *Appl Soil Ecol* **23**(1): 69-77.
- OECD (2004). Earthworm reproduction test. Guideline for testing chemicals. N°222. OECD, Paris, France.
- OECD, Guidelines for testing of chemicals, No. 207 earthworm acute toxicity tests, OECD, Paris, 1984.

- Omara, F. O., D. Flipo, et al. (1998). "Lack of suppressive effects of mixtures containing low levels of methylmercury (MeHg), polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), and Aroclor biphenyls (PCBs) on mixed lymphocyte reaction, phagocytic, and natural killer cell activities of rat leukocytes in vitro." *J Toxicol Environ Health - Part A* **54**(7): 561-577.
- Organization for Economic Cooperation and development (OECD) (1993). *Earthworms, acute toxicity tests. Guideline of the OECD for testing Chemical Products*. Paris, France.
- Patel, M., J. Francis, et al. (2007). "Development of a flow cytometric, non-radioactive cytotoxicity assay in *Eisenia fetida*: An in vitro system designed to analyze immunosuppression of natural killer-like coelomocytes in response to 7, 12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)." *Eur J Soil Biol* **43**(SUPPL. 1).
- Pohl, H., C. DeRosa, et al. (1995). "Public health assessment for dioxins exposure from soil." *Chemosphere* **31**(1): 2437-2454.
- Ramade F., 2007. *Introduction à l'écotoxicologie; fondements et applications*. Ed. Lavoisier, pp 618
- Reinecke, A. J. and R. G. Nash (1984). "Toxicity of 2,3,7,8-TCDD and short-term bioaccumulation by earthworms (oligochaeta)." *Soil Biol Biochem* **16**(1): 45-49.
- Ribeiro, S., Souza, J.P., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M. (2001). Effect of endosulfan and parathion on energy reserves and physiological parameters of the terrestrial isopod *Porcellio dilatatus*. *Ecotoxicol Environ Saf* **49**, 131-138.
- Robidoux P.Y, Hawari J, Thiboutot S, Ampleman G and Sunahara G.I, 1999, Acute toxicity of 2, 4, 6- trinitrotoluene in earthworm (*Eisenia Andrei*), *Ecotoxicol Environ Saf*, **44**, 311-321.
- Sanchez-Hernandez, J. (2006). *Earthworm Biomarkers in Ecological Risk Assessment*. *Rev Environ Contamin Toxicol* 85-126.
- Sauvé S., M. Hendawi, et al. (2002). "Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in vitro exposure to trace elements." *Ecotoxicol Environ Saf* **52**(1): 21-29.
- Sauvé, S and Fournier, M (2005). Age-specific immunocompétence of the earthworm *Eisenia Andrei* exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol Environ Saf*, **60**:67-72.
- Scott-Fordsmand, J.J., Weeks, J.M. (2000). *Biomarkers in earthworms*. *Rev Environ Contamin Toxicol* **165**, 117-159.
- Streit, B. (1998). Bioaccumulation of contaminant in fish. In: Braunbeck, T., Hinton, D.E, Streit, B. (Eds), *Fish Ecotoxicology*. Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 353-387.

- Suzuki, M., Cooper, E.L., Eyambe, G.S., Goven, A.G., Fitzpatrick, L.C., and Venables, B.J. (1995). Polychlorinated biphenyls (PCBs) depress allogeneic natural cytotoxicity by earthworm cœlomocytes. *Environ Toxicol Chem* 14: 1697-1700.
- Tryphonas, H., G. Cooke, et al. (2004). "Oral (gavage), in utero and post-natal exposure of Sprague-Dawley rats to low doses of tributyltin chloride. Part II: effects on the immune system." *Food Chem Toxicol : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 42(2): 221-235.
- U.S. Environmental Protection Agency (US EPA) (1989a). Protocols for Short Term Toxicity Screening for hazardous Waste Sites. Environmental Research Laboratory, US EPA, Corvallis, OR.
- Vermeulen, F., A. Covaci, et al. (2010) "Accumulation of background levels of persistent organochlorine and organobromine pollutants through the soil-earthworm-hedgehog food chain." *Environ Internat* 36(7): 721-727.
- Ville, P., P. Roch, et al. (1995). "PCBs Increase Molecular-Related Activities (Lysozyme, Antibacterial, Hemolysis, Proteases) but Inhibit Macrophage-Related Functions (Phagocytosis, Wound Healing) in Earthworms." *J Invertebr Pathol* 65(3): 217-224.
- Wyde, M. E., T. Cambre, et al. (2002). "Promotion of altered hepatic foci by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 17 β -estradiol in male Sprague-Dawley rats." *Toxicol Sci* 68(2): 295-303.

3. 2. 4. SYNTHÈSE

Les résultats de l'étude *in vivo* du potentiel immunotoxique des PCDD/F viennent confirmer ceux obtenus dans l'étude *in vitro* démontrant le potentiel des PCDD/F à moduler le système immunitaire des *E. andrei*. En effet, le contact des vers avec le papier filtre contaminé par des mélanges de PCDD/F à des concentrations contenant 0,3, 0,5, et 0,83 ng 2378-TCDD/cm², a révélé une inhibition de la phagocytose. De plus, dans l'exposition des vers aux sols contaminés avec les PCDD/F, une concentration du mélange supérieure ou égale à C2 (contenant 1 ng 2378-TCDD/g sol, 1 ng 2378-TCDF/g sol, 2,5 ng 12378-PeCDD/g sol, 2,5 ng 12378-PeCDF/g sol, 2,5 ng 123678-HxCDD/g sol, 2,5 ng 123678-HxCDF/g sol, 2,5 ng 1234678-HpCDD/g sol, 2,5 ng 1234678-HpCDF/g sol, 5 ng OCDD/g sol et 5 ng OCDF/ g sol) inhibe la phagocytose mais n'a aucun effet sur l'activité des cellules NK-like. Cependant un mélange contenant 0,1 ng 2378-TCDD/g sol, 0,1 ng 2378-TCDF/g sol, 0,25 ng 12378-PeCDD/g sol, 0,25 ng 12378-PeCDF/g sol, 0,25 ng 123678-HxCDD/g sol, 0,25 ng 123678-

HxCDF/g sol, 0,25 ng 1234678-HpCDD/g sol, 0,25 ng 1234678-HpCDF/g sol, 0,5 ng OCDD/g sol et 0,5 ng OCDF/ g sol) stimule l'activité des cellules NK-like sans avoir un effet sur la phagocytose.

CHAPITRE 4: ÉCOTOXICOLOGIE DES SOLS DE MERCIER

4.1. INTRODUCTION

Ce chapitre concerne l'étude du potentiel toxique des sols situés aux alentours de l'incinérateur de déchets dangereux de Mercier sur des vers de terre *E. andrei*. Cette étude a été réalisée en deux étapes; la première consiste en un suivi écotoxicologique sous des conditions contrôlées de laboratoire, et la deuxième concerne l'étude *in situ* qui consiste à installer des mésocosmes dans des sites préselectionnés lors de l'étude de laboratoire. Ainsi, via l'étude de laboratoire, notre objectif était d'identifier et d'analyser les effets des sols de Mercier sur la survie, la croissance et la reproduction des vers de terre, sous des conditions (température, pH, humidité, luminosité, etc) contrôlées. De plus, une batterie de biomarqueurs a été mesurée; le TRRN, les MTLPs, la phagocytose, les SOD, GST et CAT. Cependant, seuls les résultats les plus pertinents obtenus entre 2008 et 2009 sont regroupés dans le manuscrit 4. Les résultats sur les MTLPs, SOD, GST et CAT ainsi qu'un bref aperçu sur les méthodes d'analyse de métaux sont présentés en annexe C. Par ailleurs, dans l'étude *in situ*, notre objectif était d'étudier les effets des sols de Mercier sur les vers de terre sous des conditions naturelles. Afin d'atteindre cet objectif, des cages (mésocosmes) contenant des vers « propres » cultivés au laboratoire ont été installées aux alentours de l'incinérateur pour une durée de 28 jours. Les effets sur la survie, la croissance, la cellularité, la viabilité cellulaire, la phagocytose et le cycle cellulaire des cœlomocytes, ont été étudiés. Les résultats correspondant font l'objet du manuscrit 5.

4.2. ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES SOLS DE MERCIER SOUS DES CONDITIONS CONTRÔLÉES DE LABORATOIRE

Manuscrit 4

Titre

Ecotoxicological study of field soils from the vicinity of Mercier incinerator in Quebec

Auteurs

Hayet Belmeskine, Virginie Berubé, Pierre Yves Robidoux, Maude Laberge, Marlène Fortier, Sami Haddad, Louise Vandelac et Michel Fournier

Soumis dans le journal

Soil Biology & Biochemistry

Contribution personnelle

J'ai rédigé ce manuscrit à titre d'auteur principal. De plus, j'ai participé à l'échantillonnage, à la planification des expériences, j'ai réalisé toutes les expériences (sauf celles sur le rouge neutre (RN)), analysé et interprété les résultats.

Contribution des coauteurs

Virginie Bérubé a réalisé les expériences sur le RN et contribué dans les expériences réalisées à l'IRB, dans l'analyse des résultats et la correction du manuscrit. Pierre Yves Robidoux a participé à la planification des expériences et à l'échantillonnage. Maude Laberge a participé à l'obtention de tous les permis pour accéder au terrain et à l'échantillonnage. Marlène Fortier a participé aux expériences de phagocytose. Sami Haddad, Louise Vandelac et Michel Fournier ont participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats et à la correction du manuscrit.

RÉSUMÉ

L'investigation écotoxicologique du statut des sols aux alentours de l'incinérateur de déchets dangereux de Mercier, au Québec, n'a jamais été réalisée. Dans ce présent travail, nous avons évalué, en laboratoire, l'impact potentiel de ces sols sur des vers de terre *Eisenia andrei*. Les tests étaient basés sur la mesure des paramètres toxicologiques : la croissance, la survie et la reproduction en plus de deux paramètres soient; la mesure de la stabilité de la membrane lysosomale en utilisant le test du temps de rétention de rouge neutre (TRRN), et la phagocytose. Des effets significatifs (négatifs) ont été observés sur la survie, la croissance et les paramètres de reproduction chez les vers exposés aux sols prélevés sous le panache de l'incinérateur. La mesure des biomarqueurs a montré que la phagocytose était moins sensible au potentiel toxique des sols de Mercier que la stabilité de la membrane lysosomale. L'analyse chimique a révélé que les sites situés sous le panache étaient contaminés par une gamme de métaux (Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, and Zn) et de PCDD/Fs mais qui n'excèdent pas les recommandations canadiennes pour la qualité des sols. Les vers exposés à ces sols accumulaient des niveaux élevés de métaux en particulier le Zn et le Cd. Le facteur de bioconcentration (FBC) de Cd était le plus élevé dans tous les sols par rapport aux autres métaux, et était supérieur à 6 pour les sols situés sous le panache, ce qui indique une exposition importante des vers au Cd.

ABSTRACT

Ecotoxicological investigation of soil status close to the dangerous waste incinerator of Mercier, in Quebec, has never been realized. In the present study we evaluated, in laboratory, the potential impact of these soils on *Eisenia andrei* earthworms. The tests were based on the measurement of toxicological endpoints; growth, survival and reproduction in combination with two earthworm biomarkers; lysosomal membrane stability measured using the neutral red retention time assay (NRRT) and the phagocytosis assay. Significant negative effects on earthworm survival, growth and reproductive parameters were found at sites located under the panache dispersion. Biomarker measurements showed that phagocytosis assay was less sensitive to the toxic potential of Mercier soils than NRRT assay. The chemical analysis of soils revealed that the sites situated under the panache dispersion were contaminated with a range of metal (Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, and Zn) and PCDD/Fs contaminants, but at concentrations below than the Canadian recommendation of soil quality. Exposed earthworms accumulated high levels of metals especially Zn and Cd. The Cd bioconcentration factor (BCF) was higher in all soils compared to other metals, and up to 6 in soils found under the panache dispersion, indicating that there was significant exposure.

Keywords: Dangerous waste incinerator; Risk assessment; Bioindication; Neutral red retention; Phagocytosis; Earthworms; *Eisenia andrei*.

1. INTRODUCTION

Mercier is an agricultural area located at 25 km SO of Montreal (Quebec, Canada). This region undergoes since 1968 effects of lagoons and underground water contamination by the deflections of oils and toxic wastes. In addition, since 1972 the Mercier area has been subjected to cumulative impacts of the emissions of the dangerous waste incinerator built on the same site (BAPE 1994, Gareau *et al.*, 2005; Vandelac, 2006; Laberge 2007). The incinerator emissions have stirred local public concerns for their potential adverse effects on health and surrounding environment. Until now, few data are available on this site, but it is well recognized that a complex mixture of contaminants is associated to this kind of pollution source as heavy metals and persistent organic pollutants (POPs) which pose serious environmental and human health problems (Colborn *et al.*, 1996; Vandelac and Bacon 1999).

Recently, many studies focusing on incinerator atmospheric emissions and their depositions concluded that these emissions contribute to the contamination of terrestrial environment (Meneses et al., 1999; Radetski *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008). Usually, in order to study the ecotoxicological impact and evaluate soil quality, toxicity tests were conducted on earthworms to investigate the lethal and sub-lethal effects (Robidoux et al., 1999, 2000, 2001; Robidoux 2004a, b; Lukkari et al., 2005). The choice of the earthworm is justified by the fact that this invertebrate animal is representative of soil fauna and has shown in many sensitivity tests as bioindicator (Fugère *et al.*, 1996; Lowe 2007). According to the literature, *Eisenia fetida* and *Eisenia andrei* are the most recommended species in standard tests of acute (OECD 1984, ISO 1993) or chronic toxicity (Fischer *et al.*, 1997; Norgrove, 2007). Elvira *et al.*, (1996) and Dominguez et al., (2003, 2005) have showed that *E. andrei* presents a greater growth speed and fecundity than *E. fetida*. For these reasons, *E. andrei* is more recently used in reproduction tests for permitting to have organisms, rapidly used in experiments. Also, inhabiting at the soil surface, this specie was found exposed to all environmental pollutants and defavorable climatic conditions. Thus, the contamination of these animals can be cutaneous or by the ingestion of contaminated soil. These properties give to *E. andrei* earthworms an important potential as bioindicator. In addition to reproductive parameters, earthworm performance may be evaluated with a biomarker approach (Scott-Fordsmand and Weeks, 2000) studied at cellular and tissue levels. Many biomarkers may be employed but in this study, the focus was made on the phagocytosis and the cœlomocyte lysosomal membrane integrity evaluated with neutral red retention time (NRRT).

Previously, immune system parameters such as phagocytosis have been used as a sensitive sub-lethal endpoint to assess toxicity of various chemicals on earthworms (Fournier *et al.*, 2000; Sauvé *et al.*, 2002; Massicotte *et al.*, 2003; Sauvé and Fournier, 2005). The suppression of the phagocytic activity or reduction of cœlomocytes (earthworm immune cells) viability decreases animal resistance to infection (Fournier *et al.*, 2000). Thus, this immunodeficiency is considered as a sign of toxic effects of environmental pollutants (Fournier *et al.*, 2000).

At the subcellular level, neutral red retention time (NRRT) has been defined as a measure of the lysosomal membrane stability, and changes in this stability are thought to be a general measure of stress (Scott-Fordsmand and Weeks, 2000). Lysosomal membrane integrity was studied in earthworms exposed to contaminated soils, by measuring NRRT, under laboratory and field conditions (Weeks and Svendsen, 1996; Svendsen and Weeks, 1997a; Scott-Fordsmand *et al.*, 1998; Robidoux *et al.*, 2002b, 2004). In many cases, the results showed a decrease of NRRT associated to an increase of soil contamination.

The main aim of this study was to evaluate, under laboratory conditions, the ecotoxicological effects of field soils, collected near Mercier incinerator, on *E. andrei* earthworms after 28 days of exposure. Reproductive parameters and biomarkers previously cited were measured. Also, chemical investigation on PCDD/Fs concentrations in soils and on metals in both soils and earthworms was carried out.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Soil sampling and preparation

Samples of soils (20L) were collected in October 2007 and October 2009 in the vicinity of Mercier incinerator from surface layer (0-20 cm) and preserved at 4°C (Fig. 1). The 2007 samples included three soils; one purchased from a pinewood (M071010P) located in approximately 4.5 km SO of the incinerator (45°15'06.55"N73°46'07.52"W), the second (M071010L) close to the incinerator and the ex- lagoons (45°17'01.21"N73°44'00.09"W), and the third one, in the panache dispersion of the incinerator in a wooded ground (M071010W) at about 2.9 km SE (45°16'07.61"N73°42'07.25"W). A sandy-type soil was used as reference (Ref07). It was sampled from a clean site and had the following pedological characteristics: 0.3% clay, 98% sand, 1.7% silt, pH 4.9; 23 and 1.2%, water holding capacity (WHC) and organic matter contents, respectively. In 2009, three soils were collected near the incinerator; under the panache dispersion. The first sample was obtained from corn-land (M091028C) located at about 2 km E (45°17'02.48"N73°42'09.95"W), the second was purchased from a wooded ground (M091028W) at approximately 3 km NE (45°17'05.70"N73°42'05.19"W) and the third one from Saint-Isidore land (M091028S) situated at 3.5 km N (45°18'05.35"N73°42'06.56"W). In addition, a fourth sample was collected in unpolluted

soil found outside the panache dispersion (Ref09) at about 5 km W (45°18'08.83''N73°46'0.14''W). This last soil was considered as reference for 2009 study.

The soils were mixed, air dried, and sieved through a 2-mm mesh. Also, physical and chemical analyses were done for each soil. The chemical analysis included the heavy metals and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans (PCDD/Fs). These chemical analyses were performed in the laboratory of industrial pollutions in Centre d'Expertise en Analyse Environnementale of Quebec (CEAEQ). The residues of PCDD/Fs in soils were measured by gas chromatography coupled to mass spectroscopy at high resolution (HRGC/HRMS). The details on materials, extraction and analytical determinations of PCDD/Fs were available on the website of the laboratory (<http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/pdf/MA400DF10>). The metals were measured by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) and all the details on methods were available on the website of the laboratory (http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/method_numer.htm).

2.2. Earthworms

The earthworms, *Eisenia andrei* were initially purchased from the Carolina Biological Supply (Burlington, NC, USA) and were used to establish the laboratory culture. Prior to the experiment, the animals were maintained in earthworm bedding (Magic Products, Amherst, Jct, WI) at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 70-80% (w/w) moisture and 16:8 h light/dark cycle, and fed once a week with cereal (Magic Worm Food, Magic Products).

2.3. Toxicity tests

The earthworm exposures were performed in standard conditions following the ISO and Environnement Canada protocols (ISO, 1998; Environnement Canada, 2004) with minor modifications to permit some additional measurements. Briefly, the earthworms used in the toxicity tests were healthy adults, presenting clitellum and a body mass ranging from 300 to 600 mg fresh weight. They were acclimated for 24 h in OECD artificial soil (sphagnum peat, 10%; kaolinite clay, 20% and quartz sand, 70%, adjusted to pH 6.5 with CaCO_3) (ISO, 1998) before the start of the test. Twelve earthworms were then placed in each 1-L glass jars filled

with 600 g (dry weight) of test soil where the humidity was then adjusted to 75% of the total water-holding capacity of the soil. The jars were covered with a geotextile membrane and a perforated cap and were maintained at 20 °C with a 16:8 h light/dark cycle. The earthworms were fed weekly with 2 g of dry cereal. Four replicates of each soil were carried out.

The reproduction test with the *E. andrei* earthworms is 56 days long. During this period, 2 end-points time were fixed; $t = 28$ days and $t = 56$ days. So, after 28 days exposure, the earthworms were removed from the soil, counted, rinsed individually with deionised water, and weighted after the excess of water was removed. The survival and growth were determined. The animals were placed for 3 h on moistened Whatman filter paper in Petri dishes (Furst and Nguyen, 1989) prior to biomarkers study. The jars containing laid cocoons and juveniles were maintained in the same test conditions for another 28 days.

In the 2009 study, the percentages of survival and growth rate were determined every week. The growth rate was determined using Eq. (1) of Martin (1986), where W_0 is the weight at the beginning of exposure and W_t the weight after t days of exposure.

$$\text{Growth rate} = \ln(W_t / W_0) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

At the 56 day, the cocoons and juveniles were counted and then juveniles are weighted and stored at -80 °C for future analysis. The soil samples were collected from each container at 0, 28 and 56 days for the monitoring of the pH and humidity. After, they were kept at -20°C for further chemical analysis.

2.4. Biomarkers

2.4.1. Neutral Red Retention Time

Three earthworms from each jar were used to measure the neutral red retention time (NRRT) following the protocol described in Weeks and Svendsen (1996) and in Robidoux et al. (2002). Briefly, each earthworm was cleaned with distilled water to eliminate soil particles and then gently massaged in saline solution to extract intestinal contents. A small volume of coelomic fluid was taken by inserting a needle on a 1 ml tuberculin syringe containing about 50 μ l of Lumbricus Balanced Salt Solution (LBSS) composed of 1.5 mM NaCl, 4.8 mM

KCL, 1.1 mM MgSO₄.7H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.3 mM Na₂PO₄.7H₂O, 3.8 mM CaCl₂, and 4.3 mM NaHCO₃ (Brousseau *et al.*, 1997b, 1999; Sauvé *et al.*, 2002), directly into the coelomic cavity in the region posterior to the clitellum. A 25 µl of this mixture was deposit on a microscope slide, before the application of 25 µl neutral red (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) working solution (80 µg/ ml) and a coverslip. The slide was observed (400x) for 1 min with time interval of 5 min. Observation was stopped when the ratio of cells with fully stained cytosols reached >50% of the total number of cells counted for a maximum of observation time of 1 hour. This interval was recorded as the neutral red retention time (NRRT).

2.4.2. Immunocompetence of earthworms

2.4.2.1. Cell extrusion

Three other purged earthworms from each jar were also used for determination of the immunocompetence of the earthworms exposed to different soils. A single worm was inserted into a 15-ml tube containing 3 ml of Lumbricus balanced salt solution (LBSS) to extract coelomocytes using an electrical extrusion method which consists to submit the liquid medium to a 6 V current (lantern battery) for 20- 30 s using aluminium wires (Massicote *et al.*, 2003). A higher turbidity was observed in the solution. The worm was then removed from the tube and the solution was gently shaken.

Cell concentration and initial cell viability were determined by diluting 50 µl of cell suspension with 50 µl of 0.4% trypan blue (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). This mixture was placed into an improved Neubauer hemocytometer which was microscopically observed (Sauvé *et al.*, 2002, Massicote *et al.*, 2003).

2.4.2.2. Phagocytosis and cell viability

For each cell suspension, a volume of fluorescent latex beads (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) was added in a bead: cell ratio of 100:1. It is important to note that before adding the beads into the phagocyte suspension, they were sonicated for 5 min at room temperature in the ultrasonic bath to get rid of doublet and triplet beads. The cells (with beads) were then incubated for 18 h at room temperature. To remove the beads that were not phagocyted, the cell suspension was layered over a 3% bovine serum albumin (BSA) and

centrifuged at 150 g, 4°C and for 8 min. The cells collected in the pellet were then resuspended in 500 µl of hematal (Fisher Scientific, Ottawa, Ont, Canada) containing 0.185% formaldehyde and 0.2% sodium azide. Thus, the phagocytosis was measured by flow cytometry (Becton Dickinson, San José, USA) (Brousseau et al., 1999) and for each sample, the fluorescence of 5000 events was recorded. Results were analysed with the Cell Quest Pro software (Becton Dickinson) to determine the percentage of cells that engulfed one bead and more (phagocytic activity) or three beads and more (phagocytic efficiency). The results were expressed as the percentage of phagocytosis.

The cell viability is defined as cell membrane permeability to propidium iodide (PI) (Fugère *et al.*, 1996). It was determined by adding 5 µl of PI (1 mg/L) to the cell suspensions (PI final concentration 10 µg/L) and measuring fluorescence by flow cytometry in FL3 (Fugère *et al.*, 1996; Brousseau *et al.*, 1997, 1999). The results were expressed as percentage of viable cells.

2.5. Statistical analysis

All data presented are arithmetic means \pm standard deviations. Four independent replicates were carried out. For each replicate, the mean for the biomarkers was calculated from three individuals. Data represented on figures were the mean for the four replicates.

Statistical comparisons were made by ANOVA one-way followed by Tukey HSD post-hoc test for specific comparison of means ($p \leq 0.05$). The software Statistica, Version 6.0 (StatSoft, Tulsa, OK) was used.

3. RESULTS

3.1. Effects of soils collected in 2007 (Preliminary study)

Investigations carried out on Mercier soils on 2007 were considered as preliminary study because it was the first ecotoxicological work on the soils near the dangerous waste incinerator of Mercier in Quebec.

Under our experimental conditions, the preliminary results of survival percentage (fig.2) showed a mortality of earthworms (>20%), after an exposure duration of 28 days, in

the soil collected from wooded ground (M071010W) compared to the reference soil Ref07. As indicated in fig.3, the worms of M071010W lost weight (>50%) compared to control and reference. Also, M071010W presents a significant effect on earthworms' growth. Pronounced effects were observed on the reproduction-related parameters (Fig.4) in M071010W and M071010P soils which decreased significantly numbers of total juveniles (hatched individuals) compared to the reference Ref07.

To determine the sublethal effects, on earthworms, of Mercier soils collected on 2007, the biomarker studied in this part was the neutral red retention time (NRRT). Results showed in Fig. 5 revealed significant effects of M071010W soil on the decrease of NRRT.

3.2. Effects of Soils collected in 2009

In this study, *in vivo* toxicity test was also performed using various parameters, including survival, growth rate, reproductive parameters and immunological biomarker; the phagocytosis. Fig.6 represents the percentage of earthworm survival in soils following 28 days exposure duration. A significant mortality was observed in M091028W at 14, 21 and 28 days compared to the reference soil (Ref09). Less effect was noted in M091028S and an absence of mortality in M091028C, Ref09 and control. Although, in each group, there was no significant effect in time comparing with 7 days of exposure.

