

Ecotoxicity of PFAS in soils to *aporrectodea caliginosa*

Louise DELOR^{1*}, Maxime LOUZON², Céline PELOSI³, Eric MICHEL³, Géraldine MAILLET⁴, Eric BRANQUET¹, Hugo CARRONNIER¹

¹VALGO, Tour Franklin, 100-101 terrasse Boieldieu, 92800 Puteaux, France, louise.delor@valgo.com

²Ecosystem Department, ENVISOL, 2 Rue Hector Berlioz, 38110, La Tour Du Pin, France, m.louzon@envisol.fr

³UMR INRAE/Avignon Université EMMAH (Environnement Méditerranéen et Modélisation des Agrohydro-systèmes), 228 Route de l'Aérodrome, 84000, Avignon, France, eric.michel@inrae.fr

⁴TOXEM, 12 Rue des Quatre Saisons, 76290, Montivilliers, France, geraldine.maillet@toxem.fr

Résumé

Les substances per- et polyfluoroalkylées (PFAS) sont des composés persistants massivement utilisés dans les mousses anti-incendie. La contamination des sols par les PFAS constitue une préoccupation environnementale majeure, et il y a un manque de données sur leurs mécanismes d'action écotoxicologiques, ainsi que sur les concentrations induisant des effets néfastes, en particulier pour les organismes non ciblés, notamment dans le cas des mélanges de PFAS. Cette étude contribue à combler ces lacunes en évaluant et en modélisant les effets des PFAS (seuls et en mélanges pour le PFOS et le PFOA à différentes concentrations environnementales) sur les vers de terre endogés juvéniles d'une espèce représentative dans les sols européens (*Aporrectodea caliginosa*) à différents niveaux d'organisation biologique (individuel et sub-individuel). Les résultats ont montré pour la première fois des forts effets écotoxicologiques combinés des PFAS sur la survie des vers de terre, la croissance et la stabilité génomique, notamment avec l'induction de cassures de l'ADN associées à des niveaux non anormaux de lésions oxydatives de l'ADN. Nos résultats ont démontré des effets significatifs dès 0,3 mg. kg⁻¹sol sec.

Introduction

Les substances per et polyfluoroalkylées (PFAS) sont une famille de plus de 10 000 composés fabriqués par l'Homme. Ils sont caractérisés par une chaîne carbone-fluor hydrophobe très stable et par un groupement hydrophile leur conférant des propriétés tensioactives et une grande résistance à la dégradation. En raison de leurs propriétés physico-chimiques intéressantes, les PFAS sont massivement utilisés dans l'industrie, les biens de consommation et particulièrement les mousses anti-incendie. Ces composés sont persistants, bioaccumulables et toxiques et la contamination des sols consécutive à leur utilisation constitue une préoccupation environnementale majeure (ITRC., 2022). Les impacts de ces composés et particulièrement du PFOS et du PFOA sur la santé humaine ont été largement étudiés mais il existe un manque de connaissances tant sur leurs mécanismes écotoxicologiques que sur les concentrations qui induisent des effets néfastes et notamment sur les organismes non ciblés et dans le cas des mélanges de PFAS (Gongalsky., 2021).

La plupart des études portant sur les effets écotoxicologiques des PFAS ont été réalisées sur les vers de terres épigés *Eisenia fetida* (Xu et al., 2013). Cependant, cette espèce s'est révélée moins sensible que d'autres espèces plus représentatives des sols naturels européens, comme le ver endogé *Aporrectodea caliginosa* (Pelosi et al., 2013). Dans la littérature scientifique, seulement une étude a évalué la survie de ce ver à l'état adulte (Zareitalabad et al., 2013) et aucune donnée ne porte sur les individus juvéniles, à priori plus sensibles

(Booth O'Halloranl., 2013). Enfin, si des données et des connaissances écotoxicologiques peuvent être trouvées sur le PFOS et le PFOA, très peu de données sont disponibles sur la toxicité combinée de ces composés, alors qu'ils sont couramment trouvés en association dans les sols à des concentrations allant de 0.01 mg.kg⁻¹ à plusieurs centaines de mg.kg⁻¹ (Brusseau et al., 2020).

Pour répondre à ce manque de connaissance, l'étude réalisée vise à évaluer l'écotoxicité du PFOS et du PFOA seuls et en mélange sur la survie et la croissance des spécimens juvéniles de *A. caliginosa*. Elle vise également à explorer les mécanismes d'action de ces polluants en évaluant les effets génotoxiques et les lésions oxydatives causées par la perturbation de l'homéostasie RedOx en utilisant le test des comètes et le test des comètes modifié à débit moyen avec des mini-gels (Slyskova et al., 2014; Muruzabal et al., 2021).

Matériel et méthodes

Des vers de terre *Aporrectodea caliginosa* juvéniles ont été exposés pendant 28 jours à 5 concentrations de PFOS et de PFOA seuls et à 8 concentrations de PFOS et de PFOA en mélanges dans du LUFA 2.2 (tableau 1). Chaque condition a été réalisée en 4 réplicas.

La survie (taux de survie moyen (%), concentration létale 50 (CL50)) et la croissance (changement de poids moyen (%), concentration entraînant 50 % d'inhibition de la croissance (CE50)) des vers ont été analysées.

La génotoxicité des PFAS et la génotoxicité liée au stress oxydant ont été analysées par la réalisation d'un test des comètes couplé à un test des comètes modifié avec inclusion de FpG sur des cellules immunitaires circulantes (coelomocytes). La génotoxicité a été évaluée par la mesure du pourcentage d'ADN dans la queue de la comète (DNA tail) et la génotoxicité liée au stress oxydant par le calcul de la différence de pourcentage d'ADN dans la queue de la comète entre les échantillons avec et sans incubation de FpG (Net FpG).

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Past® version 4. Les tests de Shapiro-Wilk et de Levene ont été utilisés pour évaluer la normalité et l'homoscédasticité des variances de l'ensemble des données. L'existence de différences significatives a été évaluée par des tests paramétriques (ANOVA suivie du test de Tukey) et non paramétriques (test de Kruskal-Wallis suivi d'un post hoc de Dunn). Les estimations des CL50 et de CE50 ont été modélisées respectivement avec Mosaic_{surv}® et Mosaic_{growth}® (Charles et al., 2017). La méthodologie suivie détaillée dans l'étude de Delor et al., 2023.

PFOS	C0	C1	C2	C3	C4	C5			
	0	0,3	1,7	3,5	6,9	13,9			
PFOA	C0	C1'	C2'	C3'	C4'	C5'			
	0	0,5	2,3	4,6	9,2	18,4			
PFOS + PFOA	C0	C1''	C2''	C3''	C4''	C5''	C6''	C7''	C8''
PFOS	0	0,2	0,3	0,8	1,6	2,4	3,3	6,5	13,0
PFOA	0	0,2	0,4	1,0	2,0	3,0	4,0	8,0	16,0
PFOS+PFOA	0	0,4	0,7	1,8	3,6	5,4	7,3	14,5	29,0

Tableau 1 : Concentrations (en mg.kg⁻¹ sol sec) de PFOS et PFOA (seuls), et PFOS + PFOA (mélange) dans du LUFA 2.2 dans des sols dopés. Un sol control (sans addition de PFAS) a également été utilisé