In parallel of survival evaluation, the growth rate of earthworms in every week was calculated based on Martin (1986) equation described above. Fig. 7 indicated a significant effect in M091028C, M091028W and M091028S which decreased the growth rate of earthworms after 21-days exposure, compared to reference soil Ref09. It was also observed, in fig. 7, significant effects in each soil during the exposure time. The soils concerned were; artificial soil (OECD), Ref09 and M091028C in which the growth was stimulated at 14, 21 and 28-days exposure compared to 7 days.

Evaluation of the reproduction-related parameters in *E. andrei* at the end-point of 56 days showed other interesting results (Fig. 8). Numbers of juveniles born were 194.00 ± 41.99 , 122.50 ± 47.31 , 152.25 ± 29.97 , 232.25 ± 31.61 and 346.75 ± 54.07 for M091028C, M091028W, M091028S, Ref09 and control, respectively. This revealed a significant effect of M091028W in which the number of juveniles was lowest. Fig. 8 showed also two other reproductive

parameters; the numbers of total, and hatched cocoons. Pronounced effects were observed in M091028W, M091028S which decreased significantly the number of total cocoons and hatched cocoons compared to reference soil Ref09.

Activity and efficiency of phagocytosis were assessed by the measure of cœlomocytes having engulfed one bead or more (M1) and three beads or more (M2), respectively. Results illustrated on Fig. 9 did not show significant phagocytic response of earthworm's cœlomocytes following 28-days exposure to Mercier soils. The cell viability was monitored at the same time of phagocytosis. There were no statistically significant exposure-related effects (data not shown). The percentage of viability in control samples were 85% and more.

3.3. Chemical analysis of soils and earthworms tissues

Besides *in vivo* experiments, chemical and physical analyses were carried out on Mercier soils to investigate relationships between the levels of chemical contaminants (heavy metals and PCDDs/Fs), soil's structure, and effects on earthworms. Concerning the inorganic chemicals, in preliminary study (2007) we have analysed Cd, Pb and Hg, but in 2009 study we added Zn, Cu, Cr and Ca to the list (Table 1).

PCDDs/Fs analyses were investigated on M091028W and M091028S which are situated under the incinerator panache dispersion, and on the reference Ref09. The mean total concentrations of the 17 toxic congeners and the homologue patterns were illustrated in Fig.10. It was showed on Fig.10-A that 2378-T4CDD, 12378-P5CDF, 123789-H6CDF and 1234789-H7CDF were not detected in all soils. For other congeners, the concentrations found were below 10 pg/g except for OCDD, they were 61, 53 and 16 pg/g in M091028W M091028S and Ref09, respectively. The total TEQs concentrations of PCDD/Fs detected in these soils, presented in Fig.10-A', were 1.72, 0.53 and 0.09 pg TEQ/g, respectively. In addition, Fig.10-B showed profiles of PCDD/Fs homologues found in these soils, where important levels of OCDD and P5CDF were determined in M091028W, compared to the reference soil. Also, high concentration of OCDD was detected in M091028S.

Following a 28 days-exposure, a measurement of metals in soils-exposed earthworm's tissues was carried out (fig. 11). The metals quantified were; As, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sr, V and Zn. The results revealed a variability of metal concentrations in

tissues. However, it was shown that in soils situated under the panache dispersion (M091028W, M091028S, M091028C, M071010W), earthworms presents high levels of most metals, except Cr and Sr, compared to the reference or control soils. Mean earthworm tissue metal concentrations (fig. 11) and corresponding total soil concentrations (table. 1) were used to calculate bioconcentration factors (BCFs) for five metals; Cd, Pb, Cr, Cu and Zn which were analysed in both soils and worms. BCFs were calculated as earthworm/soil concentrations (Hankard *et al.*, 2004; Ramade, 2007). It was noted (table. 2) that in all sites, earthworms accumulated Cd up to the original soil concentration. Thus, under the panache dispersion, at M091028W, M091028S, M091028C and M071010W, the cadmium BCFs were 12.22, 12.80, 10.80 and 6.55, respectively. Earthworm lead concentrations were below soil values (BCF<1) for all soils except M071010W (BCF=1.02). Both chrome and copper BCFs were less than 1 in all soils. In contrast, all zinc BCFs were above 1.

4. DISCUSSION

This study focused on an ecotoxicological investigation of the status of soils near the dangerous waste incinerator of Mercier, in Quebec. For monitoring the status of receiving soil ecosystems, earthworms are among the most relevant species (Hankard *et al.*, 2004). The approach performed in our study was to assess toxicity of soils in laboratory tests in which toxicological endpoints; growth, survival and reproduction were measured in combination with two biomarkers; NRRT and phagocytosis. Thus, field soils are sampled and tested under laboratory conditions (temperature, pH, humidity, organic matter content, photoperiod, etc), using earthworm *E. andrei* as bioindicator.

To our knowledge, this paper is the first report on the impact of soils situated close to the dangerous waste incinerator of Mercier on terrestrial biota as earthworms. In preliminary study (2007), results indicated mortality (Fig. 2) and growth decrease (Fig. 3) of earthworms in M071010W which was situated under the plume dispersion of the incinerator. It was also observed adverse effects on reproduction in M071010W and M071010P. In fact, a significant reduction of the juvenile's number was noted. The diminution of the biotic potential of earthworms was caused certainly by organic and inorganic chemicals present in these soils.

In addition, in soil M071010W, the NRRT decreased significantly which reflected changes/damages in lysosomal membrane stability caused by stress presence (Maboeta *et al.*, 2002; Fordsmand and Weeks, 2000). NRR assay has proved to be highly sensitive biomarker of metal exposure when earthworms are exposed to field-contaminated soils. Numerous studies have reported that NRRT linearly correlates with heavy metals (e.g. Cu, Pb) concentrations in soils, or their bioavailable fractions (Fordsmand and Weeks, 2000). NRR-assay was also sensitive to some organic contaminants such as PAH (Hankard *et al.*, 2004) and pesticides (Vernile *et al.*, 2007).

Similar observations were noted in 2009 study, for soils under the panache dispersion. Following 28 days-exposure, significant mortality of worms, up to 50%, was seen (Fig. 6) in M091028W. In addition, the significant decrease of worm growth rate (Fig. 7) in M091028W, M091028S, and M091028C and the negative effects of M091028W, M091028S on the reproductive parameters (cocoons, hatched cocoons and juveniles) (Fig. 8) reflected adverse effects on the biotic potential of earthworms. Comparing these observations to 2007 results which also demonstrated reduction of worm biotic potential, it may be hypothesized that the chemical composition of soils under the panache dispersion might contribute to the observed effects. The measurement of the phagocytic response (Fig. 9) of earthworm's cœlomocytes indicated the absence of significant effects which reflected less sensitivity of this immunological biomarker to toxic potential of Mercier soils. However, the ability of this biomarker assay to identify a potentially deleterious exposure has previously demonstrated (Massicote *et al.*, 2003). Many studies on earthworms showed the sensitivity of the phagocytosis to assess the toxicity of environmental pollutants. It has been shown that the exposure to mercury, cadmium or zinc was toxic and affected cell viability and phagocytosis (Fournier *et al.*, 2000; Sauvé *et al.*, 2002; Sauvé and Fournier, 2005). It was also observed that the phagocytic competence was inhibited by polychlorinated biphenyls (PCBs) (Goven *et al.*, 1994; Ville *et al.*, 1995).

The biomonitoring of contaminated sites using biological indicators provide useful information about site status, but the success of this approach still depending on chemical monitoring of soils and terrestrial biota to establish a comparison between biological

responses and toxicant concentrations in soils (Hankard *et al.*, 2004). Quantitative analysis of six metals (Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, and Zn) and PCDD/Fs confirmed the presence of contaminants in studied soils of Mercier. Comparison of the metal levels found in soils with criteria of Canadian Council of Ministers of Environment indicated that none of the sites had exceeded the Canadian recommendation of soil quality (Cd 1.4 µg/g, Pb 70 µg/g, Hg 6.6 µg/g, Cr 64 µg/g, Cu 63 µg/g and Zn 200 µg/g) (CCME, 1999). In contrast, the concentration of Ca in M091028W was 5 times higher than the medium level ($1,37 \times 10^4$ µg/g) found in Canadian soils (Health Canada, 1987).

In the chemical monitoring, PCDD/Fs were chosen because they were detected in Canadian soils in the vicinity of industrial areas (Green *et al.*, 2003) and also because of the lack of information about their toxicity in earthworms. The levels of PCDD/Fs found in Mercier studied soils did not exceed the Canadian recommendation of soil quality 4 pg TEQ/g (EC, 2005). The detection of PCDD/Fs in three sites did not give enough information about the profiles in fields surrounding the incinerator but allow to develop reflexion for further screen of PCDD/Fs toxicity effects. However, the less concentrations of PCDD/Fs detected in soils contribute to the toxic effect on earthworms as like as each chemical present in soil. In addition, it was recently demonstrated that the earthworm surface mucus presented high affinity for organic contaminants and may significantly affect the fraction, toxicity, and bioavailability of organic pollutants in the soil (Pan *et al.*, 2010). Concentrations of PCDD/Fs in earthworm body were not measured here, but as proposed above, it would be a follow-up to our present study. However, the possibility of their bioaccumulation was not excluded. In fact, it was already demonstrated that earthworms accumulated 2, 3, 7, 8-TCDD (Reinecke and Nash, 1984) and other persistent organic pollutants (POPs) such as PBDEs, PCBs and DDTs (Vermeulen *et al.*, 2010).

The measurement of heavy metal concentrations in worm tissues may contribute to assess environmental contamination levels, and proved relationship between soil pollution and earthworm metal bioaccumulation (Paoletti, 1999). In this study, it was shown that earthworms have the potential to bioaccumulate metals. For both Cd and Zn, the BCFs were above 1. But, for Cr, Cu and Pb, the BCFs were in most below 1. This variability of metal

BCFs indicated that uptake and excretion rates, in earthworms, vary for different metals. For example, it was observed that Al, Ni and Zn are highly regulated by the worm than Pb and Cd (Holmstrup *et al.*, 2011). These differences reflected that equilibrium tissue concentrations depends on soil concentration (Hankard *et al.*, 2004, Morgan and Morgan, 1988). Thus, the BCFs decreased with increasing soil concentration (Hankard *et al.*, 2004; Vermeulen *et al.*, 2010).

5. Conclusion

Prior to present study, nothing was known about the relationship between the status of soils and terrestrial biota in the vicinity of Mercier incinerator. This study revealed adverse chronic effects of soils in earthworms. Soils under dispersion plume decreased the growth rate, the survival and seem to inhibit the fecundity of earthworms during 28 days- exposure duration. This could be possibly caused by organic and inorganic chemicals found in these soils. The results showed low concentrations of chemicals, however, bioaccumulate fractions in earthworm's tissue, could have contributed to the observed effects. The mixture of inorganic and organic contaminants present in studied sites of Mercier makes it difficult to attribute the potential toxicity to one class of contaminants. However, the observed response represents a summation of toxic effects from each contaminant, measured or unmeasured, present in these soils.

The perspective of this work is to carry out *in situ* experiments in combination of more chemical analysis; this is a necessary approach to obtain comprehensive information on the ecotoxicological effects of soils in Mercier area submitted to the incinerator impacts.

Acknowledgments

The preliminary study (2007-2008) was in collaboration with the Biotechnology Research Institute (BRI) of the National Research Council of Canada (NRCC) and the 2007 experiments were realised in BRI-NRCC. The second study (2009) was conducted in the environmental immunotoxicology laboratory in Armand Frappier Institute of INRS (Institut

National de la Recherche Scientifique). The financial support has been provided by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology, (Dr. Michel Fournier). The authors are thankful to Mr Pierre Lapalme for his precious help in soil sampling, and to Dr Pierre Yves Robidoux (BRI-NRCC), Louis Martel and Elloise Veilleux (CEAEQuebec) for earthworm's donations.

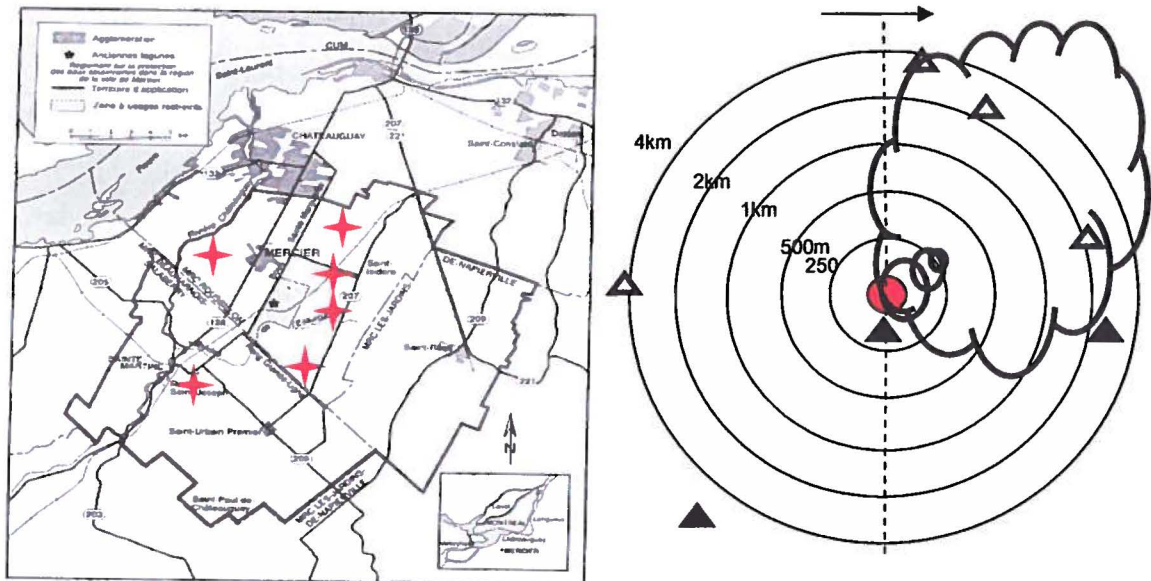


Figure.1: Location of the study area and collected soil samples in the vicinity of dangerous waste incinerator. ▲: Samples collected in 2007, △: Samples collected in 2009, ●: Incinerator

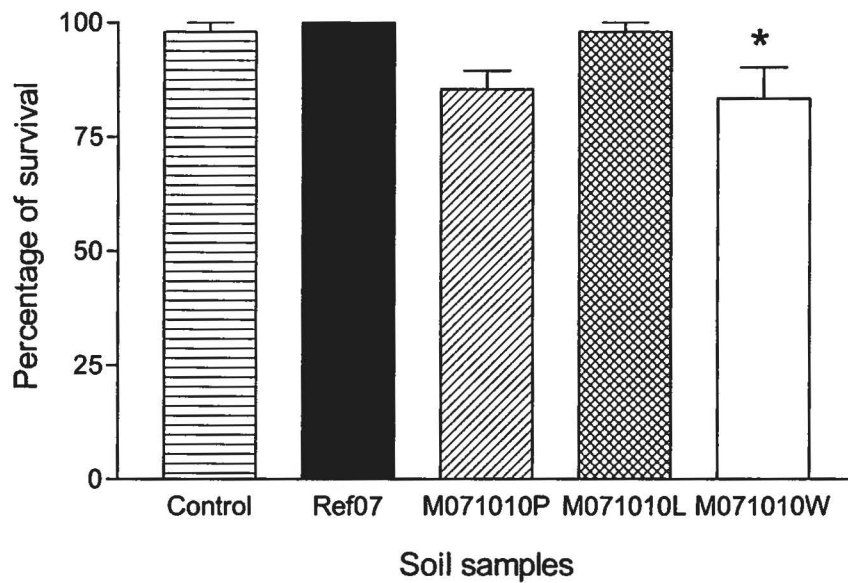


Figure 2: Effect of Mercier soils (2007) on survival of *Eisenia andrei* earthworms exposed 28 days (n=4). Asterisk represents significant difference (* $p \leq 0.05$) compared with reference soil (REF07).

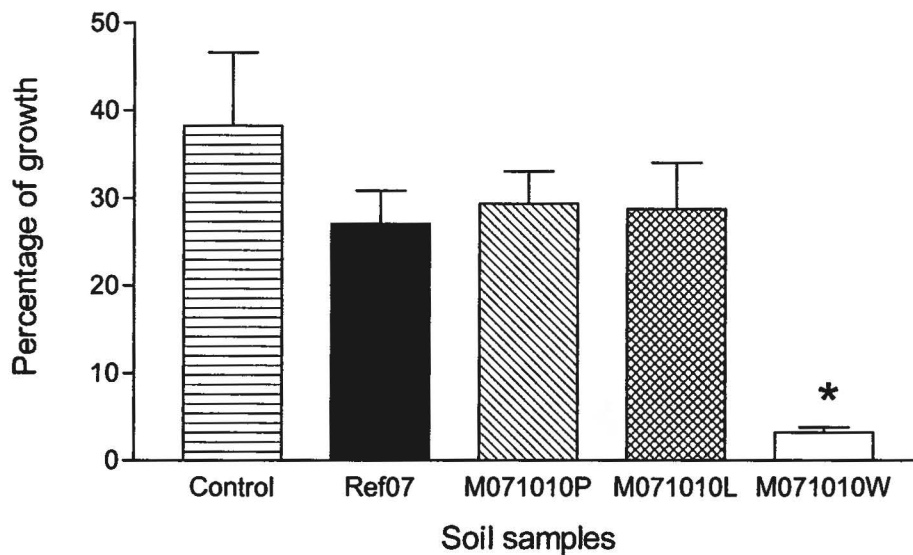


Figure 3: Effect of Mercier soils (2007) on the growth of *Eisenia Andrei* earthworms exposed 28 days (n=4). Asterisk represents significant difference (* $p \leq 0.05$) compared with reference soil (REF07).

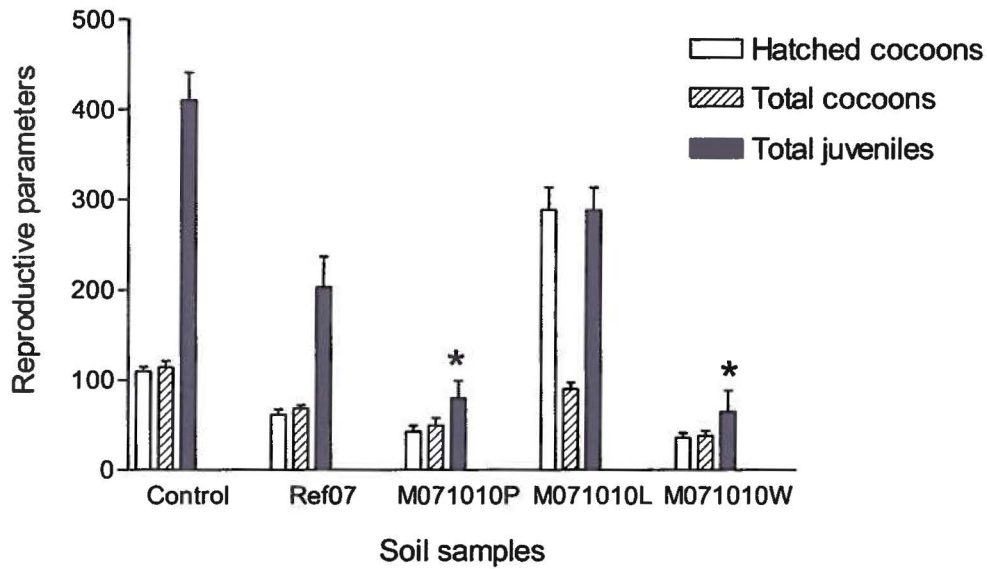


Figure 4: Effect of Mercier soils (2007) on the reproductive parameters of *Eisenia Andrei* earthworms (56 days) (n=4). Asterisk represents significant difference (* $p \leq 0.05$) compared with reference soil (REF07).

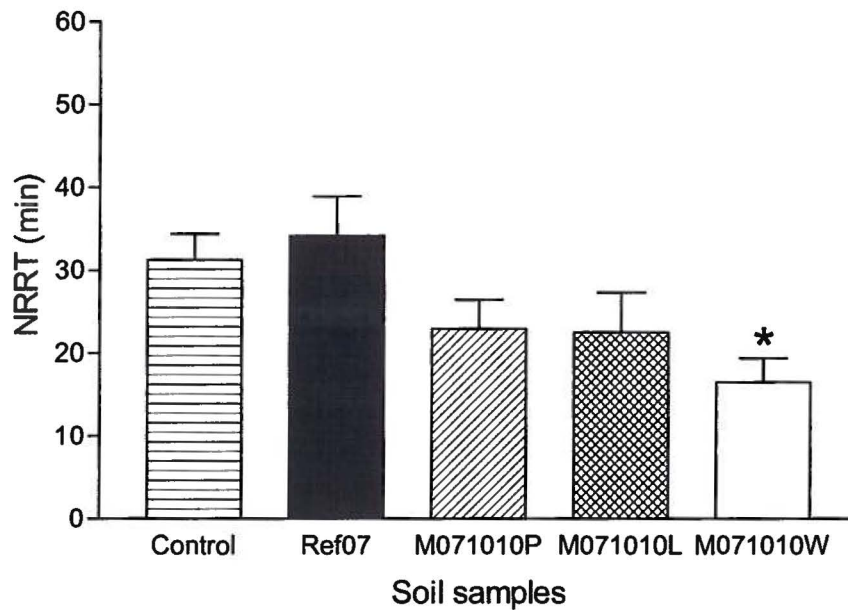


Figure 5: Mean neutral red retention time (n=4) measured for *Eisenia andrei* earthworms exposed 28 days in Mercier soil samples (2007). Asterisk represents significant difference (* $p \leq 0.05$) compared with reference soil (REF07).

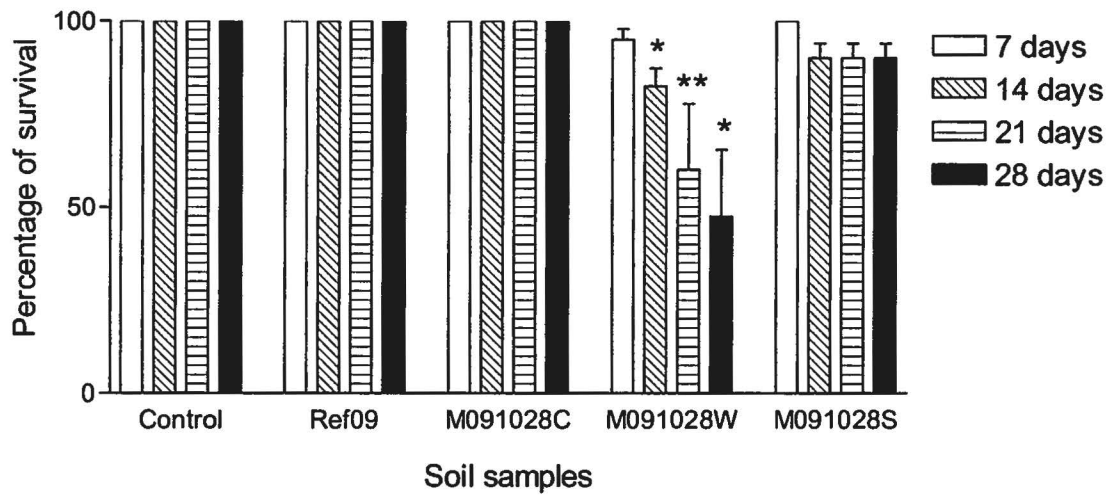


Figure 6: Effect of Mercier soils (2009) on survival of *Eisenia andrei* earthworms exposed 28 days (n=4). Asterisks represent significant difference compared with reference soil (Ref09) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

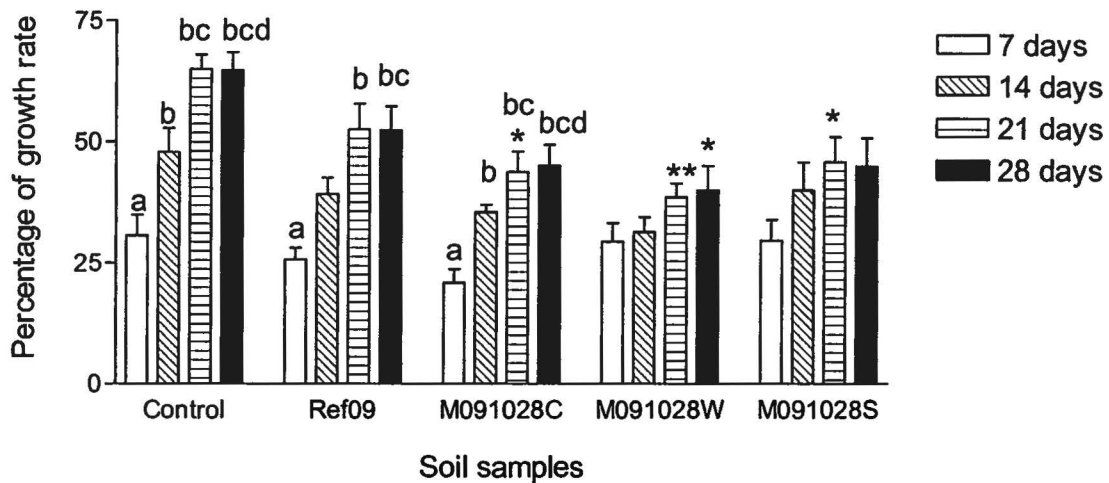


Figure 7: Effect of Mercier soils (2009) on the growth rate of *Eisenia andrei* earthworms exposed 28 days (n=4). Asterisks represent significant difference compared with reference soil (Ref09) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$). Letters a, b, c and d represent significant difference in each group ($p \leq 0.05$).