Résultats et discussion

Cette étude présente pour la première fois les effets du PFOS et de le PFOA en exposition unique et en mélange sur les vers de terre juvéniles *Aporrectodea caliginosa* sur la survie, la croissance (changement de poids) et l'intégrité de l'ADN. A 28 jours, la survie des vers de terre exposés au PFOS a diminué de manière significative à C5 (13,9 mg.kg⁻¹ sol sec), avec une valeur de survie moyenne égale à 75 % et une CL50 de 31,7 mg.kg⁻¹ de sol sec. Pour le PFOA, elle a diminué significativement à partir de C4' (9,2 mg.kg⁻¹ sol sec), avec une valeur de survie moyenne égale à 87,5 % et une CL50 de 15,7 mg.kg⁻¹sol sec. Dans le mélange de PFOS et de PFOA, la survie des vers de terre a diminué de manière significative dès C4'' (3,6 mg.kg⁻¹ sol sec) avec une survie moyenne égale à 67,5 % et une CL50 de 9,91 mg.kg⁻¹sol sec. Dans le sol témoin, une hausse moyenne de 40,5 % du poids des vers de terre a été mesurée. La première concentration de PFOS entraînant une diminution significative du changement de poids des vers de terre par rapport à C0 était C3 (3,5 mg.kg⁻¹ de sol sec), avec une valeur moyenne égale à -21,2 %. La CE50 était égale à 6,75 mg.kg⁻¹ sol sec. Pour le PFOA, le changement de poids moyen a diminué significativement dès C3' (4,6 mg.kg⁻¹ sol sec), avec une moyenne égale à 3,2 %. La CE50 étaient égale à 11,72 mg.kg⁻¹sec. Dans le mélange de PFOS et de PFOA, le changement de poids moyen a diminué de manière significative dès C5'' (5,4 mg.kg⁻¹ sol sec) avec une moyenne égale à -18,7 %. La CE50 était égale à 4,07 mg.kg⁻¹ de sol sec.

Trois des cinq concentrations de PFOS testées (C1 ou 0,3 mg.kg⁻¹sol sec, C3 ou 3,5 mg.kg⁻¹ sol sec, C5 ou 13,9 mg.kg⁻¹sol sec) ont fait l'objet d'une analyse de génotoxicité. Une augmentation significative du pourcentage du DNA tail a été observée à C1 et C3 par rapport à C0. Pour le PFOA, le potentiel génotoxique des concentrations C1', C3' et C5' (0,5 mg.kg⁻¹sol sec, 4,6 mg.kg⁻¹sol sec, 18,4 mg.kg⁻¹sol sec) ont été analysés. Aucune augmentation significative du DNA tail n'a été observé par rapport à C0. Pour le mélange de PFOS et de PFOA, cinq des huit concentrations (C1'' ou 0,4 mg.kg⁻¹sol sec ; C2'' ou 0,7 mg.kg⁻¹sol sec, C3'' ou 1,8 mg.kg⁻¹sol sec, C4'' ou 3,6 mg.kg⁻¹sol sec, C6'' ou 7,3 mg.kg⁻¹ sol sec) ont fait l'objet d'une analyse de génotoxicité. Une augmentation significative du DNA tail s'est produite à toutes ces concentrations par rapport à C0, à l'exception de C3'' (figure 1). Aucune variation significative du Net FpG n'a été observée en condition d'exposition au PFOS, au PFOA et au mélange de PFOS et de PFOA indiquant l'absence de lésions oxydatives de l'ADN.

Cette étude a montré que les effets génotoxiques se produisent à de très faibles concentrations de PFAS, sans effet dose-réponse, tandis que des effets sur la croissance (changement de poids) et la survie apparaissent à des doses plus élevées et semblent augmenter avec la concentration de PFAS dans le sol. Les effets sur la survie semblent plus marqués pour le PFOA tandis que les autres effets paraissent plus marqués pour le PFOS.

Conformément à ce qui a été observé dans la littérature sur *Eisenia fetida* (He et al., 2016 ; Wang et al., 2021), des effets négatifs sur la croissance des vers de terre *A.caliginosa* ont été observés à des concentrations plus faibles en PFAS que pour la mortalité qui semble ainsi être un paramètre moins sensible (Frampton et al., 2006 ; Yasmin et D'Souza., 2010). L'étude réalisée a montré que les effets sur la survie des vers *A.caliginosa* juvéniles apparaissent à des concentrations plus faibles que chez le ver adulte (Zereitalabad et al.,2013) ainsi que sur *E. fetida* (He et al., 2016 ; Wang et al., 2021). Cela souligne l'importance du choix de cette espèce et de jeunes spécimens lors de la réalisation des tests d'écotoxicologie.