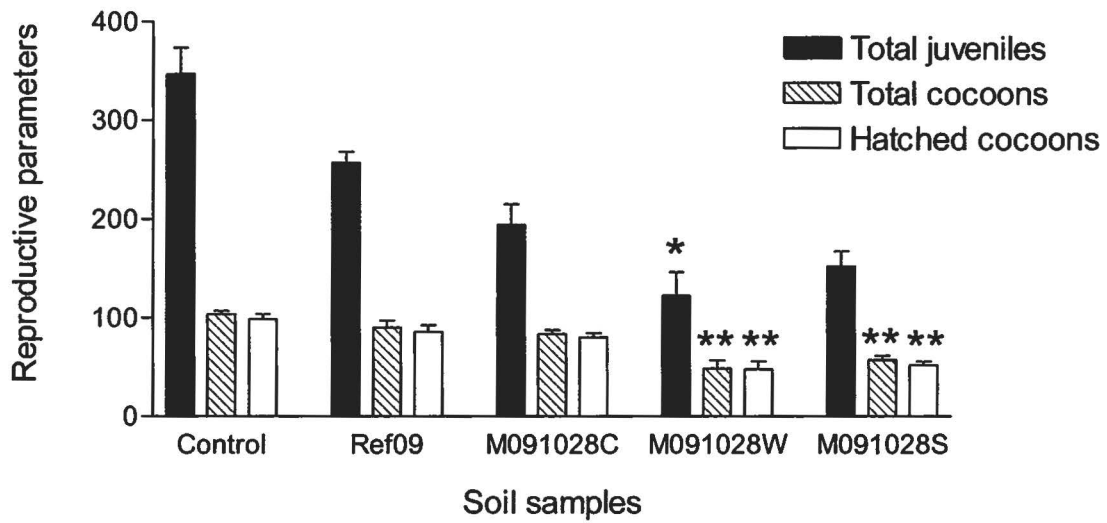


Figure 8: Effect of Mercier soils (2009) on the reproductive parameters of *Eisenia andrei* earthworms (56 days) (n=4). Asterisks represent significant difference compared with reference soil (REF07) (* $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$).

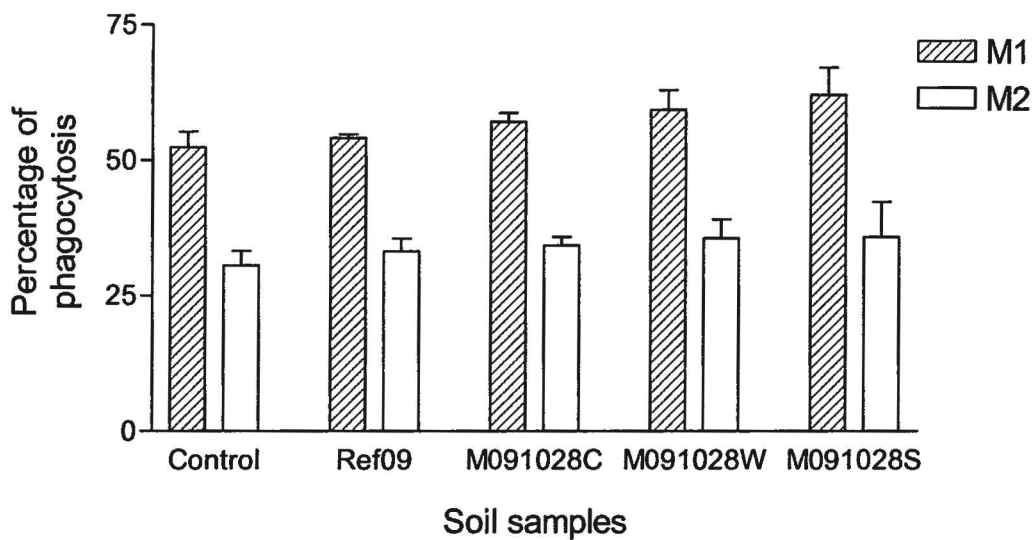


Figure 9: The percentage of phagocytosis measured for *Eisenia andrei* earthworms exposed 28 days in Mercier soil samples (2009) (n=4). M1: cells have engulfed one bead and more, M2: cells have engulfed three beads and more.

Table 1: Physical and chemical characteristics of Mercier soils

Parameter	Soils collected on 2007			Soils collected on 2009			
	M071010P	M071010L	M071010W	Ref09	M091028C	M091028W	M091028S
pH	5.66	8.66	6.32	7.67	7.47	7.92	7.88
% moisture	27.20	6.60	26.70	15.50	20.06	20.85	15.42
%N	0.64	0.02	0.64	0.21	0.29	0.17	0.15
%C	8.86	5.16	7.79	2.59	5.11	2.32	3.53
C/N	13.84	310.39	12.15	12.15	17.64	13.84	23.2
% sand	73.32	74.26	54.84	61.77	55.55	79.55	57.11
% silt	22.94	23.84	43.28	34.66	28	12.44	41.11
% clay	3.74	1.9	1.88	3.11	12.22	1.11	4.66
Cd ($\mu\text{g/g}$)	0.71	0.15	0.55	< 0.25	< 0.25	< 0.27	< 0.25
Pb ($\mu\text{g/g}$)	10.79	2.59	8.86	11	11	25	16
Hg ($\mu\text{g/g}$)	0.14	0.015	0.14	<0.07	<0.07	<0.07	<0.07
Ca ($\mu\text{g/g}$)	Nm	Nm	Nm	9200	8000	76000	3200
Cr ($\mu\text{g/g}$)	Nm	Nm	Nm	21	62	14	19
Cu ($\mu\text{g/g}$)	Nm	Nm	Nm	9	28	20	20
Zn ($\mu\text{g/g}$)	Nm	Nm	Nm	41	83	63	78

Nm: Not measured (the concentrations of these metals were not measured in soils in preliminary study of 2007)

Table 2: Metals bioaccumulation factors (BCFs) calculated as earthworm/soil concentrations

Metal	Soils collected on 2007			Soils collected on 2009			
	M071010P	M071010L	M071010W	Ref09	M091028C	M091028W	M091028S
Cd ($\mu\text{g/g}$)	3,10	6,67	6,55	10,00	10,80	12,22	12,80
Pb ($\mu\text{g/g}$)	0,11	0,32	1,02	0,33	0,26	0,34	0,35
Cr ($\mu\text{g/g}$)	Nm	Nm	Nm	0,21	0,14	0,24	0,23
Cu ($\mu\text{g/g}$)	Nm	Nm	Nm	0,93	0,39	0,55	0,50
Zn ($\mu\text{g/g}$)	Nm	Nm	Nm	2,44	1,33	1,75	1,41

Nm: Not measured (the concentrations of these metals were not measured in soils in preliminary study of 2007)

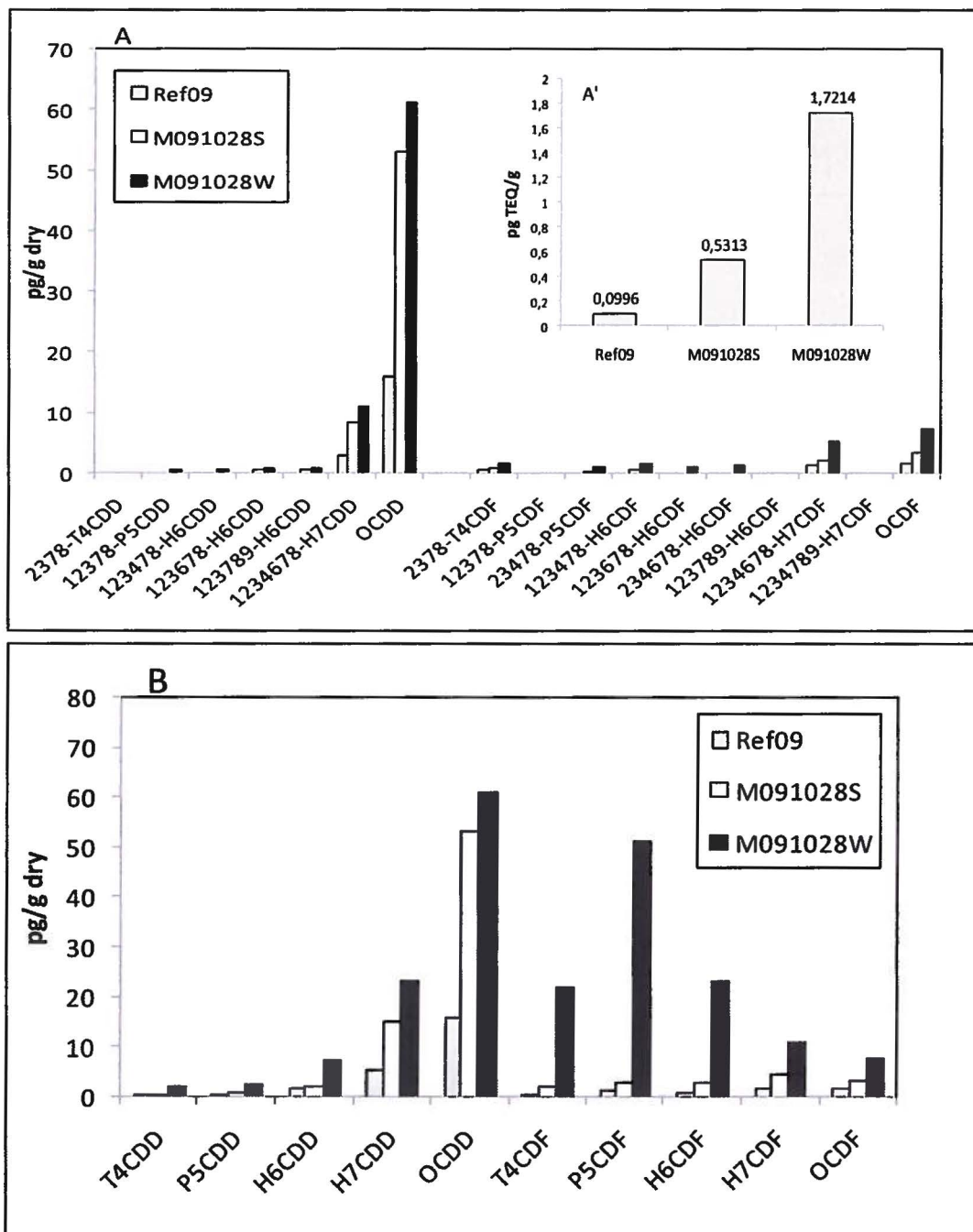


Figure 10: Concentration profiles of PCDD/Fs in Mercier soils. (A) Mean total concentrations of the 17 toxic congeners. (A') Total TEQ concentrations. (B) PCDD/Fs homologue patterns

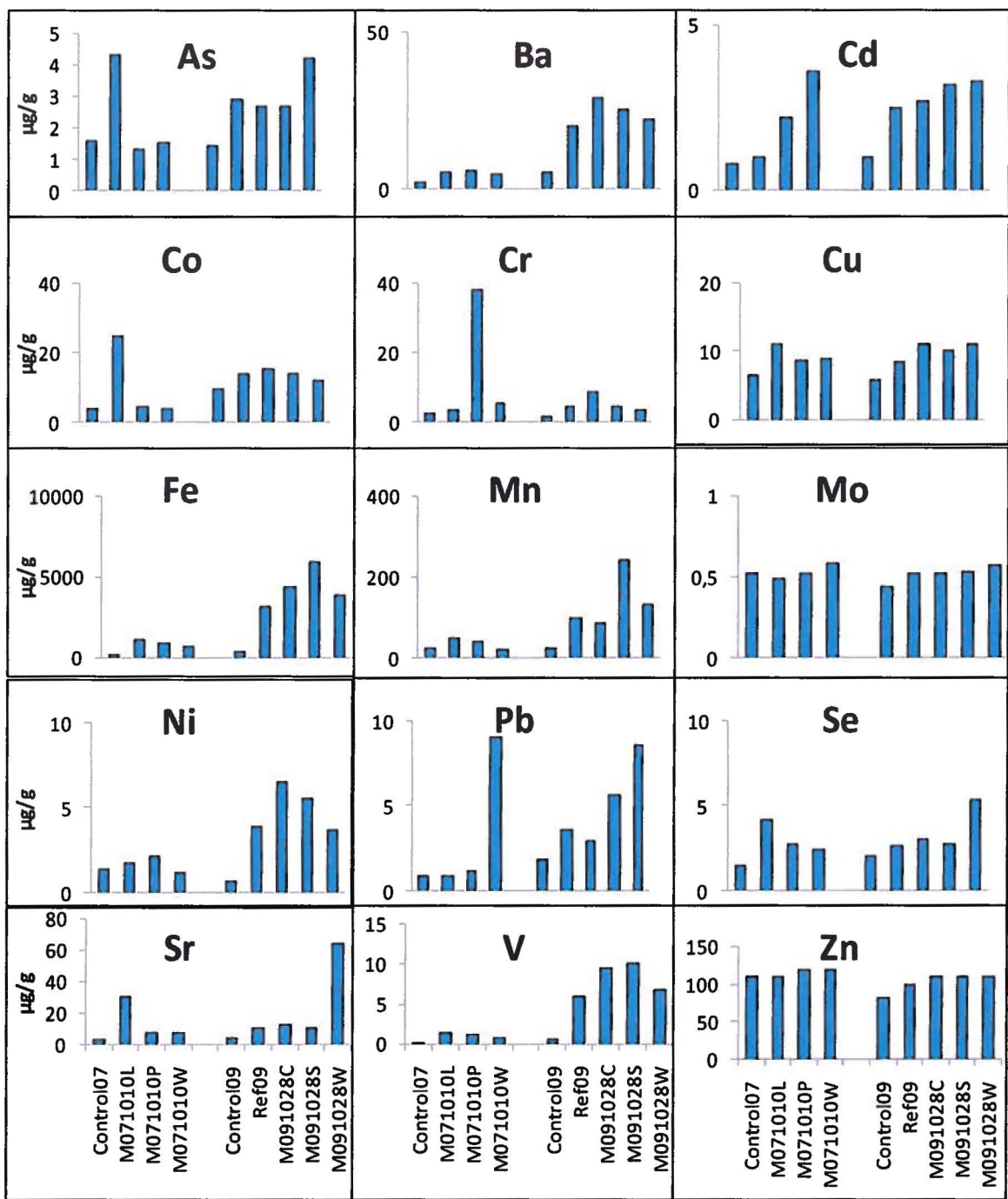


Figure 11: Metal concentrations in tissues of earthworms exposed 28 days to Mercier soils in laboratory

References

- Brousseau, P., N. Fugère, et al. (1997). "Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta)." *Soil Biol Biochem* 29(3-4): 681-684.
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boernaus, H., Flipo, D., Fournier, M., (1999). *Manual of Immunological Methods*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Bureau d'Audiences Publiques sur l'environnement du Québec (BAPE), 1994. *Restauration du lieu contaminé de Mercier*. Montréal, BAPE, 222 p.
- CCME, 1999: Canadian Council of Ministers of the environment (http://www.ccme.ca/publications/list_publications.fr.html#link8)
- Colborn, Théo, Dumanoski, Dianne and John Peterson Myers, *Our Stolen Future*, A Dutton Book, New-York, 1996, 306 p.
- Dallinger R, (1996). Metallothionein research in terrestrial invertebrates: synopsis and perspectives. *Comparative biochemistry and physiology C: Pharmacology, toxicology and Endocrinology* 113, 125-133.
- Dominguez, J., A. Velando, et al. (2003). "Uniparental reproduction of *Eisenia fetida* and *E. andrei* (Oligochaeta: Lumbricidae): evidence of self-insemination: The 7th international symposium on earthworm ecology [middle dot] Cardiff [middle dot] Wales [middle dot] 2002." *Pedobiologia* 47(5-6): 530-534.
- Dominguez, J., A. Velando, et al. (2005). "Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species?" *Pedobiologia* 49(1): 81-87.
- Elvira C, Dominguez J, Mato S, (1996). The growth of *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena rubida* in cow manure mixed cultures with *Eisenia andrei*, *Appl Soil Ecol* 5, 97-103.
- Environnement Canada, 2005. http://www.ec.gc.ca/ceqg-rcqe/français/html/gaag_dioxinesfuranessol_fr.cfm
- Environnement Canada: report EPS 1/RM/43-june 2004. Biological test method: tests for toxicity of contaminated soil to earthworms (*Eisenia Andrei*, *Eisenia fetida* or *Lumbricus terrestris*).
- Fischer E, Molnar L. (1997). Growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta Lumbricidae) in semi natural soil containing various metal chlorides, *soil Biol Biochem* 29 (3/4), 667-670.
- Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H and Brousseau P,(2000). Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xénobiotics. *Amer Zool*, 40:412-420.

- Fugère, N., P. Brousseau, et al. (1996). "Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta)." *Toxicology* **109**(2-3): 157-166.
- Furst, A. and Q. Nguyen (1989). "Cadmium-induced metallothionein in earthworms (*Lumbricus terrestris*)." *Biol Trace Elem Res* **21**: 81-85.
- Gareau Priscilla avec la collaboration de Maude Laberge et Daniel Green sous la direction de Louise Vandelac "Diagnostic Écosanté Mercier". Rapport préliminaire présenté au comité de vigilance environnementale régionale (CVER). UQAM Avril 2005.
- Goven, A. J., C. Shing Chong, et al. (1994). "Lysozyme activity in earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomic fluid and coelomocytes: Enzyme assay for immunotoxicity of xenobiotics." *Environ Toxicol Chem* **13**(4): 607-613.
- Goven, A.J, Chen, S.C., Fitzpatrick, L.C, and Venables, B.J (1994). Lysosyme activity in the earthworm (*Lumbricus terrestris*) coelomomic fluid coelomocytes: enzymeassay for the immunotoxicity of xenobiotics. *Environ Toxicol Chem.* **13**, 607-13.
- Green, N. J. L., Hassanin, A. et al. (2003). "Observations on Historical, Contemporary, and Natural PCDD/Fs." *Environ Sci Technol* **38**(3): 715-723.
- Hankard, P. K., Svendsen, C. et al. (2004). "Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis." *Sci Tot Environ* **330** (1-3): 9-20.
- Health Canada, 1987: (<http://www.hc-sc.gc.ca/ewh-semt/pubs/water-eau/calcium/index-fra.php>)
- Holmstrup, M., Sarensen, J. G. et al., (2011). "Body metal concentrations and glycogen reserves in earthworms (*Dendrobaena octaedra*) from contaminated and uncontaminated forest soil." *Environ Pollut* **159**(1): 190-197.
- ISO 11268-1, 1993, Soil quality- effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)-part1: determination of acute toxicity using artificial soil substrate, ISO11268-1, International standards organisation, Geneva.
- ISO 11268-2, 1998, Soil quality- effects of pollutants on earthworms *Eisenia fetida* – determination of effects on reproduction
- Klaassen CD, Liu J and Choudhuri S (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **39**, 267-294.
- Laberge, Maude, « La saga de la catastrophe écologique de la région de ville Mercier : une analyse socio-historique de 38 ans d'interventions écocitoyennes pour limiter et contrer les impacts en cascades des déversements autorisés de déchets industriels toxiques en 1968 ». Mémoire de maîtrise, Institut des Sciences de l'environnement, 2007

- Lowe, C. N. and K. R. Butt (2007). "Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review." *Eur J Soil Biol* 43(Supplement 1): S281-S288.
- Lukkari T., Aatsinki M., Väisänen A and Haimi J, 2005. Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworms tests. *Appl Soil Ecol*, 30, 133-146.
- Maboeta, M. S., S. A. Reinecke, et al. (2002). "The relation between lysosomal biomarker and population responses in a field population of *Microchaetus* sp. (*Oligochaeta*) exposed to the fungicide copper oxychloride." *Ecotoxicol Environ Saf* 52(3): 280-287.
- Massicotte, R., P. Y. Robidoux, et al. (2003). "Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory." *J Environ Monit* 5(5): 774-779.
- Massicotte, R., P. Y. Robidoux, et al. (2003). "Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory." *J Environ Monit* 5(5): 774-779.
- Meneses M, Llobet J. M, Granero S, Schuhmacher M, Domingo J. L (1999). Monitoring metals in the vicinity of a municipal waste incinerator: temporal variation in soils and vegetation. *Sci Tot Environ* 226, 157-164.
- Morgan JE, Morgan AJ (1988). Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils. *Environ Pollut* 54: 123-138.
- Norgrove, L. (2007). "Effects of different copper fungicide application rates upon earthworm activity and impacts on cocoa yield over four years." *Eur J Soil Biol* 43(Supplement 1): S303-S310.
- OECD, Guidelines for testing of chemicals, No. 207 earthworm acute toxicity tests, OECD, Paris, 1984.
- Pan, X., W. Song, et al. (2010) "Earthworms (*Eisenia foetida*, Savigny) mucus as complexing ligand for imidacloprid." *Biol Fertil Soils* 46(8): 845-850.
- Paoletti, M. G. (1999). "The role of earthworms for assessment of sustainability and as bioindicators." *Agriculture, Ecosystems & Environment* 74(1-3): 137-155.
- Radetski C.M, Ferrari B, Cotelle S, Masfaraud J-F, Ferard J. F (2004). Evaluation of genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Sci Tot Environ* 333, 209-216.
- Ramade F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie; fondements et applications. Ed. Lavoisier, pp 618
- Reinecke, A. J. and R. G. Nash (1984). "Toxicity of 2,3,7,8-TCDD and short-term bioaccumulation by earthworms (*oligochaeta*)." *Soil Biol Biochem* 16(1): 45-49.

- Robidoux P.Y, Dubois C, Hawari J, Thiboutot S and Sunahara G.I, (2004a). Assessment of soil toxicity and antitank firing range using *Lumbricus terrestris* and *Eisenia Andrei* in mesocosms and laboratory studies, *Ecotoxicology*, 13, 603-614.
- Robidoux P.Y, Gong P., Sarrazin M., Bardai G., Paquet L., Hawari J, Dubois C, and Sunahara G.I, (2004b). Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range, *Ecotoxicol Environ Saf*, 58, 300-313.
- Robidoux P.Y, Hawari J, Thiboutot S, Ampleman G and Sunahara G.I, (1999). Acute toxicity of 2, 4, 6- trinitrotoluene in earthworm (*Eisenia Andrei*), *Ecotoxicol Environ Saf*, 44, 311-321.
- Robidoux P.Y, Hawari J, Thiboutot S, Ampleman G and Sunahara G.I, (2001). Chronic toxicity of octanhydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tétrazocine (HMX) in soil determining using the earthworm (*Eisenia Andrei*) reproduction test. *Environ Pollut*, 111, 283-292.
- Robidoux P.Y, Svendsen C, Caumartin J, Hawari J, Ampleman G, Thiboutot S, Weeks J.M and Sunahara G.I, (2000). Chronic toxicity of energetic compounds in soil using the earthworm (*Eisenia Andrei*) reproduction test. *Environ Toxicol Chem*, 19, 1764-1773.
- Robidoux, P. Y., C. Svendsen, et al. (2002). "Evaluation of tissue and cellular biomarkers to assess 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) exposure in earthworms: Effects-based assessment in laboratory studies using *Eisenia andrei*." *Biomarkers* 7(4): 306-321.
- Sauvé S and Fournier M, (2005). Age-specific immunocompétence of the earthworm *Eisenia Andrei* exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol Environ Saf*, 60:67-72.
- Sauvé S, Hendaoui M, Brousseau P and Fournier M (2002). Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in Vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicol Environ Saf*, 52: 21-29.
- Scott-Fordsmand, J. J., J. M. Weeks, et al. (1998). "Toxicity of Nickel to the Earthworm and the Applicability of the Neutral Red Retention Assay." *Ecotoxicology* 7(5): 291-295.
- Scott-Fortsmand J.J., and Weeks J.M., (2000). Biomarkers in Earthworms. *Rev Environ Contam Toxicol* 165, 117-159
- Svendsen C., Weeks JM (1997a). Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. I: Links to ecological effects in a laboratory study with *Eisenia Andrei*. *Ecotoxicol Environ Saf* 36 : 72-79.
- Vandelac, Louise (2006). Projet de recherche Diagnostic Écosanté Mercier, Phase 3, présenté au MDEIE, juillet 2006.
- Vandelac, Louise et Marie-Hélène Bacon «Perturbateurs endocriniens et polluants organiques persistants : inquiétante érosion de la santé, de la fertilité et des capacités intellectuelles,

» pp.237-267. *Ruptures*, Revue interdisciplinaire en santé, Vol. 6, No 2. Département de médecine, Université de Montréal. Déc.1999.

Vermeulen, F., A. Covaci, et al., (2010). "Accumulation of background levels of persistent organochlorine and organobromine pollutants through the soil-earthworm-hedgehog food chain." *Environ Int* **36**(7): 721-727.

Vernile, P., Fornelli, F. et al. (2007). "Bioavailability and toxicity of pentachlorophenol in contaminated soil evaluated on coelomocytes of *Eisenia andrei* (Annelida: Lumbricidae)." *Toxicol in Vitro* **21**(2): 302-307.

Ville, P., P. Roch, et al. (1995). "PCBs Increase Molecular-Related Activities (Lysozyme, Antibacterial, Hemolysis, Proteases) but Inhibit Macrophage-Related Functions (Phagocytosis, Wound Healing) in Earthworms." *J Invertebr Pathol* **65**(3): 217-224.

Weeks, J. M. and C. Svendsen (1996). "Neutral red retention by lysosomes from earthworm (*Lumbricus rubellus*) coelomocytes: A simple biomarker of exposure to soil copper." *Environ Toxicol Chem* **15**(10): 1801-1805.

Xu, M.-x., J.-h. Yan, et al. (2008). "Source identification of PCDD/Fs in agricultural soils near to a Chinese MSWI plant through isomer-specific data analysis." *Chemosphere* **71**(6): 1144-1155.

4. 3. ÉVALUATION *IN SITU* DE LA TOXICITÉ DES SOLS DE MERCIER SUR DES VERS DE TERRE *E.ANDREI*

Manuscrit 5 (en préparation)

Titre

Assessment of soil toxicity from the vicinity of the dangerous waste incinerator of Mercier (Quebec) using *Eisenia andrei* earthworms in mesocosms

Auteurs

Hayet Belmeskine, Sami Haddad, Louise Vandelac, Pierre Yves Robidoux , Michel Fournier

Contribution personnelle

J'ai rédigé ce manuscrit à titre d'auteur principal. De plus, j'ai participé à l'échantillonnage, à la planification des expériences, j'ai réalisé toutes les expériences, analysé et interprété les résultats.

Contribution des coauteurs

Sami Haddad, Louise Vandelac et Michel Fournier ont participé à la planification des expériences, à l'analyse des résultats et à la correction du manuscrit. Pierre Yves Robidoux a fournie les protocoles et une quantité importante de l'espèce sentinelle utilisée dans nos expériences.

RÉSUMÉ

Des études sur des mésocosmes de vers de terre ont été réalisées sur des sites localisés sous le panache de l'incinérateur de déchets dangereux de Mercier. La survie, la croissance en combinaison avec deux biomarqueurs; la phagocytose et le cycle cellulaire ont été utilisés pour évaluer l'effet des sols de Mercier sur des vers de terre *Eisenia andrei* sous des conditions de terrain. Dans chaque site, et en addition au mésocosme du sol de Mercier, un mésocosme témoin contenant du sol artificiel a été installé. Les résultats indiquaient que la survie a été diminuée de plus de 50% dans tous les sols de Mercier après 28 jours d'exposition. Les vitesses de croissance étaient négatives dans la majorité des sites ce qui reflétait une perte de poids significative. Il a été aussi démontré une induction de l'activité phagocytaire pour le sol Mercier du site M100915W, tandis que celle a été inhibée pour les vers exposés au sol de Mercier du site M100915S. Aucun effet n'a été noté dans le site M100915C. Une induction significative de l'efficacité phagocytaire a été observée chez les vers exposés au sol de Mercier du site M100915W, mais aucun effet n'a été observé pour les autres sites. Comparés à leurs témoins, le cycle cellulaire des cœlomocytes a été affecté chez les vers dans tous les sites étudiés.

ABSTRACT

Earthworm mesocosms studies were carried out on sites located under the dispersion plume of the dangerous waste incinerator of Mercier. Survival, growth of worms in combination of two biomarkers; the phagocytosis and cell cycle, were used in these studies to assess the effect of Mercier soils on the earthworm *Eisenia andrei* under field conditions. In each site, in addition to Mercier field soil mesocosm, a control mesocosm containing artificial soil was installed. Results indicated that the survival was reduced up to 50% in all field soils following 28 days of exposure, and the growth rates were negative which reflected that worms have lost weight significantly in the most of sites. It was also shown that the phagocytic activity was significantly induced in worms exposed to field soil at site M100915W, while it was significantly reduced in worms exposed to field soil at M100915S. No effect was observed for site M100915C. The phagocytic efficiency was significantly induced in worms exposed to field soil at site M100915W, but no effects were noted for the other sites. Compared to their controls, the coelomocyte cell cycle was affected in worms exposed to field soils at all the sites studied.

Keywords: contaminated soil, mesocosm, earthworms, dangerous waste incinerator, bioindication, phagocytosis, cell cycle.

1. INTRODUCTION

This study is the second part of the ecotoxicological monitoring of Mercier soils situated in the vicinity of the dangerous waste incinerator. Mercier is an agricultural area located at 25 km SO of Montreal (Quebec, Canada). This region undergoes since 1968 effects of lagoons and underground water contamination by the deflections of oils and toxic wastes. In addition, since 1972 the Mercier area has been subjected to cumulative impacts of the emissions of the dangerous waste incinerator built on the same site (BAPE 1994, Gareau *et al.*, 2005; Vandelac, 2006; Laberge 2007). The incinerator emissions have stirred local public concerns for their potential adverse effects on health and surrounding environment. Until now, few data are available on this site, but it is well recognized that a complex mixture of contaminants is associated to this kind of pollution source as heavy metals and persistent

organic pollutants (POPs) which poses serious environmental and human health problems (Colborn *et al.*, 1996; Vandelac and Bacon 1999).

Previous studies focusing on incinerator atmospheric emissions and their depositions concluded that these emissions contribute to the contamination of terrestrial environment (Meneses *et al.*, 1999; Radetski *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2008). Usually, in order to study the ecotoxicological impact and evaluate soil quality, toxicity tests were conducted on earthworms to investigate the lethal and sub-lethal effects (Robidoux *et al.*, 1999, 2000, 2001; Robidoux 2004a, b; Lukkari *et al.*, 2005). Thus, the aim of the present study is to assess the lethal and sub-lethal effects of earthworm exposure to Mercier soils under field conditions using phagocytosis and cell cycle as biomarkers in *in situ* mesocosm studies. The field applicability of phagocytosis as a biomarker has been demonstrated in earthworms exposed at contaminated sites containing metals (Massicotte *et al.*, 2003). While, the cell cycle has not been previously measured in field conditions, thus its efficiency would be examined in this study.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Study areas

This study is the second part of the ecotoxicological monitoring of Mercier Soils submitted on the impacts of the hazardous waste incinerator. Thus, the same sites selected for previous laboratory tests were used in the present *in situ* study. Three field sites located near Mercier incinerator; under the dispersion plume were used. The first site was a cultivated corn-land (M100915C) located at about 2 km E ($45^{\circ}17'02.48''N73^{\circ}42'09.95''W$), the second was a wooded ground (M100915W) at approximately 3 km NE ($45^{\circ}17'05.70''N73^{\circ}42'05.19''W$) and the third one was a cultivated field in Saint-Isidore (M100915S) situated at 3.5 km N ($45^{\circ}18'05.35''N73^{\circ}42'06.56''W$). In addition, a fourth field site (unpolluted) was used as reference. It was found outside the dispersion plume (Ref10) at about 5 km W ($45^{\circ}18'08.83''N73^{\circ}46'0.14''W$). It is important to note here that all exposures concerning the cultivated fields were done in the uncultivated field borders.

2.2. Measurement of site soil characteristics and chemical concentrations

The physical soil characteristics and its chemical concentrations of heavy metals and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) were measured and presented in our previous study which was carried out on the toxicity of Mercier soils on earthworms under laboratory conditions. However, the humidity and the pH in all mesocosms were measured after 28 days of exposure.

2.3. Animals

The earthworms, *Eisenia andrei* were initially purchased from the Carolina Biological Supply (Burlington, NC, USA) and were used to establish the laboratory culture. Prior to the experiment, the animals were maintained in earthworm bedding (Magic Products, Amherst, Jct, WI) at $20 \pm 1^\circ\text{C}$, 70-80% (w/w) moisture and 16:8 h light/dark cycle, and fed once a week with cereal (Magic Worm Food, Magic Products). Before beginning the experimentation, the worms were acclimated to the laboratory conditions for two weeks.

2.4. Exposure protocol

The *in situ* exposure of earthworms was carried out in field soil mesocosms. These mesocosms were cuboid bags (25cm x 25cm x 16cm deep) made from 100 μm Nylon mesh, each constructed from a single piece of material to prevent earthworms from entering or escaping. The lid of the bag was sealed using Velcro tape (Robidoux *et al.*, 2004). Two mesocosms were installed at each site (Fig.1). The first one contained the control soil prepared following OECD protocol (10% (w/w) sphagnum peat, 20% (w/w) kaolinite clay, 70% (w/w) quartz sand, and adjusted to pH 6.5 with CaCO_3) (OECD, 1993). The control soil humidity was then adjusted to 75% of the total water-holding capacity of the soil. The second mesocosm was filled with Mercier field soil. This last soil was removed from the ground with a stainless steel shovel, and was well mixed in a clean plastic bucket before to be transferred in the bag. *Eisenia andrei* earthworms (n=32), previously individually weighed, were placed into each bag for 28 days exposure. Deionized water (1L per mesocosm) and 10 g of dried cereal were added prior to close the mesocosms. Ten grams of cereals were added after 14 days of exposure. A layer of soil was put on the mesocosms to avoid excessive evaporation

(Robidoux *et al.*, 2004). After 28 days exposure-duration, the surviving worms were hand sorted from the mesocosms, counted, and were individually rinsed with distilled water, blotted dry on a paper towel, weighed and placed in the dark in Petri dish containing a watered filter paper covered with foil paper for 3 hours. Then, a cell extrusion was performed on the worms to measure the biomarkers.

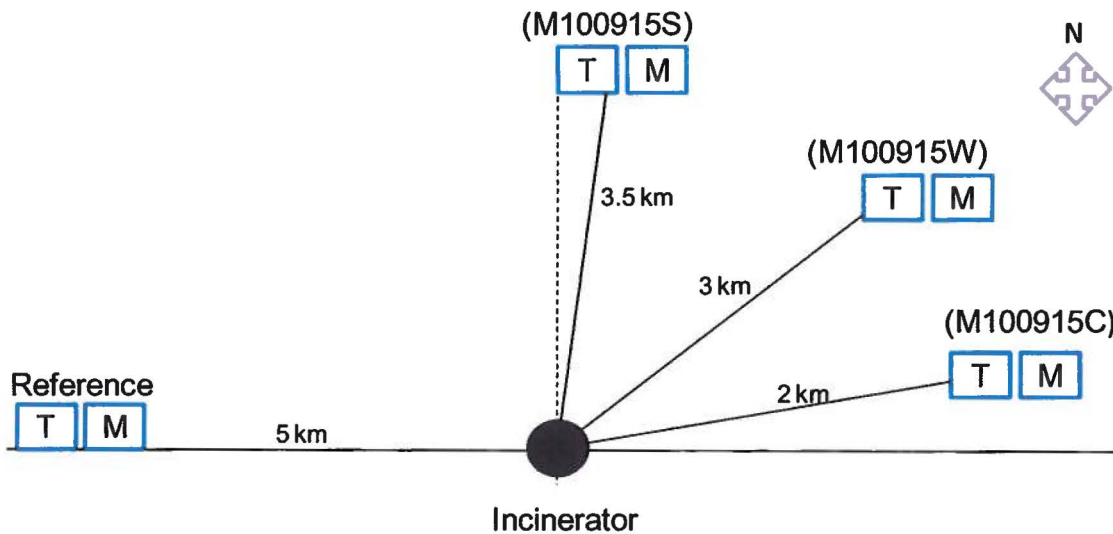


Figure 1: Diagram of *in situ* exposure. C: control mesocosm, M: Mercier field mesocosm.

Each site has a code which means: material/date of mesocosm installation
(year/month/day)/site

2.5. Earthworm biomarker measurements

2.5.1. Cell extrusion

After the egestion of gut contents, the worms were rinsed individually with distilled water, blotted dry, and a cell extrusion was performed. Briefly, a single worm was inserted into a 15-ml tube containing 3 ml of Lumbricus balanced salt solution (LBSS) composed of 1.5 mM NaCl, 4.8 mM KCL, 1.1 mM MgSO₄.7H₂O, 0.4 mM KH₂PO₄, 0.3 mM Na₂PO₄.7H₂O, 3.8 mM CaCl₂, and 4.3 mM NaHCO₃ (Brousseau *et al.*, 1997b, 1999; Sauvé *et al.*, 2002). Then, Cœlomocytes were extracted using an electrical extrusion method which consists in submitting the liquid medium to a 6 V current for 20- 30 s using aluminium wires

(Massicotte *et al.*, 2003). The worm was then removed from the tube and the solution was gently shaken.

Cell yield and initial cell viability were determined by diluting 50 µl of cell suspension with 50 µl of 0.4% trypan blue (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO). This mixture was placed into an improved Neubauer hemocytometer which was microscopically observed (Sauvé *et al.*, 2002, Massicotte *et al.*, 2003).

2.5.2. Phagocytosis

The phagocytic activity of cœlomocytes was measured in each worm, based on the protocol of Brousseau *et al.* (1999). For each cell suspension, a volume of fluorescent latex beads (Polysciences Inc., Warrington, PA, USA) was added in a bead: cell ratio of 100:1. The beads were previously sonicated for 5 min at room temperature to get rid of doublet and triplet beads. The cells (with beads) were then incubated for 18 h at room temperature. To remove the beads that were not phagocytosed, the cell suspension was layered over a 3% bovine serum albumin (BSA) (MP Biomedicals, LLC (Ohio, USA) and centrifuged at 150 g, 4°C and for 8 min. The cells collected in the pellet were then resuspended in 500 µl of hematal (Fisher Scientific, Ottawa, Ont, Canada) containing 0.185% formaldehyde (Sigma-Aldrich, USA) and 0.2% sodium azide (Fischer Chemical, USA). Thus, the phagocytosis was measured by flow cytometry (Becton Dickinson, San José, USA) (Brousseau *et al.*, 1999) and for each sample, the fluorescence of 5000 events was recorded. Results were analysed with the Cell Quest Pro software (Becton Dickinson) to determine the percentage of cells that engulfed one bead and more (phagocytic activity) or three beads and more (phagocytic efficiency). The results were expressed as the percentage of phagocytosis.

2.5.3. Analysis of cœlomocyte cell Cycle

Cell cycle analysis of cœlomocyte was performed using flow cytometry assay. The cells were first spun at 450g for 5 min in cold ethanol 70%, washed twice in PBS 2% and finally resuspended in 1 ml of PBS containing RNase (100 µg/ml) and PI (50 µg/ml). Cells were then incubated at room temperature during 30 min. After incubation period, stained cells were analyzed by flow cytometer FACScalibur (Becton Dickinson, San José, USA) using the

orange fluorescence emission for the PI (610 ± 20 nm band pass) and the different pass of channel of FL2 the width and the amplification. For the determination of the cell cycle phases, a peak area of FL2-H was recorded on a log scale. The quantitative cell cycle and DNA histogram peak analysis were performed using the Cell Quest Pro software (Becton Dickinson). The percentages of cells in G0/G1, S and G2/M cell cycle phases were determined and 5000 events were acquired to evaluate the cell cycle alterations (Frouin *et al.*, 2010). It is important to note that the human tumor cells (K562) were used as control for the cell cycle assay because they represent a continuously cycling cell (Quaglino *et al.*, 1996).

2.6. Statistics

The data were expressed as arithmetic means \pm standard deviations. In each site, differences between control and Mercier field soil were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey HSD post-hoc test ($p \leq 0.05$). The calculations were performed using STATISTICA for windows (Version 6.0, StatSoft, Tulsa).

3. RESULTS

After 28 days of *in situ* exposure of earthworms in mesocosms installed in selected Mercier sites located in the vicinity of the incinerator, some observations were noted in the day of mesocosm recuperation. Thus, in the reference site, one bag was found outside the hole and the second was semi-closed, and no worms were found in the two bags. This suggested that bags were curiously opened and all worms got out. This act of vandalism forced us to do not consider the reference soil in this study. So, only sites located under the dispersion plume have been considered.

3.1. Soil characteristics at the study sites

Mean soil pHs were constant in control soils, and varied between 6.95 at M100915C and 7.42 at M100915W (Table 1). Moisture levels were approximately equal in control and field soils at M100915C and M100915S sites. However, at the site M100915W, the moisture level in control was lower than the field soil. Also, it was found that the moisture levels in

field soils from M100915C and M100915S sites were less than that from M100915W site which was 33.68%.

Table 1: Mean values of pH and moisture level in soils of study sites

Site code	soil	pH	moisture level (%)
M100915C	Control	6.64	22,59
	Mercier soil	6.95	23,29
M100915W	Control	6.67	19,26
	Mercier soil	7.42	33,68
M100915S	Control	6.66	20,82
	Mercier soil	6.97	19,95

3.2. Survival and growth

After 28 days-exposure duration, a mortality of earthworms was observed in all the mesocosms including controls and field soils at all the sites (Fig. 2). Thus, at M100915C, a mortality of 20% was noted in control mesocosm and 50% in mesocosm of field soil. At M100915W site, 50% of mortality was obtained in the control and about 70% in Mercier soil. Finally, the M100915S site showed the highest mortalities in both control and Mercier soil mesocosms, which were about 70 and 80 %, respectively.

In order to evaluate the effects of Mercier soils on the growth of earthworms, two parameters were measured; the percentage of growth and the relative growth rate in each site for control and field soil mesocosms, and the same profiles were obtained (Fig. 3). Thus, under the field conditions, the growth percentages of worms in controls at M100915C and M100915W sites increased (Fig. 3A) and the growth rates were positive (Fig. 3B). In contrast, the worms in the control mesocosm at M100915S site lost weight; this was also indicated by the negative growth rate. In Mercier soils, all worms lost weight significantly (Fig. 3) and the growth rates were negative, except at the site M100915C where the worms grew up slowly but the growth did not exceeded 5%.

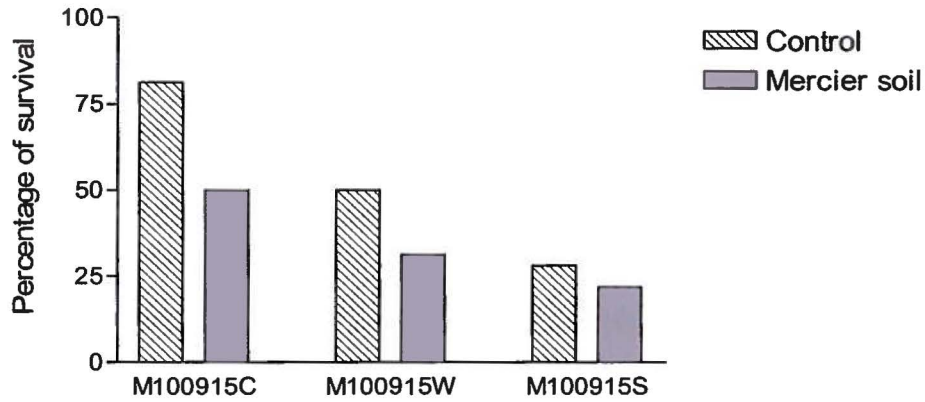


Figure 2 : Effects of Mercier field soils on the percentage of survival of *Eisenia andrei* earthworms exposed *in situ* for 28 days (n=32).

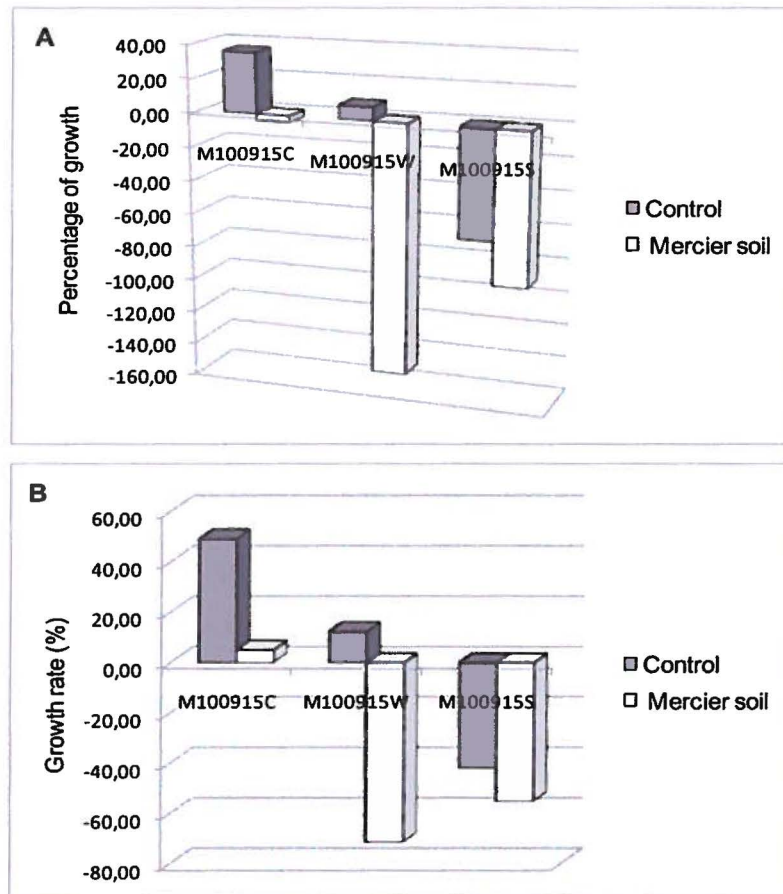


Figure 3: Effects of Mercier field soils on the growth of *Eisenia andrei* earthworms exposed *in situ* for 28 days. (A): Percentage of growth, (B): the relative growth rate (%).

3.3. Cell yield and viability

Extruded cœlomocyte yield was illustrated on Fig. 4. No significant effects were observed in controls and Mercier field soils at M100915C and M100915S sites. However, at M100915W site, the cell yield of worms exposed to field soil was significantly ($p < 0.05$) lower from the control. Cell viability (Fig. 5) was shown to be unaffected by *in situ* exposure of earthworms in all soils.

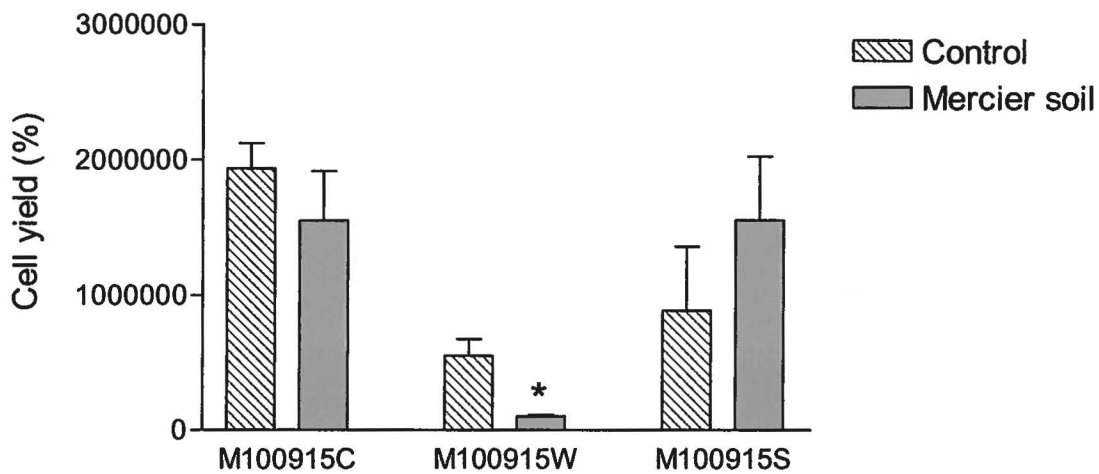


Figure 4: Effects of Mercier field soils on the cell yield of *Eisenia andrei* earthworms exposed *in situ* for 28 days. Asterisk represents significant difference compared with controls (* $p < 0.05$).

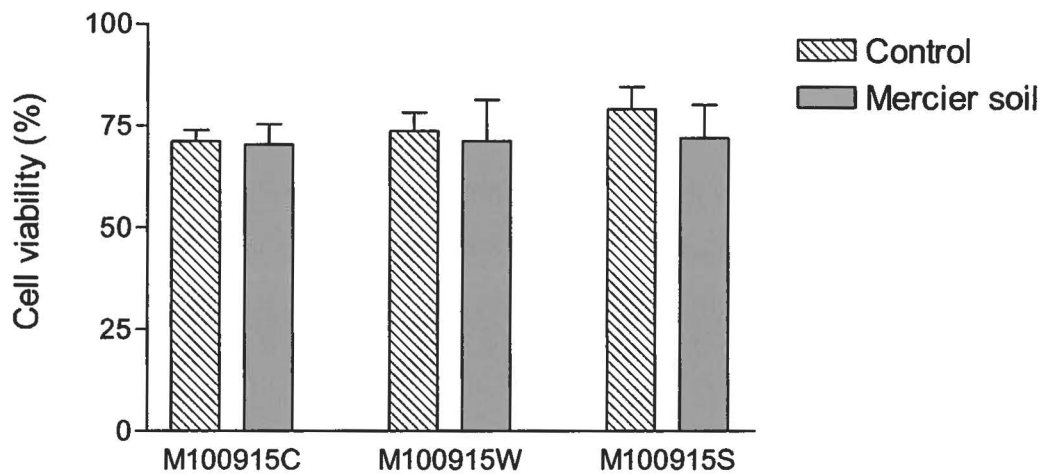


Figure 5: Effects of Mercier field soils on the viability of cœlomocytes of *Eisenia andrei* earthworms exposed *in situ* for 28 days.

3.4. Phagocytosis

The phagocytic activity was significantly ($p < 0.01$) induced in worms exposed to field soil at M100915W site, while it was significantly ($p < 0.05$) reduced in worms exposed to field soil at M100915S (Fig. 6). No effect was observed for M100915C site. The phagocytic efficiency was significantly ($p < 0.05$) induced in worms exposed to field soil at M100915W site, but no effects were noted for the other sites (Fig. 7).

3.5. Cell cycle

Using a flow cytometric approach (Fig.8), The DNA content in freshly collected cœlomocytes was compared to the human tumor cell line (K562) (Fig. 9). In this approach, DNA content may be directly proportional to PI fluorescence. Thus, Fig. 9 revealed that *E. andrei* cœlomocytes contain less DNA than K562, a tumor cell line of erythromyeloid origin which represents a continuously cycling cell.

The proportion of cells in the G0/G1, S and G2/M phases (Fig. 10) were compared between sites and showed that the cell cycle was affected in each site. The proportion of cells in G0/G1 increased significantly ($p < 0.001$) at M100915C in field soil compared to its control,

while it decreased significantly ($p < 0.01$) at M100915S in field soil too compared to its control. The phase S showed to be not affected by the exposure of worms to the different sites. The proportion of cells in G2/M decreased significantly ($p < 0.001$) at M100915C in field soil compared to its control, while no differences were shown at the other sites. Finally, the proportion of cells in apoptosis decreased significantly ($p < 0.01$) at M100915C in field soil compared to its control, but it increased significantly in field soils in both M100915W and M100915S sites.