Dans la littérature, il a été montré que le PFOS et le PFOA pouvaient induire du stress oxydant ainsi que des dommages à l'ADN chez *E. fetida* à des concentrations plus élevées que celles de notre étude (Zheng et al., 2016 ; Wang et al, 2021). Une hypothèse serait que ces dommages à l'ADN seraient liés à une augmentation du niveau de stress oxydant. La réalisation du test des comètes a montré l'absence de génotoxicité induite par le PFOA et l'induction d'une génotoxicité secondaire à l'exposition au PFOS et au mélange de PFOS et de PFOA, sans effet dose-réponse. Ces résultats suggèrent de forts effets génotoxiques sans seuil du PFOS et un effet neutre ou additif du PFOA pour le mélange des composés. Le test des comètes modifié n'a pas permis de mettre en évidence des lésions oxydatives significatives des purines associées à des cassures de l'ADN, ce qui suggère l'existence d'autres mécanismes non entièrement liés au stress oxydant aux faibles concentrations de PFAS testées. Une hypothèse serait que le stress oxydant est généré à des concentrations plus élevées que celles testées. En diminuant les concentrations d'exposition, d'autres mécanismes pourraient être mis en évidence, tels que des troubles épigénétiques (Kim et al., 2021 ; Xu et al., 2022) éventuellement associés à

l'inhibition des systèmes de réparation de l'ADN, (Luzhna et al., 2013; Chatterjee et Walker., 2017). D'autres études devraient être toutefois conduites pour comprendre d'avantage les mécanismes d'actions toxiques des PFAS.

L'étude conduite a montré un potentiel effet synergique du PFOS et du PFOA sur la mortalité et le changement de poids des vers de terre. Toutefois, aucun effet combiné évident n'a été observé pour la génotoxicité. Les effets significatifs apparaissent à des niveaux de dose variables selon le paramètre étudié. La variabilité de réponse observée qui change selon le niveau d'organisation biologique étudié (individuel ou sub-individuel) pourrait s'expliquer par la multiplicité des effets toxicologiques et des mécanismes d'action toxique. En effet, il a été montré que ces composés agissent par différents mécanismes (stress oxydant, modification de la transcription d'un ou plusieurs gènes, action sur des récepteurs nucléaires, etc.) (Behr et al., 2020 ; Caudeville, 2016 ; Fenton et al., 2021 ; Kim et al., 2021 ; Marques et al., 2022 ; Pierozan et al., 2023) et que les effets toxiques observés pourraient différer en fonction de la concentration du produit testée (induction de la prolifération cellulaire à très faible dose et de la mort cellulaire à forte dose) (Pierozan et al., 2023). Ces hypothèses soulignent la complexité à caractériser les effets biologiques des PFAS en mélange, d'autant que des milliers de ces composés sont présents en association dans l'environnement. A noter que ces études se sont principalement concentrées sur les effets des PFAS sur la santé humaine et que davantage d'études seraient nécessaires pour comprendre les mécanismes d'action écotoxicologiques de ces composés.

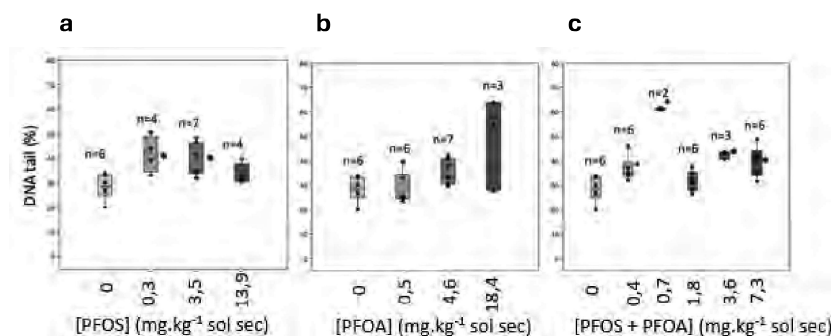


Figure 1 : Pourcentage d'ADN dans la queue de la comète ou DNA tail (%) pour le test des comètes pour (a) le PFOS, (b) le PFOA et (c) le mélange de PFOS et de PFOA. Un astérisque (*) a été appliqué si une différence significative entre la concentration testée et le contrôle C0 a été détectée. (n) correspond au nombre de vers considérés pour les analyses statistiques