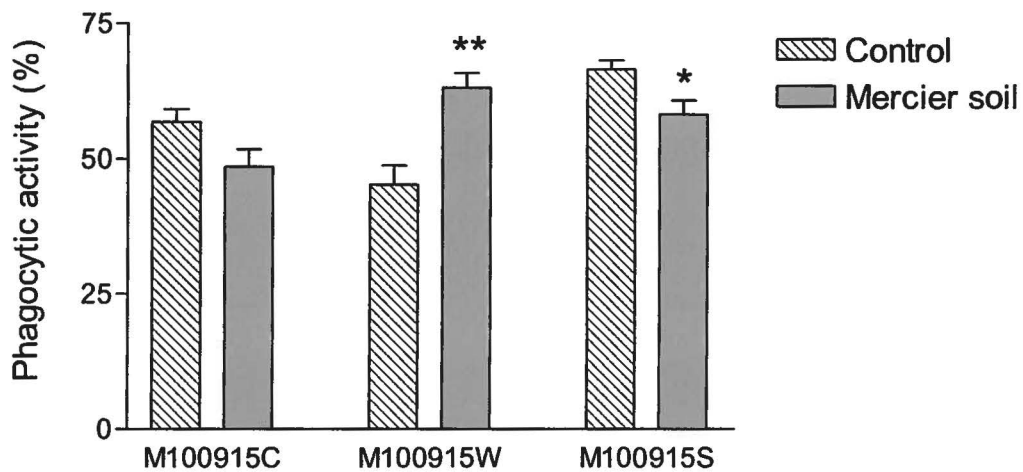


Figure 6: Effects of Mercier field soils on the phagocytic activity of cœlomocytes in *Eisenia andrei* earthworms exposed *in situ* for 28 days. Asterisk represents significant difference compared with controls (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

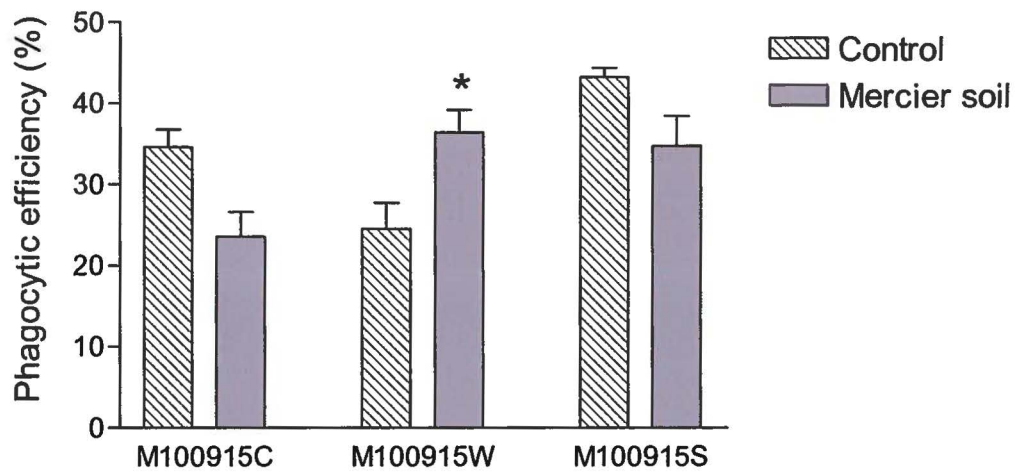


Figure 7: Effects of Mercier field soils on the phagocytic efficiency of cœlomocytes in *Eisenia andrei* earthworms exposed *in situ* for 28 days. Asterisk represents significant difference compared with controls (* $p < 0.05$).

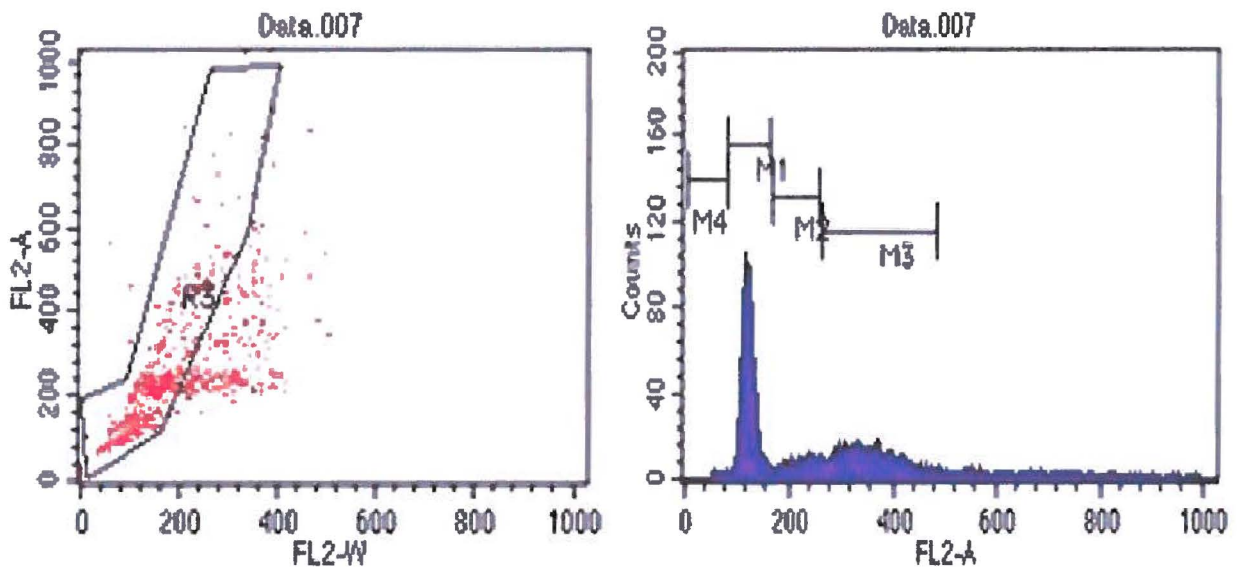


Figure 8: Cytograms of flow cytometric analysis of cell cycle. In the left: Dot plot representing the gate of cycling cells. In the right: the histogram used to quantitatively evaluate cell cycle distribution (the markers indicate the phase; M1: G0/G1, M2: S, M3: G2/M and M4: apoptosis)

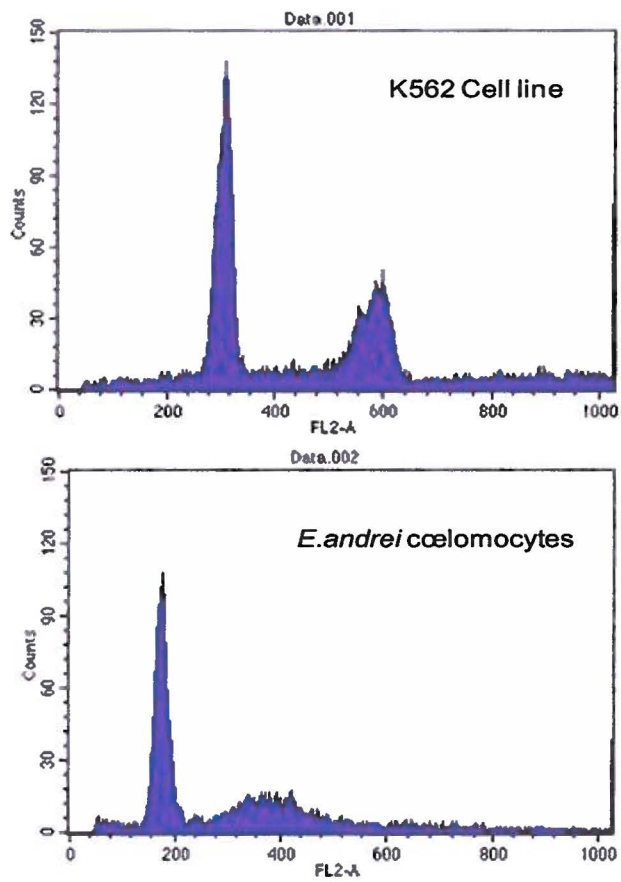


Figure 9: Comparison of DNA content in freshly collected cœlomocytes to the human tumor cell line, K562. *E. andrei* cœlomocytes contain less DNA than K562.

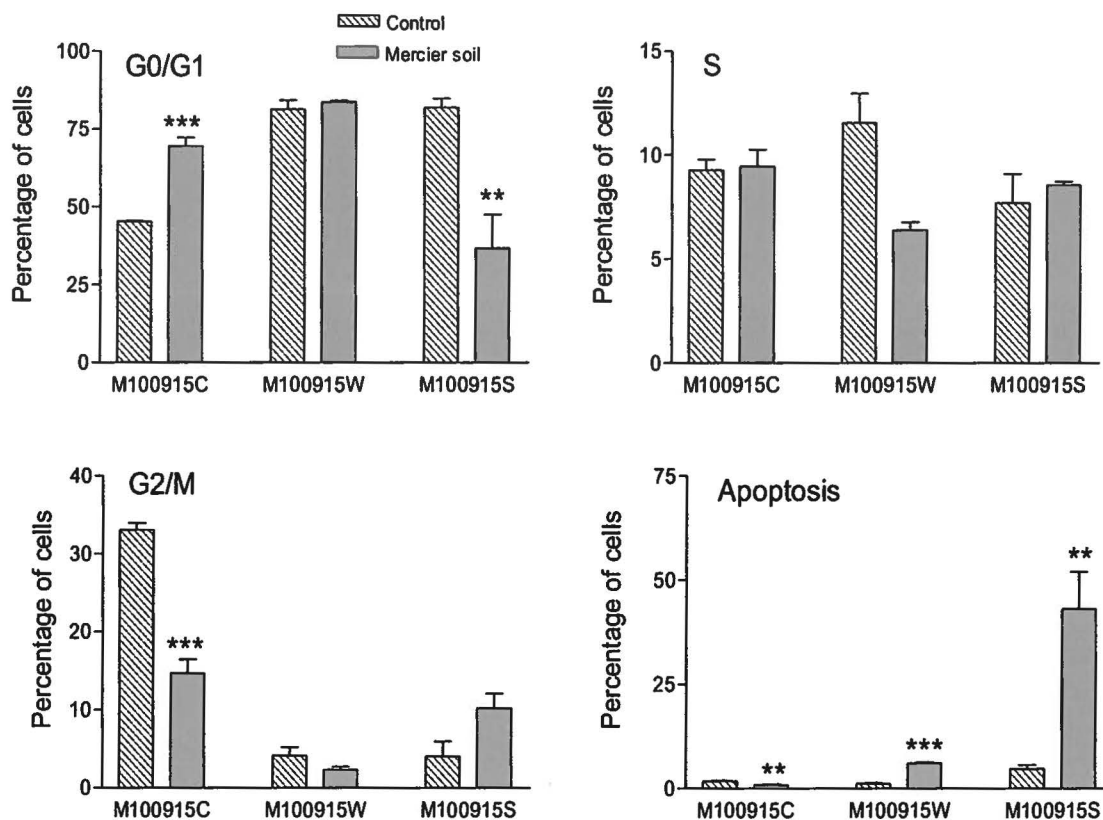


Figure 10: Flow cytometric analysis of cell cycle and apoptosis in cœlomocytes of *E. andrei* earthworms exposed *in situ* for 28 days in Mercier field soils. Asterisk represents significant difference compared with controls (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

4. DISCUSSION

This study showed the effect of earthworm exposure to Mercier soils under field conditions (mesocosms studies) where toxicological endpoints; growth and survival were measured in combination with two biomarkers; phagocytosis and cell cycle. There was no previous study that reports the effects of terrestrial *in vivo* exposure to soils situated near the dangerous waste incinerator of Mercier and biomarker measurements under field conditions. The physical and chemical characteristics of selected sites were already measured in the first part of the ecotoxicological monitoring of Mercier soils. The first part concerned the tests under laboratory conditions. Thus, in the present study, just the pH and the moisture levels in

mesocosms after 28 days were measured (table 1). The levels found were in general comparable and were less to cause stress to the exposed worms.

Mesocosm studies showed that earthworms exposed to Mercier soils were affected as revealed by the percentage of mortalities (up to 50%) noted in all soils tested including the field soils and controls (Fig. 2). Also, as indicated by the negative growth rate (Fig. 3), the worms at M100915W and M100915S sites lost weight. The general tendency of the results showed that the decrease in weight was soil quality and time dependent. For the soil quality, a previous quantitative analysis of 15 metals and PCDD/Fs has confirmed that these two soils were contaminated by range of metals (Cd, Pb, Hg, Cr, Cu, and Zn) but at concentrations below than the Canadian recommendation of soil quality. It was also demonstrated that OCDD dominate in the total concentration of PCDD/Fs in these two sites. So being a conservative matrix, soil can act as natural sink for the long-term accumulation of PCDD/Fs. In other studies, mesocosms were installed for a period varying between 10 (Robidoux *et al.*, 2004) to 12 days (Hankard *et al.*, 2004) while in our study, the worms were exposed in the mesocosms for 28 days which may be a long time for worms to support the environmental fluctuations in limited area (bag).

In the biomarker measurements, we first evaluated the extruded cell yield of worms and the cell viability. Cœlomocyte cell yield, quantified using a light microscope, showed significant low level at M100915W field soil compared to control (Fig. 4). Numerous studies have demonstrated the relationship between cell yield and worm weight and proved that cell yield is a linear function of body weight (Sauvé and Fournier, 2005). Effectively, Earthworms exposed to M100915W field soil have a lower biomass after 28 days-exposure and the lower cell yield, too. The viability of extruded cœlomocytes seems to be not affected by the PCDD/Fs concentrations (Fig. 5). This indicated that the adverse effects noted were not the result of decreased cell viability.

The measurement of the phagocytic response of earthworm's cœlomocytes indicated that the exposure to M100915W site stimulated the phagocytic activity (Fig. 6) and efficiency (Fig. 7). However the worm's exposure to M100915S site inhibited the phagocytic activity and no effects were observed on the efficiency. A suppression of an immune function may

have adverse effects on the survival of organisms. This deficiency in immune functions is considered as a sign of toxic effects of environmental pollutants (Fournier *et al.*, 2000).

The cell cycle is composed of four distinct phases: G1 phase, S phase (synthesis), G2 phase (interphase) and M phase (mitosis) and when cells have temporarily or reversibly stopped dividing they have entered a state of quiescence called G0 phase (Frouin *et al.*, 2010). Our results revealed that a higher number of cells were found in the G0/G1 phase and cell percentage in S and G2/M phases was reduced. Also, the cell cycle distribution data demonstrated that it was affected at all the studied sites (Fig. 10).

In summary, the present *in situ* study came in support to a previous laboratory study and confirmed the presence of contamination in Mercier soils located in the vicinity of the dangerous waste incinerator.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was conducted in the environmental immunotoxicology laboratory at Institut Armand Frappier (INRS-IAF). The financial support has been provided by the Canada Research Chair in Environmental Immunotoxicology (Dr. Michel Fournier). The authors are thankful to Mr Pierre Lapalme and Ms Nadjat Benchalgo for their precious help in soil sampling and to Marlene Fortier and also appreciate her excellent technical assistance. We wish to thank Dr Pierre Yves Robidoux (CNRC-IRB) for earthworm's donations.

REFERENCES

- Brousseau, P., N. Fugère, et al. (1997). "Evaluation of earthworm exposure to contaminated soil by cytometric assay of coelomocytes phagocytosis in *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta)." *Soil Biol Biochem* **29**(3-4): 681-684.
- Brousseau, P., Payette, Y., Tryphonas, H., Blakley, B., Boernaus, H., Flipo, D., Fournier, M., 1999. *Manual of Immunological Methods*. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Bureau d'Audiences Publiques sur l'environnement du Québec (BAPE), 1994. *Restauration du lieu contaminé de Mercier*. Montréal, BAPE, 222 p.
- Colborn, Théo, Dumanoski, Dianne and John Peterson Myers, *Our Stolen Future*, A Dutton Book, New-York, 1996, 306 p.
- Fournier M, Cyr D, Blakley B, Boermans H and Brousseau P, (2000). Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xénobiotics. *Amer Zool* **40**:412-420.
- Frouin, H., M. Fortier, M. Fournier (2010). "Toxic effects of various pollutants in 11B7501 lymphoma B cell line from harbour seal (*Phoca vitulina*)." *Toxicology* **270**(2-3): 66-76.
- Gareau Priscilla avec la collaboration de Maude Laberge et Daniel Green sous la direction de Louise Vandelac "Diagnostic Écosanté Mercier". Rapport préliminaire présenté au comité de vigilance environnementale régionale (CVER). UQAM Avril 2005.
- Hankard, P. K., C. Svendsen, et al. (2004). "Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis." *Sci Tot Environ* **330**(1-3): 9-20.
- Laberge, Maude, « La saga de la catastrophe écologique de la région de ville Mercier : une analyse socio-historique de 38 ans d'interventions écocitoyennes pour limiter et contrer les impacts en cascades des déversements autorisés de déchets industriels toxiques en 1968 ». Mémoire de maîtrise, Institut des Sciences de l'environnement, 2007
- Lukkari T., Aatsinki M., Väisänen A and Haimi J, (2005). Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworms tests. *Appl soil Ecol* **30**, 133-146.
- Massicotte, R., P. Y. Robidoux, et al. (2003). "Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory." *J Environ Monit* **5**(5): 774-779.

- Meneses M, Llobet J. M, Granero S, Schuhmacher M, Domingo J. L (1999). Monitoring metals in the vicinity of a municipal waste incinerator: temporal variation in soils and vegetation. *Science Total Environ* 226, 157-164.
- Organization for Economic Cooperation and development (OECD) (1993). Earthworms, acute toxicity tests. Guideline of the OECD for testing Chemical Products. Paris, France.
- Quaglino, D., E. L. Cooper, et al. (1996). "Earthworm coelomocytes in vitro: Cellular features and 'granuloma' formation during cytotoxic activity against the mammalian tumor cell target K562." *Eur J Cell Biol* 70(3): 278-288.
- Radetski C.M, Ferrari B, Cotelle S, Masfaraud J-F, Ferard J. F (2004). Evaluation of genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Sci Total Environ* 333, 209-216.
- Robidoux P.Y, Dubois C, Hawari J, Thiboutot S and Sunahara G.I, 2004a. Assessment of soil toxicity and antitank firing range using *Lumbricus terrestris* and *Eisenia Andrei* in mesocosms and laboratory studies, *Ecotoxicology*, 13, 603-614.
- Robidoux P.Y, Gong P., Sarrazin M., Bardai G., Paquet L., Hawari J, Dubois C, and Sunahara G.I, 2004b. Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range, *Ecotoxicol Environ Saf*, 58, 300-313.
- Robidoux P.Y, Hawari J, Thiboutot S, Ampleman G and Sunahara G.I, 1999, Acute toxicity of 2, 4, 6- trinitrotoluene in earthworm (*Eisenia Andrei*). *Ecotoxicol Environ Saf*, 44, 311-321.
- Robidoux P.Y, Hawari J, Thiboutot S, Ampleman G and Sunahara G.I, 2001, chronic toxicity of octanhydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tétrazocine (HMX) in soil determining using the earthworm (*Eisenia Andrei*) reproduction test. *Environ Pollut*, 111, 283-292.
- Robidoux P.Y, Svendsen C, Caumartin J, Hawari J, Ampleman G, Thiboutot S, Weeks J.M and Sunahara G.I, 2000, chronic toxicity of energetic compounds in soil using the earthworm (*Eisenia Andrei*) reproduction test. *Environ Toxicol Chem*, 19, 1764-1773.
- Sauvé S and Fournier M, (2005). Age-specific immunocompétence of the earthworm *Eisenia Andrei* exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol Environ Saf*, 60:67-72.
- Sauvé S, Hendaoui M, Brousseau P and Fournier M (2002). Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in Vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicol Environ Saf*, 52: 21-29.
- Vandelac, Louise 2006, Projet de recherche Diagnostic Écosanté Mercier, Phase 3, présenté au MDEIE, juillet 2006.

Vandelac, Louise et Marie-Hélène Bacon «Perturbateurs endocriniens et polluants organiques persistants : inquiétante érosion de la santé, de la fertilité et des capacités intellectuelles, » pp.237-267. *Ruptures*, Revue interdisciplinaire en santé, Vol. 6, No 2. Département de médecine, Université de Montréal. Déc.1999.

Xu, M.-x., J.-h. Yan, et al. (2008). "Source identification of PCDD/Fs in agricultural soils near to a Chinese MSWI plant through isomer-specific data analysis." *Chemosphere* 71(6): 1144-1155.

4.4. SYNTHÈSE

Le suivi écotoxicologique des sols de Mercier au laboratoire pour les périodes 2008 et 2009 a révélé une diminution significative de la survie des vers, de la croissance et des paramètres de reproduction soit une diminution du nombre de cocons et de juvéniles, dans les sites situés sous le panache de l'incinérateur. Il a été démontré aussi que les vers exposés à ces sols avaient accumulé des taux élevés de Zn et de Cd. La mesure des biomarqueurs a montré également une diminution significative du temps de rétention du rouge neutre traduisant une fragilité de la membrane lysosomale. Par ailleurs, dans l'étude *in situ* (mésocosmes), il a été noté une mortalité des vers supérieure à 50% dans tous les sols se trouvant sous le panache de l'incinérateur, une perte de poids significative et une modulation du système immunitaire ont été aussi enregistrées. De plus, le cycle cellulaire des coelomocytes semblait être affecté chez les vers exposés à ces sols.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

En écotoxicologie, l'évaluation de la toxicité aiguë ou chronique des polluants chimiques au laboratoire a pour but de prédire leurs effets dans l'environnement. Ainsi, notre premier objectif était axé sur l'identification et l'évaluation des effets immunotoxiques d'un mélange de PCDD/F en laboratoire via des tests *in vitro* et *in vivo*, afin de prédire et d'évaluer ces effets sur l'activité biologique des vers de terre dans leur environnement naturel (sol). Dans notre cas, il s'agit des sols se trouvant aux alentours et plus particulièrement sous le panache de l'incinérateur de déchets dangereux de Mercier. Les résultats obtenus dans ce premier thème ont montré que les PCDD/F modulent la réponse immunitaire chez les vers de terre *E. andrei*. En effet, les résultats des tests *in vitro* ont mis en exergue qu'un mélange contenant 25×10^{-3} ng 2378-TCDD/ml, 25×10^{-3} ng 2378-TCDF/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 12378-PeCDD/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 12378-PeCDF/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 123678-HxCDD/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 123678-HxCDF/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 1234678-HpCDD/ml, $62,5 \times 10^{-3}$ ng 1234678-HpCDF/ml, 125×10^{-3} ng OCDD/ml et 125×10^{-3} ng OCDF/ml, stimule la phagocytose et l'activité des cellules NK-like des cœlomocytes, mais qu'un mélange deux fois plus concentré est cytotoxique. Par ailleurs, dans le premier test *in vivo* où les vers de terre étaient en contact avec un papier filtre contaminé, la première altération immunologique observée était la diminution significative de la cellularité. Cette perte de cellules immunitaires entraîne une réduction de la production de cytokines qui participent à la signalisation intercellulaire, en addition à leur implication dans la multiplication cellulaire, la différenciation et la survie des cellules. Ce déficit immunitaire peut alors avoir un impact sur tous les systèmes physiologiques du ver de terre. Dans ce même test, il a été observé une inhibition significative de l'activité phagocytaire pour les trois plus fortes concentrations du mélange testées. En parallèle, dans le deuxième test *in vivo* où les vers de terre étaient en contact direct avec le sol contaminé par les dioxines, il en découle des résultats très pertinents soit; une diminution significative de la croissance, de la cellularité, et de l'activité phagocytaire des cœlomocytes à une concentration du mélange contenant 1 ng 2378-TCDD/g sol. Cependant, une stimulation de l'activité des cellules NK a été observée pour une plus faible concentration du mélange (contenant 0,1 ng 2378-TCDD/g sol). À partir de ces résultats, il ressort que l'inhibition de l'activité phagocytaire des cellules immunitaires des vers de terre reflète un effet immunosuppresseur des dioxines. En général, tel que défini dans la littérature, les propriétés

immunosuppressives se traduisent par une diminution de la résistance vis-à-vis des infections bactériennes et virales (Fournier *et al.*, 2000). De même, la stimulation de l'activité des cellules NK-like observée est une manifestation immunotoxique. Le ver de terre comme tout autre organisme possède une balance entre l'immunité cellulaire et humorale. Par exemple, si l'immunité cellulaire est diminuée par une substance immunotoxique, l'hôte augmente la réponse immunitaire humorale afin de compenser cette suppression. Cette augmentation se manifeste en général par une synthèse et sécrétion des cytokines par des cellules spécifiques telles que les cellules NK. Donc, toute altération d'une fonction immunitaire ou du nombre de cellules peut induire une production anormale de cytokines ce qui causera une dérégulation du système immunitaire et par conséquent pourra provoquer des maladies auto-immunes systémiques ou spécifiques d'organes. Cela peut également provoquer l'anergie et le cancer (Descotes *et al.*, 2000, Frouin *et al.*, 2008). Il est important de noter ici que les expositions *in vivo* des vers de terre *E. andrei* aux dioxines, ont démontré que la réponse de ces derniers n'est pas dépendante de la dose. Ceci peut être lié au phénomène d'hormèse et/ou à une variation de la vitesse d'absorption et de rétention des dioxines par les vers exposés.

Un autre volet qui s'est ajouté aux tests *in vivo* était l'évaluation de la biodisponibilité des PCDD/F. Les résultats indiquent que l'atténuation ou la vitesse de dégradation est plus rapide pour les sols moins contaminés par les dioxines ce qui est prouvé par la faible quantité de résidus trouvés, après 28 jours, dans les sols contaminés par de faibles concentrations de PCDD/F comparés à ceux fortement contaminés.

Notre deuxième objectif dans ce projet visait une investigation chimique et biologique du statut des sols aux alentours de l'incinérateur de déchets dangereux de Mercier. La caractérisation chimique des sols a montré que les sols contenaient une large gamme de métaux (Cd, Pb, Hg, Cr, Cu et Zn) et de congénères de PCDD/F dont les teneurs n'excédaient pas les recommandations canadiennes pour la qualité des sols. Cependant, ceci n'exclue pas leur effet toxique sur la faune terrestre sachant que le sol est une matrice très complexe et tous les composants chimiques interagissent entre eux. De plus, les phénomènes d'absorption par les organismes vivants dans les sols et leur mobilité, la complexation et même l'érosion des sols, contribuent à la variation des teneurs en dioxines dans les sols. La quantification des

dioxines a été réalisée seulement dans trois sols de Mercier et a permis de tracer pour la première fois des profils dans les sols de la région avoisinant l'incinérateur. Les profils obtenus pour les congénères et les homologues ont montré que l'OCDD et le PeCDF sont les plus importants contributeurs dans la concentration totale des PCDD/F dans les sols. Nos résultats corroborent très bien les résultats de plusieurs études de monitoring réalisées aux alentours des incinérateurs, pour lesquelles des profils semblables ont été obtenus (Floret *et al.*, 2007; Andersson and Ottesen, 2008; Xu *et al.*, 2009). La présence de ces composés a été lié surtout aux procédés de combustion des déchets, la volatilité des congénères et leur mode de dépôt; sec ou humide. Il est bien connu que les molécules lourdes se déposent et que, par contre, les plus légères se volatilisent; c'est le cas des TCDD dont de nombreux travaux ont montré que ces molécules peuvent se retrouver à des centaines de kilomètres par rapport à la source. Ceci est associé surtout à leurs pression de vapeur (1×10^{-6} - $1,5 \times 10^{-7}$ Pa) et leur coefficient de diffusion dans l'air ($3,6 \pm 0,08$ cm²/s) élevés, ainsi qu'à d'autres propriétés physico-chimiques.

L'exposition des vers de terre sous les conditions contrôlées de laboratoire a mis en évidence que les sols se trouvant sous le panache de l'incinérateur ont provoqué une diminution significative de la survie, de la croissance et des paramètres de reproduction (cocons et juvéniles), après 28 jours d'exposition. De même, l'étude *in situ* a permis de constater et de confirmer les mêmes réponses. En effet, il a été observé des mortalités allant de 50 à 80% chez les vers exposés dans les mésocosmes installés sous le panache. De plus, l'évaluation de la croissance chez les vers restants dans ces mêmes mésocosmes annonçait une perte significative de poids. Ces expériences ont également permis de démontrer que ces sols ont des effets sub-létaux évalués par la mesure de biomarqueurs soit; l'intégrité de la membrane lysosomiale en mesurant le temps de rétention du rouge neutre (TRRN), l'activité phagocytaire et le cycle cellulaire des cœlomocytes. Les résultats ont révélé une diminution du TRRN traduisant une fragilité de la membrane lysosomiale. Cette réponse confirme que, dans les cœlomocytes des *E. andrei* exposés, les lysosomes étaient la cible subcellulaire de l'action des métaux lourds et des polluants organiques (ex. : PCDD/F) présents dans les sols. Plusieurs études ont démontré une corrélation linéaire entre le TRRN et les concentrations de métaux lourds (ex. : Cu, Pb) dans les sols ainsi que de certains contaminants organiques

(ex. : pesticides, PAH). D'autre part, nos expériences de terrain ont mis en évidence une modulation (stimulation ou inhibition) de la réponse phagocytaire qui reflète une diminution de la performance du système immunitaire. Par ailleurs, une perturbation du cycle cellulaire des cœlomocytes chez les vers exposés sous le panache a été observée. En général, en cas d'altération d'ADN interviennent des enzymes de réparation et un système de contrôle régulant le cycle cellulaire (Kouassi *et al.*, 2003). Cependant, nos résultats démontrent la défaillance de ce système de contrôle et d'une réparation incomplète qui a conduit à la perturbation du cycle et même à la mort cellulaire par apoptose surtout dans le site de St-Isidore située sous le panache.

Les réponses que nous avons observées sont causées certainement, en partie, par les substances chimiques organiques et inorganiques trouvées dans ces sols et en partie par d'autres éléments non déterminées. Par contre, en dépit des faibles teneurs mesurées dans les sols, la fraction bioaccumulée dans les tissus des vers de terre peut contribuer de manière remarquable à ces effets observables. En effet, l'analyse des résidus de métaux dans les vers exposés 28 jours aux sols de Mercier sous les conditions contrôlées de laboratoire a permis de déterminer le facteur de bioaccumulation de chaque métal calculé par rapport à sa concentration dans le sol. Les résultats ont révélé des valeurs élevées pour le Cd et le Zn dans tous les sols en particulier ceux situés sous le panache, ce qui explique les perturbations sur les paramètres biologiques observées. Toutefois, le mélange complexe de contaminants organiques et inorganiques présents dans les sols de Mercier ne permet pas d'attribuer le potentiel toxique de ces sols à une classe de contaminants. Cependant, on peut conclure que les réponses observées sont la combinaison des effets individuels toxiques de chaque contaminant, mesuré ou non, présent dans ces sols. De plus, basés sur nos résultats de l'immunotoxicité des dioxines et sur d'autres résultats d'immunotoxicité des métaux lourds chez les vers de terre, il ressort que le système immunitaire du ver de terre peut être affaibli suite à l'exposition permanente aux polluants retrouvés dans son environnement. Il pourrait donc être moins en mesure de se défendre, en présence d'un pathogène par exemple. En effet, certains métaux lourds (Cd, Hg, Pb) possèdent des propriétés immunosuppressives qui proviennent en partie de leurs effets cytotoxiques, par induction d'apoptose ou de nécrose dans les cellules du système immunitaire, entraînant ainsi une diminution de la résistance aux

infections (kouassi *et al.*, 2003; Fournier *et al.*, 2000). Ce déficit pourrait avoir un impact négatif sur d'autres systèmes physiologiques ce qui expliquerait l'atteinte à la performance de l'activité biologique observée sur nos vers de terre.

Enfin une question importante s'impose quant à la provenance des PCDD/F et des métaux et l'implication de l'incinérateur. Il est important de rappeler ici que la région d'étude est une zone agricole, donc il est difficile de discriminer la contribution des engrais et des pesticides. Cependant, afin de minimiser cette contribution et la variabilité dans nos résultats, nous avons ciblé des sites non cultivés soient; des boisés et les bordures non cultivées des champs cultivés, car il a été déjà démontré que les caractéristiques chimiques des parties cultivées et non-cultivées des champs sont significativement différents (Chabot et Simard, 1997). Les résultats observés sous le panache démontrent donc l'implication des émissions de l'incinérateur. De plus, il est bien connu que les PCDD/F peuvent pénétrer accidentellement dans l'environnement et donc dans les sols suite aux émissions des procédés de combustion. Gardant à l'esprit que la seule activité humaine industrielle avoisinant ces sols dans un rayon de 2 à 5 km étant l'incinérateur où est effectuée la combustion de déchets dangereux de différentes natures et provenances, il est très probable que la majorité de la pollution aux PCDD/F observée soit due à la présence de cet incinérateur.

Dans le futur, étant donnée que les produits agricoles sont considérés comme l'une des sources majeures de transfert de contaminants vers l'être humain, par le biais surtout des gras animaux, une perspective de ce travail est de pouvoir évaluer la contamination de certaines cultures destinées à l'alimentation animale (maïs grain et soja) situées dans le panache de l'incinérateur de Mercier, et d'examiner également certains produits d'élevage (ex.: le lait). La disponibilité de telles données ainsi que les concentrations de dioxines en phases particulaire et gazeuse dans l'air permettront la modélisation de la vitesse de déposition totale des PCDD/F sur les sols avoisinant l'incinérateur, en fonction des caractères spécifiques du site de Mercier. Parmi les modèles les plus utilisés dans les études d'évaluation de risques et d'estimation d'une exposition aux polluants est celui développé par USEPA (1999). Dans ce modèle, la vitesse de déposition totale D_s est calculée par l'équation suivante;

$$D_s = \frac{C_s \cdot K_s \cdot Z_s \cdot BD}{1 - \exp(-k_s \cdot T_c)}$$

Où, D_s est la vitesse de déposition totale de dioxines ($\text{pg/m}^2 \cdot \text{an}$), C_s est la concentration dans le sol (pg/kg), k_s (an^{-1}) est la constante de perte dans le sol due à tous les processus (ex. : érosion, irrigation), Z_s est la profondeur (m), BD est la densité du sol (kg/m^3) et T_c est le temps de déposition (an). L'évaluation de ces paramètres permettra l'estimation de la quantité totale de dioxines déposée dans le sol avoisinant l'incinérateur pendant 40 ans d'incinération, sachant que au moins 2% de la quantité de PCDD/F émise par les incinérateurs se retrouve dans le sol (Lorber *et al.*, 1998). Ceci nous laisse conclure que 98% de ces substances toxiques continuent à se disperser dans l'environnement. Toutefois, en se basant sur les rapports historiques de l'incinérateur Clean Harbors, Inc., une quantité totale de 1,46 g TEQ a été rejetée entre 2002 et 2010 (INRP, 2011), d'où, une extrapolation des résultats de Lorber *et al.* (1998) sur l'incinérateur de Columbus (Ohio, USA) à l'incinérateur de Mercier, nous permet de déduire qu'une quantité de 29,2 mg TEQ (2% de la quantité totale) se trouve dans les sols avoisinant l'incinérateur de Mercier et que 1430,8 mg TEQ (98%) se dispersent dans l'environnement depuis 2002.

Dans un contexte d'évaluation de risque, il serait aussi important de tracer des profils de concentrations de PCDD/F et de métaux lourds dans les sols du site en fonction de la distance par rapport à l'incinérateur de déchets dangereux de Mercier.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott J, Baker S, et al. (1997). A study of dioxins and trace metals in soil around four municipal waste incinerators in Hampshire. Part 1: PCDD and PCDFs. Culham, UK: Environment agency.
- Ahmed Y.M, Ismail S.M, Shoukry A., (1991). An assessment of diflubenzuron to earthworms. 4th National Congress on Pests and diseases of Vegetables and fruits in Egypt; Ismailia, Egypt, p 341-351.
- Alaluusua S, Caldera P, Gertoux P.M, et al., (2004). Developmental dental aberrations after the dioxin accident in Seveso. *Environ Health Perspect*; 112 : 1313-1318.
- Allsopp Michelle, Costner Pat et Johnston Paul. ``Santé et incinération, état des connaissances sur les impacts de l'incinération des déchets sur la santé humaine``. Greenpeace, 2001. En ligne. http://www.greenpeace.fr/campagnes/toxiques/dossiers/incineration_et_santé.pdf.
- Andersson, M. and R. T. Ottesen (2008). "Levels of dioxins and furans in urban surface soil in Trondheim, Norway." *Environ Pollut* 152 (3): 553-558.
- ATSDR (Agency for toxic substances and disease registry), Toxicological profile for chlorinated dibenzo-p-dioxins, US department of health and human services, public health service, December 1998.
- ATSDR (Agency for Toxic substances and disease registry). Dioxins, march 2006. Division of toxicology and environmental medicine (DTEM).<http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts104.html>.
- Baars A.J., Theelen R.M.C, Janssen P.J.C.M, Hesse J.M, Van Apeldoorn M.E, Meijerink M.C.M, Verdán L and Zeilmaker M.J, (2001). Re-evaluation of human toxicological maximum permissible risk levels. RIVM, Rijksinstituut Voor Volksgezondheid en Milieu. Report 711 701 025.
- Berghout A, Buld, J, Wenzel, E (1990). The cytochrome P-450-dependent monooxygenase system of the midgut of the earthworm *Lumbricus terrestris*. *Eur. J. Pharmacol.* 183: 1885-1886.
- Bilej M., Prochazkova P., Silverova M., and Joskova R. (2010). Earthworm immunity. In : Kenneth Soderhall (2010). *Invertebrate immunity*. Springer Science+Business Media, v.708, pp. 66-79.
- Billings R.J, Berkowitz R, Watson G. Teeth. *Pediatrics*, 2004; 113 : 1120-1127.
- Bodénan F, et Garrido F (2005). Devenir des dioxines dans les sols-Analyse critique de données bibliographiques (rapport final). BRGM/RP-53070-FR

- Boiledieu D, and Valembois P (1977). Natural cytotoxicity activity of sipunculid leucocytes on allogeneic and xenogenic erythrocytes. *Dev Comp Immunol*, 1: 207-216.
- Bouché M.B, Earthworm species and ecotoxicological studies (1972) in: Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ and Heimbach (eds). *Ecotoxicology of earthworms*, intercept Press, Andover, 1992.
- Bouwman H, Reinecke A.J., (1987). Effects of carbofuran on the earthworm, *Eisenia fetida* using a defined medium. *Bull Environ Contam Toxicol*, 38 :171-178.
- Braune, B. M. and M. Simon, (2003). "Dioxins, Furans, and Non-Ortho PCBs in Canadian Arctic Seabirds." *Environmental Science & Technology* 37 (14): 3071-3077.
- 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.
- Bu, Y. Q., Y. M. Luo, et al., (2010). "Effect of dioxin-like PCBs on physiological activities of earthworms (*Eisenia fetida*)." *Zhongguo Huanjing Kexue/China Environ Sci* 30 (5): 699-704.
- Bureau d'Audiences Publiques sur l'environnement du Québec (BAPE), 1994. *Restauration du lieu contaminé de Mercier*. Montréal, BAPE, 222 p.
- Butler, R. A., Kelley, M. L., Powell, W. H., Hahn, M. E., Van Beneden, R. J., (2001). An aryl hydrocarbon receptor (AHR) homologue from the soft-shell clam, *Mya arenaria*: Evidence that invertebrate AHR homologues lack 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and beta-naphthoflavone binding. *Gene* 278, 223-234.
- Capuano F, Cavalchi B, Martinelli G, Pecchini G, Renna E, Scaroni I (2005). Environmental prospection for PCDD/PCDF, PAH, PCB and heavy metals around the incinerator power plant of Reggio Emilia town (Northern Italy) and surrounding main roads. *Chemosphere* 58:1563-1569. Doi:10.1016/j. Chemosphere 2004. 11.065.
- Caserini, S., S. Cernuschi, et al. (2004). "Air and soil dioxin levels at three sites in Italy in proximity to MSW incineration plants." *Chemosphere* 54(9): 1279-1287.
- Chabot, R. and Simard, R. R., *Impact environnemental des dépôts atmosphériques de la cimenterie de Joliette, Rapport Final pour le Comité de Suivi Environnemental des Activités Industrielles du Grand Joliette*, Ministère de l'Agriculture et Agroalimentaire du Canada, 1997, 48.
- Cheng P.S, Jsu M.S, Ma E, Chou U, Ling Y.C (2003). Levels of PCDD/Fs in ambient air and soil in the vicinity of a municipal solid waste incinerator in Hsinchu. *Chemosphere* 52: 1389-1396. Doi: 10.1016/S004506535(03)00474-0.

- Chiu, J. C., Y. H. Shen, et al. (2011) "Emissions of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans from an electric arc furnace, secondary aluminum smelter, crematory and joss paper incinerators." *Aerosol and Air Quality Research* 11(1): 13-20.
- Colborn, Théo, Dumanoski, Dianne and John Peterson Myers, *Our Stolen Future*, A Dutton Book, New-York, 1996, 306 p.
- Comité Européen de Normalisation, 1994, Directive du 16 décembre, Norme AFNOR. NF EN 1948.
- Cooper, E. L. and P. Roch (2003). "Earthworm immunity: a model of immune competence: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002." *Pedobiologia* 47 (5-6): 676-688.
- Cooper, E. L., E. Kauschke, et al. (2002). "Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff." *BioEssays* 24 (4): 319-333.
- Correia, F. V. and J. C. Moreira, (2010). "Effects of Glyphosate and 2,4-D on Earthworms (*Eisenia foetida*) in Laboratory Tests." *Bull Environ Contam Toxicol*, 1-5.
- Coutinho, M., M. Pereira, et al., (2007). "Monitoring of ambient air PCDD/F levels in Portugal." *Chemosphere* 67(9): 1715-1721.
- Coyle P, Philcox J.C, Carey L.C and Rofe A.M (2002). Metallothionein: the multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 59, 627-647.
- Dallinger R, (1996). Metallothionein research in terrestrial invertebrates: synopsis and perspectives. *Comp biochem physiol C: Pharmacology, toxicology and Endocrinology* 113, 125-133.
- Delistraty D, Stone A, (2007). Dioxins, metals and fish toxicity in ash residue from space heaters burning used motors oil. *Chemosphere* 68, 907-914.
- Descotes J, Choquet-Kastylevsky G., Van Ganse, E., Vial, T. (2000). Responses of the immune system to injury. *Toxicol Pathol* 28, 479-481.
- Dhainaut A and Scaps P (2001). "Immune defense and biological responses induced by toxics in Annelida." *Canad J Zool* 79 (2): 233-253.
- Domingo J.L, Bocio A, Nadal M, Schuhmacher M, Llobet J.M. (2002). Monitoring dioxins and furans in the vicinity of an old municipal waste incinerator after pronounced reductions of the atmospheric emissions. *J Environ Monit* 4(3):395-9.
- Dominguez J, Velando A et al., (2003). "Uniparental reproduction of *Eisenia fetida* and *E. andrei* (Oligochaeta: Lumbricidae): evidence of self-insemination: The 7th international

- symposium on earthworm ecology [middle dot] Cardiff [middle dot] Wales [middle dot] 2002." *Pedobiologia* **47** (5-6): 530-534.
- Dominguez, J., A. Velando, et al., (2005). "Are *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* (Oligochaeta, Lumbricidae) different biological species?" *Pedobiologia* **49** (1): 81-87.
- Edwards CA and Bohlen PJ, (1996). *Biology and ecology of earthworms*, Chapman and hall, London, 3, 426p.
- Elvira C, Dominguez J, Mato S., (1996). The growth of *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena rubida* in cow manure mixed cultures with *Eisenia andrei*, *Appl Soil Ecol* **5**, 97-103.
- Engelmann P, Kiss J, et al. (2004). "Earthworm leukocytes kill HeLa, HEP-2, PC-12 and PA317 cells in vitro." *J Biochem Bio Meth* **61**(1-2 SPEC. ISS.): 215-227.
- Environnement Canada, 2005. http://www.ec.gc.ca/ceqg-rcqe/français/html/gaag_dioxinesfuranessol_fr.cfm
- Fagervold S.K, Chai Y, et al., (2010). "Bioaccumulation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins/dibenzofurans in *E. fetida* from floodplain soils and the effect of activated carbon amendment." *Environ Sci Technol* **44**(14): 5546-5552.
- Fan Z, Casey F.X.M, et al., (2006). "Fate and transport of 1278-TCDD, 1378-TCDD, and 1478-TCDD in soil-water systems." *Sci Total Environ* **371**(1-3): 323-333.
- Fischer E, Molnar L., (1997). Growth and reproduction of *Eisenia fetida* (Oligochaeta Lumbricidae) in semi natural soil containing various metal chlorides, *soil Biol Biochem* **29** (3/4) 667-670.
- Floret N, Lucot E, et al. (2007). "A municipal solid waste incinerator as the single dominant point source of PCDD/Fs in an area of increased non-Hodgkin's lymphoma incidence." *Chemosphere* **68** (8): 1419-1426.
- Fournier M., Cyr D., Blakley B., Boermans H., Brousseau P. (2000). Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xénobiotics. *Amer Zool* **40**:412-420.
- Fournier M., Lalancette A., Ménard L., Christin-Piché M.S., De Guise S., Brousseau P., (2004). Biomarqueurs immunologiques appliqués à l'écotoxicologie. In Pelletier, E., Campbell, P.G.C., and Denizeau, F., 2004. *Écotoxicologie moléculaire; principes fondamentaux et perspectives de développement*. Presses de l'université de Québec, pp 401.

- Frew J.E and Jones P (1984), structure and functional properties of peroxidises and catalases. In Sykes AG (ed) *Advances in inorganic and bioinorganic mechanisms*, vol. 3. Academic Press, New York, pp 175-212.
- Frouin H., Lebeuf M., et al. (2008). "Toxic effects of tributyltin and its metabolites on harbour seal (*Phoca vitulina*) immune cells in vitro." *Aquat Toxicol* **90** (3): 243-251.
- Gareau Priscilla avec la collaboration de Maude Laberge et Daniel Green sous la direction de Louise Vandelac ``Diagnostic Écosanté Mercier''. Rapport préliminaire présenté au comité de vigilance environnementale régionale (CVER). UQAM Avril 2005.
- Goven A.J, Fitzpatrick L.C, Venables B.J (1993b). Chemical toxicity and host defense in earthworms-an invertebrate model. *Ann NY Acad Sci* **712**: 280-300.
- Goven A.J., Fitzpatrick L.C., et al. (1994). "Chemical toxicity and host defense in earthworms." *Ann NY Acad Sci* **712** (Primordial Immunity: Foundations for the Vertebrate Immune System): 280-300.
- Green N.J.L., Hassanin A., et al. (2003). "Observations on Historical, Contemporary, and Natural PCDD/Fs." *Environ Sci Technol* **38** (3): 715-723.
- Grochowalski A, Lassen C, Holtzer M, Sadowski M and Hudyma T (2007). Determination of PCDDs, PCDFs, PCBs and HCB emissions from the metallurgical sector in Poland. *Env Sci Pollut Res* **14** (5) 326-332.
- Habe H., Ide K., Yotsumoto M., Tsuji H., Yoshida T., Nojiri H., Omori T. (2002). Degradation characteristics of a dibenzofuran-degrader *Terrabacter* sp. Strain DBF63 toward chlorinated dioxins in soil. *Chemosphere*, **48**, 201-207.
- Habe H.J.S., Chung J.H.L., Kasuga K., Yoshida T., Nojiri H., Omori T. (2001). Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins by two types of bacteria having angular dioxygenases with different features. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3610-3617.
- Hagenmaier H., J. She, et al. (1992). "Persistence of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans in contaminated soil at Maulach and Rastatt in Southwest Germany." *Chemosphere* **25** (7-10): 1449-1456.
- Haimi J. and S. Paavola (1998). "Responses of two earthworm populations with different exposure histories to chlorophenol contamination." *Environ Toxicol Chem* **17** (6): 1114-1117.
- Hay A. *Nature* 1979, vol. 278, n°5700, 108-109.

- Holmstrup M., Bindesbøl A.M., et al. (2010) "Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review." *Sci Total Environ* **408** (18): 3746-3762.
- Holtta P, Kiviranta H, Leppaniemi A, et al. (2001). Developmental dental defects in children who reside by a river polluted by dioxins and furans. *Arch Environ Health* **56**, 522-528.
- Honsi T.G, Stenersen J, (2000). Activity and localisation of the lysosomal marker enzymes acid phosphatase, N-acetyl- β - Δ -glucosaminidase, and β -galactosidase in the earthworms *Eisenia fetida* and *E. Veneta*, *Comparative Biochemistry and physiology, part B: Biochem mol Biol* **125** (3), 429-437.
- 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**, 586-591.
- Hyun-Tae J, Yong-Chil S, Ki-Heon K. (2007). Distribution of dioxins, furans and dioxin-like PCBs in solid products generated by pyrolysis and melting of automobile shredder residues. *Chemosphere* **68**, 1636-1641.
- IARC (international agency for research on Cancer), polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans, vol.69, monograph 1997.
- INRP (Inventaire National des Rejets de Polluants) (http://www.ec.gc.ca/pdb/websol/querysite/facility_history_f.cfm?opt_npri_id=0000005449&opt_report_year=2011, consulté décembre 2011.
- ISO 11268-2, 1998, soil quality- effects of pollutants on earthworms *Eisenia fetida*
- ISO, soil quality- effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*)-part1: determination of acute toxicity using artificialsoil substrate, ISO11268-1, International standards organisation, Geneva, 1993.
- Katsoyiannis A., Gioia R., et al. (2010). "Continuous monitoring of PCDD/Fs in the UK atmosphere: 1991-2008." *Environ Sci and Technol* **44** (15): 5735-5740.
- Kauschke E., Mohrig W., et al. (2007). "Coelomic fluid proteins as basic components of innate immunity in earthworms." *Eur J Soil Biol* **43** (Supplement 1): S110-S115.
- Kim K.S, Shin S.K, et al. (2008). "National monitoring of PCDD/DFs in environmental media around incinerators in Korea." *Environ Int* **34**(2): 202-209.

- Kim K.S, Shin S.K, Song B.J, Kim J.G (2008). National monitoring of PCDD/DFs in environmental media around incinerators in Korea. *Environ Int* 34(2):202-9.
- Klaassen C.D, Liu J and Choudhuri S (1999). Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 39, 267-294.
- Koller L.D (1993). Biomarkers of immunotoxicology. In : Travis CC (ed) Use of biomarkers in assessing health and environmental impact of chemical pollution. Plenum Press, New York, pp 201-207.
- Komiyama, K., M. Okaue, et al. (2003). "Non-specific cellular function of *Eisenia fetida* regulated by polycyclic aromatic hydrocarbons: The 7th international symposium on earthworm ecology · Cardiff · Wales · 2002." *Pedobiologia* 47 (5-6): 717-723.
- Koopman-Esseboom C, Morse D.C, Weiglas-Kuperus N, Lutkeschipholt I.J, Van der Paauw C.G, Tuinstra L.G, Brouwer A, Sauer P.J, (1994). Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls on thyroid hormone status of pregnant women and their infants. *Pediatr. Res.* 36, 468-473.
- Kouassi É, Revillard J-P, Fournier M, Ayotte P, Roy R, Brousseau P, Hadji L (2003). Système immunitaire. In: Environnement et santé publique-Fondements et pratiques, pp. 687-698. Gérin M, Gosselin P, Cordier S, Viau C, Quénel P, Dewailly É, rédacteurs. Edisem/Tec & Doc, Acton Vale /Paris
- Laberge, Maude, « La saga de la catastrophe écologique de la région de ville Mercier :une analyse socio-historique de 38 ans d'interventions écocitoyennes pour limiter et contrer les impacts en cascades des déversements autorisés de déchets industriels toxiques en 1968 ». Mémoire de maîtrise, Institut des Sciences de l'environnement, UQAM, 2007.
- Labrot F, Ribera D, Saint Denis M and Narbonne J.F (1996). In vitro and in vivo studies of potential biomarkers of lead and uranium contamination: lipid peroxidation, cholinesterase, catalase and glutathione peroxidase. *Biomarkers* 1:21-28.
- Langdon C.J, Pearce T.G, et al. (2001). "Resistance to copper toxicity in populations of the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrodrilus rubidus* from contaminated mine wastes." *Environ Toxicol Chem* 20 (10): 2336-2341.
- Lee K.E., 1985. Earthworms-their ecology and relationships with soils and land use, Academic Press, Orlando, 411p.
- Levin, M., B. Morsey, et al. (2005). "PCBs and TCDD, alone and in mixtures, modulate marine mammal but not B6C3F1 mouse leukocyte phagocytosis." *J Toxicol Environ Health - Part A* 68(8): 635-656.