Conclusions et perspectives

Cette étude a montré pour la première fois l'écotoxicité chronique du PFOS et du PFOA, seuls et en mélange, à des concentrations environnementales pertinentes sur *A. caliginosa*, une espèce de ver de terre ubiquitaire et sensible. Le PFOS et l'association des deux molécules ont induit des effets génotoxiques à partir de très faibles concentrations dans les sols, tandis que de forts effets apparaissent à des concentrations plus élevées pour la survie et la croissance. La toxicité de ces deux composés semble augmenter quand ils sont présents en mélange. Cette étude a mis en évidence une instabilité de l'ADN causée principalement par des cassures de brin sur l'espèce *A. caliginosa*, et a révélé l'absence globale de dommages à l'ADN induits par le stress oxydatif sur les purines. Bien que les lésions oxydatives de l'ADN soient un biomarqueur reconnu et sensible utilisé pour quantifier l'impact du stress oxydatif dans divers organismes (invertébrés et vertébrés), cette étude a montré l'implication d'autres dommages à l'ADN ne pouvant pas être directement et uniquement causés par le stress oxydatif, suggérant d'autres mécanismes d'action toxicologique (par exemple, inhibition des voies de réparation de l'ADN et/ou altérations épigénétiques). Cette étude renforce la pertinence de l'utilisation d'*A. caliginosa* dans les essais écotoxicologiques, d'individus juvéniles et de biomarqueurs génotoxiques pour apprécier l'écotoxicité des PFAS dans les sols. L'écotoxicité des PFAS et leurs effets cocktail sont toutefois encore mal compris et d'autres études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes d'actions impliqués chez les invertébrés.