- Levin, M., H. Leibrecht, et al. (2007). "Immunomodulatory effects of organochlorine mixtures upon in vitro exposure of peripheral blood leukocytes differ between free-ranging and captive southern sea otters (*Enhydra lutris*)." *Vet Immunol Immunopathol* **119**(3-4): 269-277.
- Li Y, Tang H, Wang X, et al. (2011). Response of cytochrome P450 in earthworms exposed to arsanilic acid contaminated soils. ICBBE. Article number 5781383.
- Li Y, Wang X, Qiu J (2011). Effect of oxytetracycline on two enzymes in CYP450 subfamily in earthworm. ICBBE. Article number 5781401.
- Liu, Y., Q. Zhou, et al. (2010). "Oxidative stress and DNA damage in the earthworm *Eisenia fetida* induced by toluene, ethylbenzene and xylene." *Ecotoxicology*, 1-9.
- Lorber M, Pinsky P, Gehring P, Braverman C, Winters D, Sovocool W (1998). Relationships between dioxins in soil, air, ash, and emissions from a municipal solid waste incinerator emitting large amounts of dioxins. *Chemosphere* **37**(9-12):2173-97.
- Lowe C. N. and Butt K.R. (2007). "Earthworm culture, maintenance and species selection in chronic ecotoxicological studies: A critical review." *Eur J Soil Biol* **43** (Supplement 1): S281-S288.
- Lukkari T., Aatsinki M., Väisänen A and Haimi J, (2005). Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworms tests. *Appl Soil Ecol*, **30**, 133-146.
- Massicotte R., Robidoux P.Y, et al. (2003). "Immune response of earthworms (*Lumbricus terrestris*, *Eisenia andrei* and *Aporrectodea tuberculata*) following in situ soil exposure to atmospheric deposition from a cement factory." *J Environ Monit* **5** (5): 774-779.
- Mato Y, Suzuki N, Katatani N, Kadokami K, Nakano T, Nakayama S, Sekii H, Komoto S, Miyake S, Morita M. (2007). Human intake of PCDDs, PCDFs, and dioxin like in Japan, 2001 and 2002. *Chemosphere*, **67**, S247-S255.
- Matscheko N., Tysklind M., et al. (2002). "Application of sewage sludge to arable land—soil concentrations of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls, and their accumulation in earthworms." *Environ Toxicol Chem* **21** (12): 2515-2525.
- Maurin J.C, Bleicher F, Magloire H. (2005). Clinical consequences of dioxins exposure during tooth development. *Archives de pédiatrie*; **12**, 1636-1640.
- Mayer F.L, Versteeg D.J, McKee M.J, Folmar L.C, Graney R.L, McCume D.C and Rattner B.A (1992). Physiological and nonspecific biomarkers. In: Huggett RJ, Kimerle RA,

- Merle PM, Bergman HL (eds) Biomarkers biochemical, Physiological and histological markers of Anthropogenic Stress. Lewis, Boca Raton, pp 5-86.
- McLachlan, M.S, Sewart A.P, et al. (1996). "Persistence of PCDD/Fs in a sludge-amended soil." *Environ Sci and Technol* **30** (8): 2567-2571.
- McMillan B.J, Bradfield C.A, (2007). The aryl hydrocarbon receptor sans xenobiotics: endogenous function in genetic model systems. *Mol Pharmacol* **72**, 487-498.
- Mimura J, Ema M, Sogawa K et al. (1999). Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev.* **13**: 20-25.
- Moore M.N (1990). Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochemistry* **22** :187-191.
- Ndayibagira A, Sunahara G.I and Robidoux P.Y (2007). Rapid Isocratic HPLC quantification of metallothionein-like proteins as biomarkers for cadmium exposure in the earthworm *Eisenia Andrei*. *Soil Biol Biochem* **39**: 194-201
- Norgrove, L. (2007). "Effects of different copper fungicide application rates upon earthworm activity and impacts on cocoa yield over four years." *Eur J Soil Biol* **43** (Supplement 1): S303-S310.
- Nouwen J, Cornelis C, De Fre R, Mewers M, Viaene P, Mensink C, et al. (2001). Health risk assessment of PCDD/F emissions from municipal waste incinerators: The Neerlandquerter (Wilrijk, Belgium). *Chemosphere* **43**, 909-923.
- OECD, Guidelines for testing of chemicals, No. 207 earthworm acute toxicity tests, OECD, Paris, 1984.
- OEHHA (Office of Environmental Health Hazard Assessment), 2003. http://www.oehha.ca.gov/air/chronic_rels/pdf/.
- Oh J.E, Choi S.D, Lee S.J, Chang Y.S (2006). Influence of a municipal solid waste incinerator in ambient air and soil PCDD/Fs levels. *Chemosphere* **64**:579-587. Doi:10.1016/j.Chemosphere.2005. 11.012.
- Pan X., Song W., et al. (2010) "Earthworms (*Eisenia foetida*, Savigny) mucus as complexing ligand for imidacloprid." *Biol Fertil Soils* **46** (8): 845-850.
- Parneggiani Luigi. Dioxin, tetrachlorodibenzo-para. *Encyclopædia of Occupational Health and Safety*, 1984. Volume 1, pp: 638-642.
- Patel M., Francis J., et al. (2007). "Development of a flow cytometric, non-radioactive cytotoxicity assay in *Eisenia fetida*: An in vitro system designed to analyze

- immunosuppression of natural killer-like coelomocytes in response to 7, 12 dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)." *Eur J Soil Biol* **43**(SUPPL. 1).
- Peakall DB and Shugart LR (1993). *Biomarkers : Research and application in Assessment of environmental Health*. Springer-Verlag, berlin.
- Peakall DB and Walker CH (1994). The role of biomarkers in environmental assessment. *Vertebrates. Ecotoxicology* **3**: 173-179.
- Pellerin-Massicotte J et Tremblay R, (1998). La fragilité lysosomiale en tant que biomarqueur cytologique in utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement, 225-242, Lagadic L, Caquet T, Amiard JC et Ramade F. (eds), Tec et doc Lavoisier, Paris.
- Perez-Losada M., Eiroa J, et al. (2005). "Phylogenetic species delimitation of the earthworms *Eisenia fetida* (Savigny, 1826) and *Eisenia andrei* Bouche, 1972 (Oligochaeta, Lumbricidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences." *Pedobiologia* **49** (4): 317-324.
- Perotoni J, Rrodrigues O.E.D, Paixao M.W, Zeni G, Lobato L.P, Braga A.L, Rocha J.B.T, Emanelli T, (2004). Renal and hepatic ALA-D activity and selected oxidative stress parameters of rats exposed to inorganic mercury and organoselenium compounds. *Food Chem Toxicol*, **42** : 17-28.
- Peskin A.V., Winterbourn C.C. (2000). A microtiter plate assay for superoxide dismutase using water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta* **293**: 157-166.
- Pohl H, DeRosa C, et al. (1995). "Public health assessment for dioxins exposure from soil." *Chemosphere* **31** (1): 2437-2454.
- Po-Hsiung L, Chia-Hua L, Chuan-Chen H, Ming-Chien C, Pinpin L. (2007) 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces oxidative stress, DNA strand breaks, and poly (ADP-ribose) polymerase-1 activation in human breast carcinoma cell lines,. *Toxicology letters* **172**: 146-158.
- Pollit F. Polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans, (1999). *Regul Toxicol Pharmacol* **30**, 63-68.
- Powell-Coffman J.A., Bradfield C.A., Wood W.B. (1998). *Caenorhabditis elegans* orthologs of the aryl hydrocarbon receptor and its heterodimerization partner the aryl hydrocarbon nuclear translocator. *Proceedings of the National Academy of Science USA* **95**, 2844-2849.

- Prento P and Prento A (1984). Crystalline catalase from the earthworm *Lumbricus terrestris* (oligochaeta:annelida): purification and properties. *Comp Biochem Physiol B* 77: 325-328.
- QuaB U (ed). Identification of relevant industrial sources of dioxins and furans in Europe, 1997. Final Report of the European Commission, DG-XI, No: 43, Land sumweltamt Nordrhein-Westfalen, Essen.
- QuaB U, Fermann M.W, BrZoker G. Steps towards a European dioxin emission inventory, 2000. *Chemosphere* 40: 125-1129.
- Quaglino D, Cooper E. L, et al. (1996). "Earthworm coelomocytes in vitro: Cellular features and 'granuloma' formation during cytotoxic activity against the mammalian tumor cell target K562." *Eur J Cell Biol* 70 (3): 278-288.
- Radetski C.M, Ferrari B, Cotelle S, Masfarand J-F, Ferard J.F (2004). Evaluation of genotoxic, mutagenic and oxidant stress potentials of municipal solid waste incinerator bottom ash leachates. *Sci Total Environ* 333, 209-216.
- Ramade F., 2007. Introduction à l'écotoxicologie; fondements et applications. Ed. Lavoisier, pp 618
- Rappe C. *Chemosphère* 1992, vol.25, 41-44.
- Reddy N.C and Rao J.V, (2008). "Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos." *Ecotoxicol Environ Saf* 71 (2): 574-582.
- Reinecke A.J. and Nash R.G, (1984). "Toxicity of 2,3,7,8-TCDD and short-term bioaccumulation by earthworms (oligochaeta)." *Soil Biol Biochem* 16 (1): 45-49.
- Reiner E.J, Clement R.E, Okey A.B and Marvin C.H., (2006). Advances in analytical techniques for polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans and dioxin-like PCBs. *Anal Bioanal Chem* 386 : 791-806.
- Rida A.M.A, 1994, *Les vers de terre et l'environnement, la recherche*, 25, 260-267.
- Robidoux P.Y, Dubois C, Hawari J, Thiboutot S and Sunahara G.I, (2004a). Assessment of soil toxicity and antitank firing range using *Lumbricus terrestris* and *Eisenia Andrei* in mesocosms and laboratory studies, *Ecotoxicology*, 13, 603-614.
- Robidoux P.Y, Gong P., Sarrazin M., Bardai G., Paquet L., Hawari J, Dubois C, and Sunahara G.I, (2004b). Toxicity assessment of contaminated soils from an antitank firing range, *Ecotoxicol Environ Safety*, 58, 300-313.

- Robidoux P.Y, Hawari J, Thiboutot S, Ampleman G and Sunahara G.I, (1999) Acute toxicity of 2, 4, 6- trinitrotoluene in earthworm (*Eisenia Andrei*). *Ecotoxicol Environ Safety*, 44, 311-321.
- Robidoux P.Y, Hawari J, Thiboutot S, Ampleman G and Sunahara G.I, (2001). Chronic toxicity of octanhydro-1,3,5,7-tetranitro-1,3,5,7-tétrazocine (HMX) in soil determining using the earthworm (*Eisenia Andrei*) reproduction test. *Environ Pollut*, 111, 283-292.
- Robidoux P.Y, Svendsen C, Caumartin J, Hawari J, Ampleman G, Thiboutot S, Weeks J.M and Sunahara G.I, (2000). Chronic toxicity of energetic compounds in soil using the earthworm (*Eisenia Andrei*) reproduction test. *Environ Toxicol Chem*, 19, 1764-1773.
- Rouse G.W and Pleijel F, (2006). *Reproductive biology and Phylogeny of Annelida*, Science Publishers, Enfield, 688.
- Rovira J, Mari M, Nadal M, Schumacher M, Domingo J.L (2010). Environmental monitoring of metals, PCDD/Fs and PCBs as a complementary tool of biological surveillance to assess human health risks. *Chemosphere* 80, 1183-1189.
- Santé Canada. VTR Dioxines. Santé Canada, direction générale de la protection de la santé, Direction de l'hygiène du milieu, 1999. Ottawa. <http://www.hc-sc.gc.ca/français/>.
- Sauvé S and Fournier M, (2005). Age-specific immunocompétence of the earthworm *Eisenia Andrei* exposure to methylmercury chloride. *Ecotoxicol Environ Saf* 60:67-72.
- Sauvé S, Hendaoui M, Brousseau P and Fournier M (2002). Phagocytic response of terrestrial and aquatic invertebrates following in Vitro exposure to trace elements. *Ecotoxicol Environ Saf* 52: 21-29.
- Schmid P, Gujer E, Degen S, Zennegg M, Kuchen A and Wüthrich C. (2002). Levels of polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in food of animal origin. The Swiss dioxin Monitoring Program. *J Agric Food Chem* 50, 7482-7487.
- Schreiner G., Wiedmann T., Schimmel H., Ballschmiter K. (1997). Influence of the substitution pattern on the microbial degradation of mono-to tetrachlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. *Chemosphere*, 34: 1315-1331.
- Schrock M.E., Barrows E.S., et al. (1997). "Biota-to-sediment accumulation factors for TCDD and TCDF in worms from 28-day bioaccumulation tests." *Chemosphere* 34 (5-7): 1333-1339.
- Schuhmacher M, Domingo J.L (2006). Long-term study of environmental levels of dioxins and furans in the vicinity of a municipal solid waste incinerator. *Environ Int* 32(3):397-404.

- Schuhmacher M. and Domingo J.L (2006). "Long-term study of environmental levels of dioxins and furans in the vicinity of a municipal solid waste incinerator." *Environ Int* 32(3): 397-404.
- Schulz A.J., Wiesmüller T., et al. (2005). "Dioxin concentration in milk and tissues of cows and sheep related to feed and soil contamination." *J Anim Physiol Anim Nutri* 89 (3-6): 72-78.
- Scott-Fortsmand J.J., and Weeks J.M., (2000). Biomarkers in Earthworms. *Rev Environ Contam Toxicol* 165, 117-159
- Song Y., Zhu L.S., Wang J.H., Liu W., Xie H., (2009). DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia fetida*) induced by atrazine. *Soil Biol Biochem* 41, 905-909.
- Spurgeon D.J. and Hopkin S.P. (2000). "The development of genetically inherited resistance to zinc in laboratory-selected generations of the earthworm *Eisenia fetida*." *Environ Pollut* 109 (2): 193-201.
- Srogi K. (2008). "Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and dioxin-like PCBs in environmental and human samples: A review." *Environ Chem Lett* 6 (1): 1-28.
- Steeland K., Bertazzi P., Baccarelli A., et al. (2004). Dioxin revisited : developments since the 1997 IARC classification of dioxin as human carcinogen. *Environ Health Perspect.* 112, 1265-1268.
- Stenersen J (1992). Uptake and metabolism of xenobiotics by earthworms. In: Grieg-Smith PW, Becker H, Edwards PJ, Heimbach F (eds). *Ecotoxicology of earthworms*. Intercept, hants, UK, pp 129-138.
- Stenersen J, Guthenberg C, Mannervik B (1979). Glutathione s-transferases in earthworms (*Lumbricidae*). *Biochem J* 181: 47-50
- Stenersen J, Kobro s, Bjerke m, and Arend U (1987). Glutathione transferase in aquatic and terrestrial animals from nine phyla. *Comp Biochem Physiol C* 86:73-82.
- Stewart PW, Reihman J, Lonky EI, Darvill TJ, Pagano J, (2003). Cognitive development in preschool children prenatally exposed to PCBs and MeHg. *Neurotoxicol Teratol* 25 (1), 11-22.
- Suzuki G, Nakano M and Nakano S. (2005). Distribution of PCDDs/PCDFs and Co-PCBs in human maternal blood, cord blood, placenta, Milk and adipose tissue: Dioxins showing

- high toxic equivalency factor accumulate in the placenta. *Biosci Biotechnol Biochem* 69 (10), 1836-1847.
- Svendsen C et Weeks JM (1997a). Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. I: Links to ecological effects in a laboratory study with *Eisenia andrei*. *Ecotoxicol Environ Saf* 36 : 72-79.
- Ten Tusscher GW, Knoppe JG. (2004). Perinatal dioxin exposure and later effects- a review. *Chemosphere*; 54 : 1329-1336.
- USEPA (2000) in: <http://www.afsse.fr/index.php?pageid=701> et <http://www.geneve.ch/grandconseil/data/texte/IUE00397A.pdf>
- USEPA-1613 (1994). Tetra through octachlorinated dioxins and furans by isotopic dilution HRGC-HRMS. Washington, DC.
- Valic E., Jahn O., Pöpka O., Winker R., Wolf C., Rüdiger W.H. (2004), *Int Arch Occup Environ Health* 77: 301-306.
- Van Cleef-Toedt KA, Kaplan LAE and Crivello JF (2000). Metallothionein mRNA expression in spawning and non-spawning *Fundulus heteroclitus* following acute exposure to starvation and waterborne cadmium. *Fish physiol Biochem* 22, 319-327.
- Van der Berg M, Birnbaum L.S et al. (1998). Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspec* 106 : 775-792.
- Vandelac L., Fournier M., Mergler D., et coll. (2010). *Diagnostic Écosanté Mercier*. Montréal, CINBIOSE, UQAM. Rapport révisé au Ministère du Développement économique, de l'Innovation et de l'Exportation (dépôt 2011)
- Vandelac, Louise 2006, *Projet de recherche Diagnostic Écosanté Mercier, Phase 3, présenté au MDEIE, juillet 2006.*
- Vandelac, Louise et Marie-Hélène Bacon «Perturbateurs endocriniens et polluants organiques persistants : inquiétante érosion de la santé, de la fertilité et des capacités intellectuelles» pp.237-267. *Ruptures*, Revue interdisciplinaire en santé, Vol. 6, No 2. Département de médecine, Université de Montréal. Déc.1999.
- Vilavert, L., M. Nadal, et al. (2010) "Monitoring temporal trends in environmental levels of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: Results from a 10-year surveillance program of a hazardous waste incinerator." *Arch Environ Contam Toxicol* 59(4): 521-531.

- Ville P., Roch P., et al. (1995). "PCBs Increase Molecular-Related Activities (Lysozyme, Antibacterial, Hemolysis, Proteases) but Inhibit Macrophage-Related Functions (Phagocytosis, Wound Healing) in Earthworms." *J Invertebr Pathol* **65**(3): 217-224.
- Wang J.B, Wang M.S, Wu E.M.Y, Chang-Chien G.P, Lai Y.C (2008). Approaches adopted to assess environmental impacts of PCDD/F emissions from a municipal solid waste incinerator. *J Haz Mat* **152**, 968-975.
- Wang Y.F., Hou H.C., et al. (2010). "Dry and wet depositions of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in the Atmosphere in Taiwan." *Aerosol and Air Quality Research* **10**(4): 378-390.
- Weber R., Gaus C., et al. (2008). "Dioxin- and POP-contaminated sites - Contemporary and future relevance and challenges: Overview on background aims and scope of the series." *Environ Sci Pollut Res* **15** (5): 363-393.
- Weber Roland (2007). Relevance of PCDD/PCDF formation for the evaluation of POPs destruction technologies-Review on current status and assessment gaps. *Chemosphere* **67**, S109-S117.
- Weeks J.M (1996). The value of biomarkers for ecological risk assessment: academic toys or legislative tools? *Appl Soil Ecol* **2**: 215-216
- Wiesner L., Hahn M. E., Karchner, S. I., Cooper E. L., Kauschke E. (2003). Does an ARYL HYDROCARBON RECEPTOR (AHR)-like molecule exist in earthworms? Some implications for immunity. *Pedologia* **47**, 646-650
- Xu M.X, Yan J.H, Lu S.Y, Li X.D, Chen T, Ni M.J, et al. (2009). Agricultural soil monitoring of PCDD/Fs in the vicinity of a municipal solid waste incinerator in Eastern China: Temporal variations and possible sources. *J Haz Mat* **166** (2-3):628-34.
- Yahia Y.M., Saad M.M.I., et al. (2003). "Comparative toxicity and biochemical responses of certain pesticides to the mature earthworm (*Aporrectodea caliginosa*) under laboratory conditions." *Environ Toxicol* **18**(5): 338-346.
- Yves Robidoux P., Dubois C., et al. (2004). "Assessment of Soil Toxicity from an Antitank Firing Range Using; *Lumbricus terrestris* and *Eisenia andrei*; in Mesocosms and Laboratory Studies." *Ecotoxicology* **13**(6): 603-614.
- Zhang W, Song Y.F, Gong P, et al. (2006). Earthworm cytochrome P450 determination and application as biomarker for diagnosing PAH exposure. *J. Environ. Monit.* **8**(9): 963-967.

ANNEXES

ANNEXE A

Le tableau suivant résume, par classe d'homologues totaux, les résultats d'analyses pour les 17 congénères de dioxines/furannes mesurés dans les 25 échantillons de tissus gras animaux.

Tableau A.1. Concentration en homologues totaux des dioxines/furannes dans les tissus gras des 25 carcasses d'AMR collectés en 2004 et 2005 (en pg/g)

Numéro d'AMR	Total Penta CDD	Total Hexa CDD	Total Hepta CDD	Octa CDD	Total Tetra CDF	Total Penta CDF	Total Hexa CDF	Total Hepta CDF	Octa CDF
#7-9-RL-?-30-OCT-2004	0,326	2,57	1,16	10,9	0	0,947	3,83	0	2,74
#6-9-RL-?-30-OCT-2004	0	0	0	6,83	0	0	0	0	0
#3-6-RL-30/10/2004	0	0	2,09	7,92	0	0	0	0	0,617
#2-10'-RL-F-30-OCT-2004	0	0,788	5,99	12,2	0	0,146	0,552	0	1,38
#1-8-RL-F-30-OCT-2004	0,237	1,34	23,6	254	0	0	0	0	3,06
#4-9-RL-30/10/2004	0	0,478	9,42	9,42	0	0	0	0	0,818
#1-7-RL-30/10/2004	0	0	2,48	7,87	0	0	0	0	0
#1-4-RL-?-30-OCT-2004	0	0	5,44	21,9	0	0,907	1,63	0	4,56
#1-11-RL-M-30-OCT-2004*	0	0,452	1,361	8,235	0	0	0	0	0,1675
#11-2-RL-F-22-OCT-2004	0	2,55	16,3	101	0	0,141	0,411	0	2,3
#4-1-RL-F-30-OCT-2004	0	1,54	9,03	18,4	0	0,371	0,663	0	0
#2-12-RL-M-30-OCT-2004	0,814	0,913	3,54	37,6	0	0	1,47	0	1,69
#3-12-RL-M-30-OCT-2004	0	0	0,421	1,08	0	0	0	0	0
#1-16-RL-?-30-OCT-2004	1,36	7,85	26,8	82,6	2,7	1,75	4,16	0	3,5
#3-15-RL- 30/10/2004	0	1,33	10	35,4	0,409	0	0	1,69	1,61
#1-17-RL-F-30-OCT-2004	0,111	0	0,89	2,2	0,542	0,639	0,117	0	0
#11-6-REN-M-25-OCT-2004	0	0	8,14	12,3	5,02	4,01	0,365	0	2,34
#2-4-MUS-M-30-OCT-2004	13,3	43,5	16,3	104	0	36,5	34,4	0	0

#3-3-6-RL-?-01-OCT2005	0,532	3,4	14,9	65,7	0	0	1,65	0	3,81
#3-2-6-RL-1/10/2005	0	0	3,15	35,5	0	0	0	0	1,02
#3-1-7-RL-F-01-OCT-2005	0	0	0	7,46	0	0	0	0	0
#3-1-12-RL-1/10/2005	0	0	2,1	10	0	0	0	0,422	0,678
#3-3-1-RL-?-01-OCT-2005	0	0,347	2,55	8,75	0	0	0	0	0
#3-1-13-RL-F-01-OCT-2005	4,56	7,79	11,5	39,9	0,838	8,23	16,2	0	8,21
#3-2-16-RL-1/10/2005	0	0,741	6,65	69,4	0	0	0	0	3,28

- Le tetra CDD n'a pas été détecté.

* Les données de l'AMR #1-11-RL-M-30-OCT-2004 proviennent de la moyenne de deux résultats d'analyses différentes réalisées par Maxam à partir du même échantillon.

ANNEXE B

Supplément des tests in vitro

Résultats des tests dose-réponse : Étude des effets des PCDD/F sur la phagocytose chez les vers de terre *E.andrei* (tests *in vitro*)

Tableau 1 : Concentrations des PCDD/F utilisées dans les tests dose-réponse

PCDDs/Fs	C1 (ng/ml)x10 ⁻³	C2 (ng/ml)x10 ⁻³	C3 (ng/ml)x10 ⁻³
2378-TCDD	3,125	6,25	12,5
2378-TCDF	3,125	6,25	12,5
12378-PeCDD	7,8125	15,625	31,25
12378-PeCDF	7,8125	15,625	31,25
123678-HxCDD	7,8125	15,625	31,25
123678-HxCDF	7,8125	15,625	31,25
1234678-HpCDD	7,8125	15,625	31,25
1234678-HpCDF	7,8125	15,625	31,25
OCDD	15,625	31,25	62,5
OCDF	15,625	31,25	62,5

B.1. Effets sur la viabilité

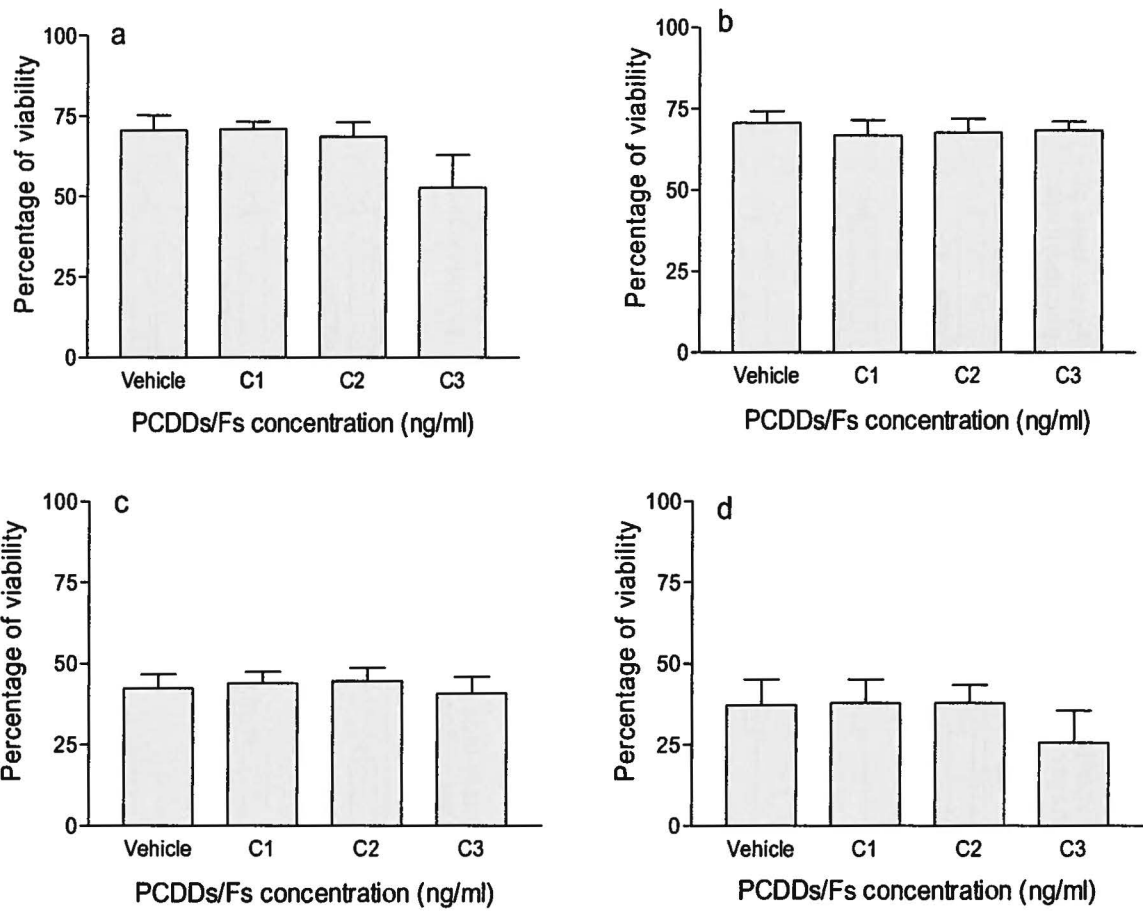


Figure B.1: Viability of cœlomocytes exposed to PCDDs/Fs following phagocytosis kinetics. (a: without preincubation, b, c, and d with preincubation of 3, 6 and 12 hours, respectively). Data are presented as mean \pm SD (n=6).