Références

- Behr, A.-C., Plinsch, C., Braeuning, A., Buhrke, T., (2020). Activation of human nuclear receptors by perfluoroalkylated substances (PFAS). *Toxicology in Vitro*, 104700, 0887-2333.
- Booth, L.H., O'Halloran, K., (2013). A comparison of biomarker responses in the earthworm *Aporrectodea caliginosa* to the organophosphorus insecticides diazinon and chlorpyrifos. *Environ. Toxicol. Chem.* 20 (11), 2494–2502.
- Brusseau, M.L., Hunter Andersson, R., Guo, B., (2020). PFAS concentrations in soils : background levels versus contaminated sites. *Sci. Total Environ.* 740, 140017.
- Caudeville, J., (2020). Synthesis of human pathway to poly-and perfluoroalkylated substances (PFAS) and current understanding of health effects. *Environnement, Risques & Santé* 19, 6.
- Charles, S., Veber, P., Delignette-Muller, M.L., (2017). MOSAIC : a web-interface for statistical analyses in ecotoxicology. *Environ. Sci. Pollut. Control Ser.* 25 (12), 11295–11302.
- Chatterjee, N., Walker, G.C., (2017). Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ. Mol. Mutagen.* 58, 235–263.
- Delor, L., Louzon, M., Pelosi, C., Michel, E., Maillet, G., Carronnier, (2023). Ecotoxicity of single and mixture of perfluoroalkyl substances (PFOS and PFOA) in soils to the earthworm *Aporrectodea caliginosa*. *Environmental pollution*. 335, 0269-7491
- Fenton, S. E., Ducatman, A., Boobis, A., DeWitt, J. C., Lau, C., Ng, C., Smith, J. S., & Roberts, S. M., (2021). Per- and Polyfluoroalkyl Substance Toxicity and Human Health Review : Current State of Knowledge and Strategies for Informing Future Research. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 40(3), 606–630.
- Frampton, G.K., Ja'nsch, S., Scott-Fordsmand, J.J., Ro'nbke, J., Van den Brink, P.J., (2006). Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies : a review and analysis using species sensitivity distributions. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2480–2489.
- Gongalsky, K.B., (2021). Soil macrofauna : study problems and perspectives. *Soil Biol. Biochem.* 159, 108281.
- He, W., Megharaj, M., Naidu, R., 2016. Toxicity of perfluorooctanoic acid toward earthworm and enzymatic activities in soil. *Environ. Monit. Assess.* 188 (7), 424.
- ITRC, Interstate Technology Regulatory Council, (2022). Per and Polyfluoroalkylated Substances. Technical and Regulatory Guidance. PFAS Team. <https://pfas-1.itrcweb.org>.
- Kim, S., Thapar, I., Brooks, B., (2021). Epigenetic changes by per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS). *Environ. Pollut.* 279, 116929.
- Luzhna, L., Palak, K., Kovalchuk, O., (2013). Micronuclei in genotoxicity assessment : from genetics to epigenetics and beyond. *Front. Genet.* 4.
- Marques, E., Pfohl, M., Wei, W., Tarantola, G., Ford, L., Amaeze, O., et al., (2022). Replacement per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) are potent modulators of lipogenic and drug metabolizing gene expression signatures in primary human hepatocytes. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 115991, 0041-008X.
- Muruzabal, D., Collins, A., Azqueta, A., 2021. The enzyme-modified comet assay@ Past, present, and future. *Food Chem. Toxicol.* 147, 111865
- Pelosi, C., Joimel, S., & Makowski, D., (2013). Searching for a more sensitive earthworm species to be used in pesticide homologation tests - A meta-analysis. *Chemosphere*, 90(3), 895–900.
- Pierozan, Paula, Kosnik, Marissa, Karlsson, Oskar., (2023). High-content Analysis Shows Synergistic Effects of Low Perfluorooctanoic Acid (PFOS) and Perfluorooctane Sulfonic Acid (PFOA) Mixture Concentrations on Human Breast Epithelial Cell Carcinogenesis, vol. 172. *Environment International*.
- Slyskova, J., Langie, S.A.S., Gaiv#ao, I., Collins, A.R., Azqueta, A., (2014). Genotoxicity and DNA Repair. *Methods in Pharmacology and Toxicology*. Humana Press, New York, NY.
- Xu, D., Li, C., Wen, Y., Liu, W., (2013). Antioxidant defense system responses and DNA damage of earthworms exposed to Perfluorooctane sulfonate (PFOS). *Environ. Pollut.* 174, 121–127.
- Xu, Y., Lindh, C., Fletcher, T., Jakobsson, K., Engstrom, K., (2022). Perfluoroalkyl substances influence DNA methylation in school-age children highly exposed through drinking water contaminated from firefighting foam : a cohort study in Ronneby, Sweden. *Environmental Epigenetics* 8, 1.
- Yasmin, S., D'Souza, D., 2010. Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm : a review. *Applied and Environmental Soil Science* 2010, 678360.

Wang, Z., Li, C., Shao, Y., Xue, W., Wang, N., Xu, X., Zhang, Z., (2021). L2021. Antioxidant defense system responses, lysosomal membrane stability and DNA damage in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to perfluorooctanoic acid : an integrated biomarker approach to evaluating toxicity. *RSC Adv.* 11 (43), 26481–26492.

Zareitalabad, P., Siemens, J., Wichern, F., Amelung, W., Georg Joergensen, R., (2013). Dose-dependent reactions of *Aporrectodea caliginosa* to perfluorooctanoic acid and perfluorooctanesulfonic acid in soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 95, 39–43.

Zheng, X., Shi, Y., Lu, Y., & Xu, X., (2016). Growth inhibition and DNA damage in the earthworm (*Eisenia fetida*) exposed to perfluorooctane sulphonate and perfluorooctanoic acid. *Chemistry and Ecology*, 32(2), 103–116.

Remerciements

Les auteurs tiennent à remercier l'ADEME pour son soutien financier (projet IPANEMA, contrat n° C7-7-7). Ils remercient également la revue *Environmental Pollution* pour la publication de cette étude (Delor et al., 2023).