B.2. Effets sur la phagocytose

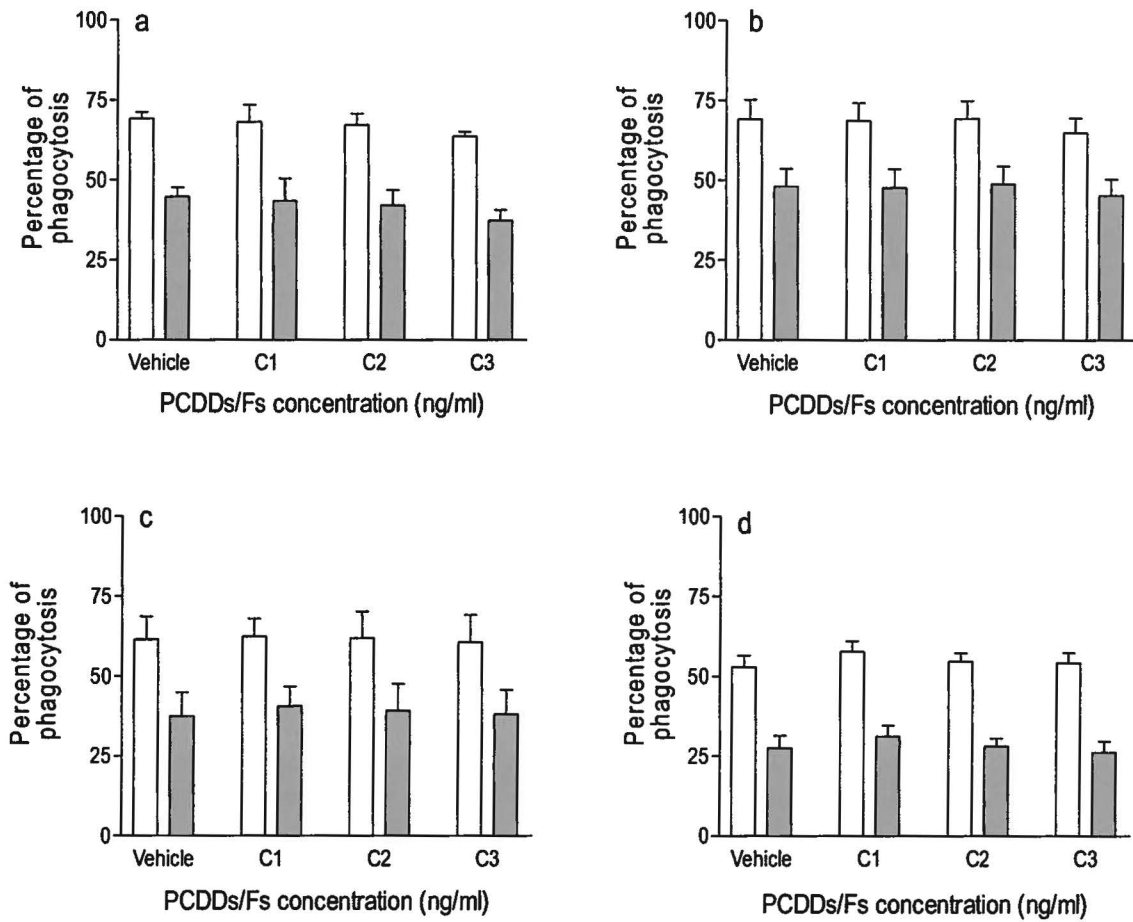


Figure B.2: Kinetics of phagocytosis of cœlomocytes exposed to PCDDs/Fs (a: without preincubation, b, c, and d with preincubation of 3, 6 and 12 hours, respectively. M1 (light bars): cells engulfed one bead and more, M2 (dark bars): cells engulfed three beads and more). Data are presented as mean \pm SD (n=6).

B.3. Suivi de la viabilité des coelomocytes non traités

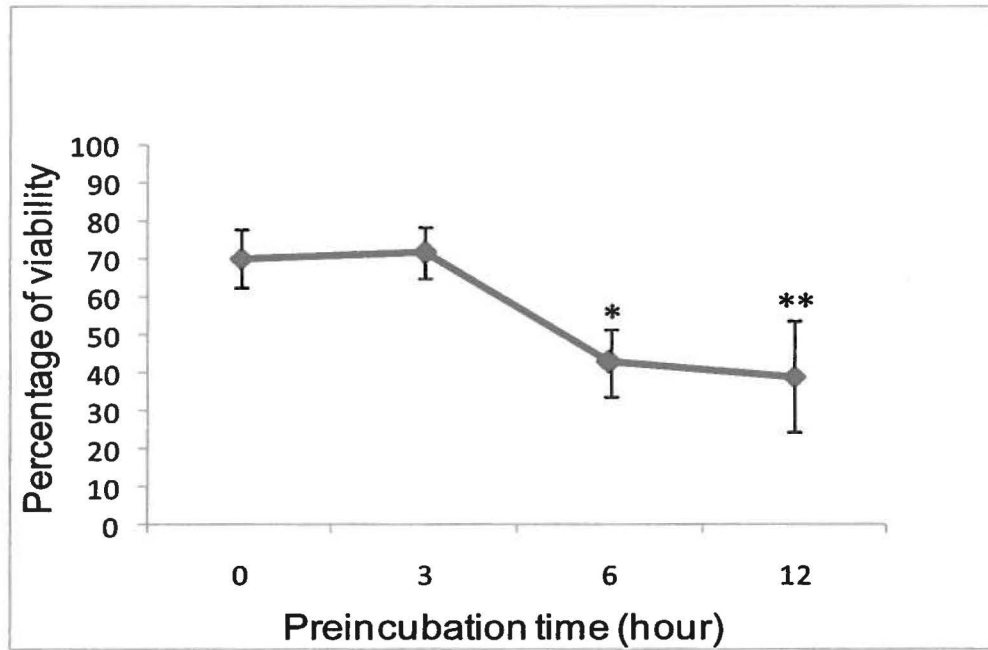


Figure B.3: Monitoring of single Cœlomocytes viability following kinetics of phagocytosis (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Note: un temps de 3 heures a été optimisé pour une préincubation aux dioxins des coelomocytes avant l'incubation aux billes de latex (dans le test de phagocytose).

ANNEXE C

Résultats supplémentaires (biomarqueurs et analyse chimique)

C.1. Résultats obtenus après la mesure d'une batterie de biomarqueurs dans l'étude écotoxicologique préliminaire des sols de Mercier réalisée en 2007-2008.

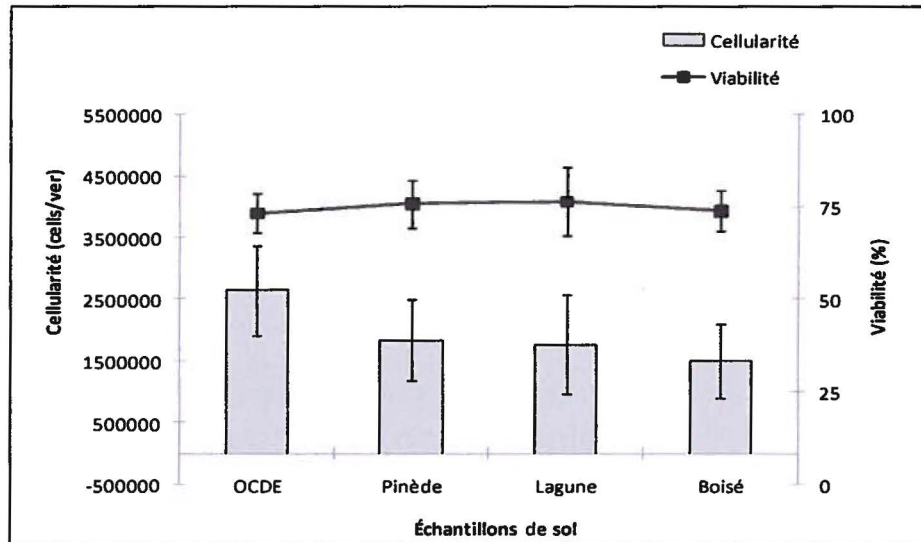


Figure C.1 : Effets des sols de Mercier sur la cellularité et la viabilité cellulaire des vers de terre après 28 jours d'exposition.

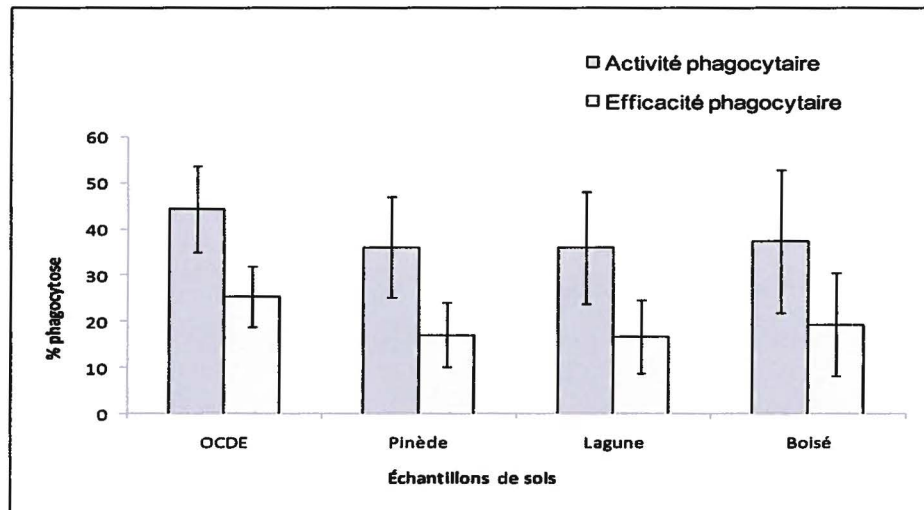


Figure C.2 : Effets des sols de Mercier sur la phagocytose des coelomocytes chez les vers de terre après 28 jours d'exposition.

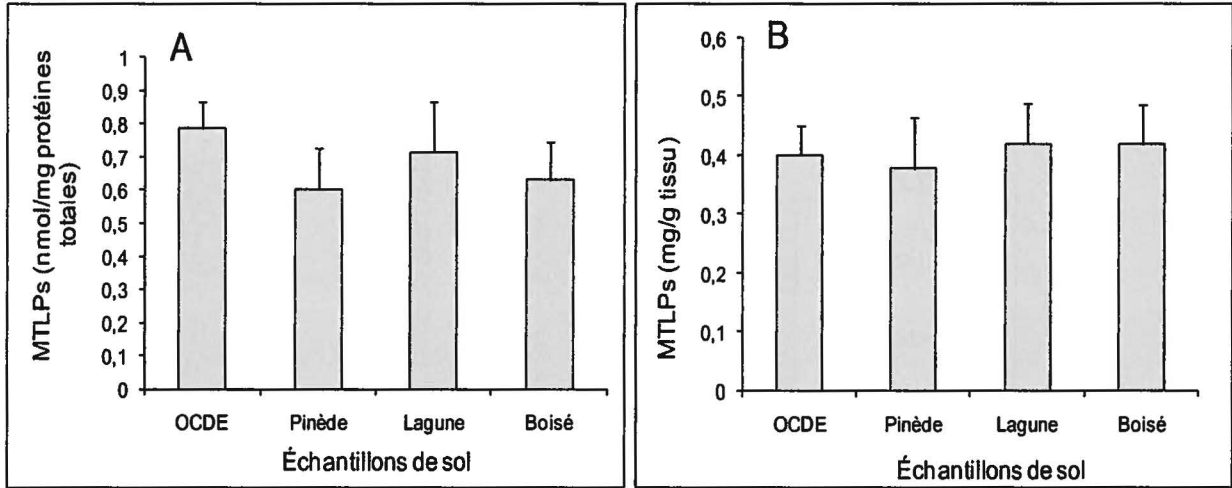


Figure C.3: Effets des sols de Mercier sur l'activité des MTLPs dans les tissus des vers de terre après 28 jours d'exposition.

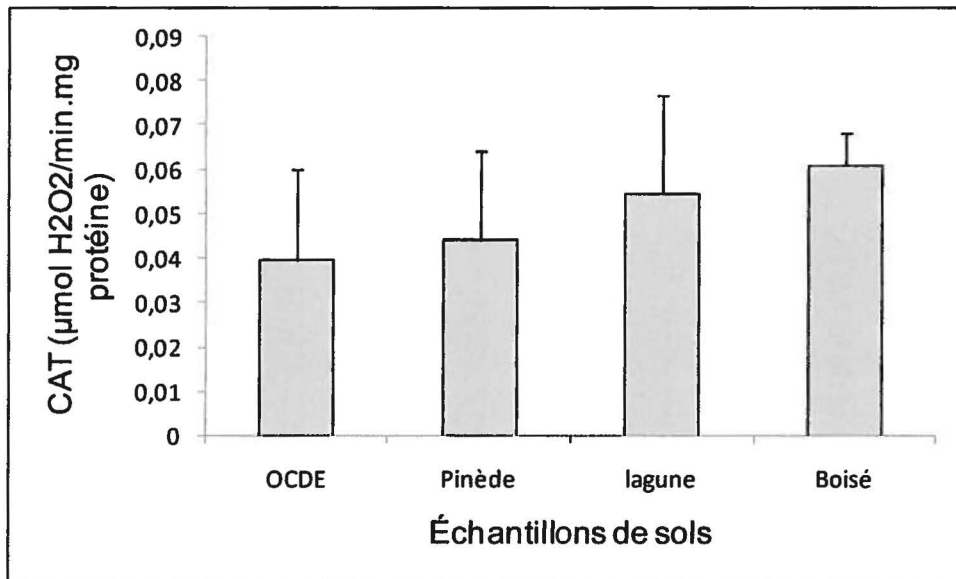


Figure C.4 : Effets des sols de Mercier sur l'activité de la Catalase (CAT) chez les vers de terre après 28 jours d'exposition.

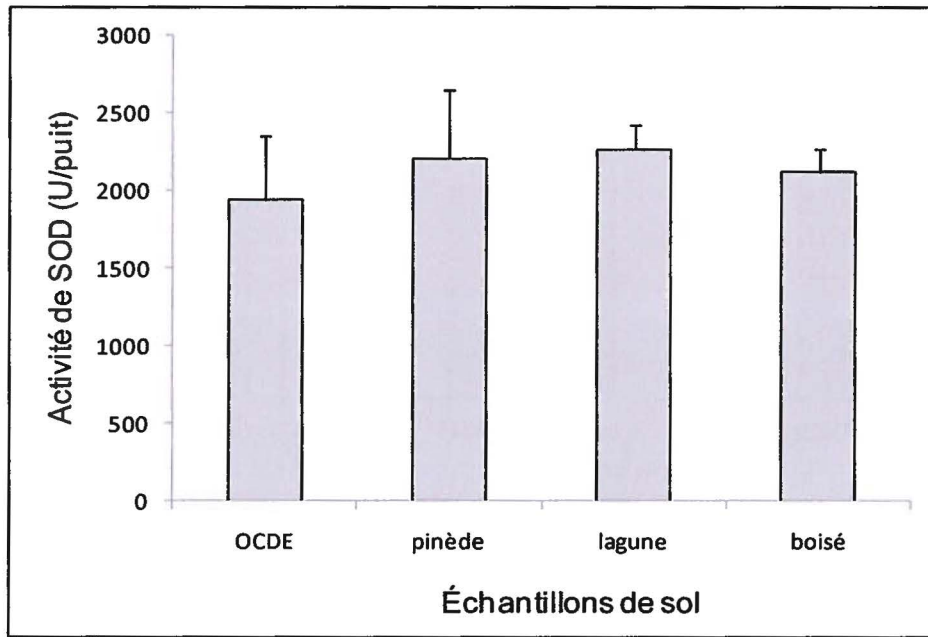


Figure C.5 : Effets des sols de Mercier sur l'activité de la Superoxyde-dismutase (SOD) chez les vers de terre après 28 jours d'exposition.

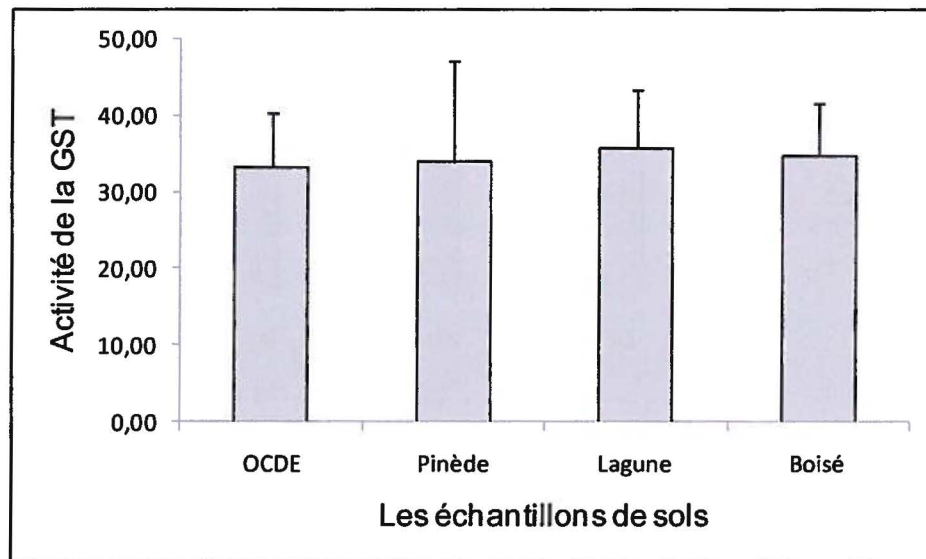


Figure C.6 : Effets des sols de Mercier sur l'activité de la Catalase chez les vers de terre après 28 jours d'exposition.

C.2. Analyse chimique de métaux

Les analyses ont été réalisées dans le laboratoire des pollutions industrielles du centre d'expertise en analyse environnementale du Québec (CEAEQ)

C.2.1. Dans les sols

- Numéro de la méthode MA.200-MET 1.2

« Détermination des métaux : méthode par spectrométrie de masse à source ionisante au plasma d'argon »

- La méthode pour l'analyse du mercure est « MA. 200 Hg 1.1 » : méthode par spectrophotométrie d'absorption atomique, formation de vapeur.

Note : les détails des 2 méthodes sont disponibles sur le site du CEAEQ :

http://www.ceaeq.gouv.qc.ca/methodes/method_numer.htm

Tableau C2.1 : limites de détection des métaux dans les sols

Métal	Limite de détection
Cadmium	0,25
Calcium	15
Chrome	1
Cuivre	2
Plomb	1
Zinc	4
Mercure	0,07

C.2.2. Dans les tissus

- Numéro de la méthode MA. 207 - Mét 2.0

"Détermination des métaux dans les tissus animaux : Méthode par spectrométrie de masse à source ionisante au plasma d'argon après digestion à l'acide nitrique et chlorhydrique"

- Digestion d'une masse d'environ 50 à 100 mg d'échantillon sec avec HCl et HNO₃ concentré de qualité SeaStar.

- Le dosage des échantillons est effectué à l'aide d'un spectromètre de masse couplé à une source d'émission au plasma d'argon de marque Perkin Elmer Sciex, modèle Elan DRC II

Tableau C2.2 : limites de détection des métaux dans les tissus

métal	limite de détection
Arsenic	0,02
baryum	0,001
Cadmium	0,009
Cobalt	0,0006
Chrome	0,003
Cuivre	0,02
Fer	0,2
Manganèse	0,004
Molybdène	0,0006
Nickel	0,005
Plomb	0,0005
Sélénium	0,05
Strontium	0,005
Vanadium	0,04
Zinc	0,06

ANNEXE D: LETTRES DES ÉDITEURS

_paola granata

À Hayet Belmeskine, Pauline Brousseau, Sami Haddad, Louise Vandelac, Michel Fournier,
Francois.Gagne@ec.gc.ca

De :

Ms. Paola Granata (paola.granata@pagepress.org)

Envoyé : 10 novembre 2011 14:49:29

À : Hayet Belmeskine (hbelmeskine@hotmail.com); Pauline Brousseau
(pauline.brousseau@iaf.inrs.ca); Sami Haddad (sami.haddad@umontreal.ca); Louise
Vandelac (vandelac.louise@uqam.ca); Michel Fournier (michel.fournier@iaf.inrs.ca)

Cc : Francois.Gagne@ec.gc.ca

Dear Authors,

The final formatted version of your article entitled "Effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans on phagocytic response of Eisenia andrei coelomocytes" has been published right now on the Journal of Xenobiotics.

Full table of contents is available at:

<http://www.pagepressjournals.org/index.php/xeno/index>

Please note that we are still waiting for your agreement to the "Disclosure Form" attached. It has to be filled in and by EACH author of the paper, sent back to us.

Thank you for choosing our journal as a platform for your scientific publication.

Best regards,
Paola Granata
Managing Editor
PAGEPress Publications, Pavia, Italy
paola.granata@pagepress.org

Journal of Xenobiotics
<http://www.xenobiotics.eu>

Pour l'Article 2:

[JXeno] In vitro effects of PCDDs/Fs on NK-like cell activity of Eisenia andrei earthworms

2011-11-29 Répondre

De : Ms. Paola Granata (paola.granata@pagepress.org)

Envoyé : 29 novembre 2011 16:08:36

À : Hayet Belmeskine (hbelmeskine@hotmail.com)

Dear Dr. Belmeskine,

We are pleased to inform you that your paper has been accepted for publication.

Please consider our Ahead-of-Print publication option right now: if you wish to accept kindly send us an authorization message, and our production office will prepare a PDF of your paper that will immediately appear online as an early release version. Based on your approval, your article will be thereafter submitted to all indexes/directories in which our journal is listed.

Before publication we also need to get via fax your agreement to the License and the "Disclosure Form" attached. Both have to be filled in and signed, and sent back to us. In mind to allow PAGEPress to proceed with publication of your work, the Disclosure Form has to be signed by EACH author of the paper.

Thank you very much for choosing to submit your paper to our journal.

Sincerely,

Paola Granata

Journal of Xenobiotics <http://www.xenobiotics.eu>

EES-11-459R1: Interim Decision

ees.ees.0.14afe6.78270a03@eesmail.elsevier.com de la part de EES (ELS)

Ms. No.: EES-11-459R1

Title: Toxic effects of PCDD/Fs on *Eisenia andrei* earthworms

Corresponding Author: Mrs Hayet Belmeskine

Authors: Sami Haddad, Ph.D; Louise Vandelac, Ph.D; Sébastien Sauvé, Ph.D; Michel Fournier, Ph.D

Dear Mrs Belmeskine,

Thank you for submitting your manuscript to Ecotoxicology and Environmental Safety. The reviewers have made suggestions which the Editor feels would improve your manuscript. The Editor encourages you to consider these comments and make an appropriate revision of your manuscript. The reviewers' comments are below.

Please submit your revision online within 60 days by logging onto the Elsevier Editorial System for Ecotoxicology and Environmental Safety: <http://ees.elsevier.com/ees/>

Thank you, and we look forward to receiving your revised manuscript.

With kind regards,

Irena Twardowska, PhD. DSc.
Editor-in-Chief

Ecotoxicology and Environmental Safety
Elsevier
525 B Street Suite 1900
San Diego, CA 92101-4495, USA
Phone: 619-699-6297
Fax: 619-699-6855
Email: ees2@elsevier.com

Dear Mrs Belmeskine

I acknowledge with thanks the safe receipt of the manuscript **Ecotoxicological study of field soils from the vicinity of Mercier incinerator in Quebec** submitted to Soil Biology & Biochemistry.

This submission has been assigned the following reference number: **SBB5858**. You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Elsevier Editorial as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/sbb/>.

A decision on publication will be communicated to you as soon as possible.

Please note that submission of an article is understood to imply that the article is original and is not being considered for publication elsewhere. Submission also implies that all authors have approved the paper for release and are in agreement with its content. Thank you for submitting your manuscript to our journal.

With kind regards,

D. Jones
Administrative Support Agent
Soil Biology and Biochemistry

