



HAL
open science

**Mise au point et validation sur sites contaminés
(ETM-HAP) d'un test de biosurveillance en
microcosme : croissance et bioaccumulation par
gastéropode terrestre *Helix Aspersa Aspersa***

Bénédicte Viard-La Rocca

► **To cite this version:**

Bénédicte Viard-La Rocca. Mise au point et validation sur sites contaminés (ETM-HAP) d'un test de biosurveillance en microcosme : croissance et bioaccumulation par gastéropode terrestre *Helix Aspersa Aspersa*. Toxicologie. Université Paul Verlaine - Metz, 2004. Français. NNT : 2004METZ035S . tel-01749557

HAL Id: tel-01749557

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749557v1>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITE DE METZ

UFR Sciences Fondamentales et Appliquées

Laboratoire Biodiversité et Fonctionnement des Ecosystèmes

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources Procédés Produits Environnement

Discipline : Sciences de la Vie

Mention : Toxicologie de l'Environnement

Présentée par

Bénédicte VIARD - LA ROCCA

MISE AU POINT ET VALIDATION, SUR SITES CONTAMINES,
(ETM-HAP) D'UN TEST DE BIOSURVEILLANCE EN

MICROCOSME :

CROISSANCE ET BIOACCUMULATION PAR LE GASTEROPODE

TERRESTRE *HÉLIX ASPERSA ASPERSA*

Soutenue le 5 novembre 2004 le devant le Jury composé de :

Mme Corinne LEYVAL	Directrice LIMOS UMR CNRS 6137, UHP-Nancy	Présidente
M Reinhard DALLINGER	Directeur de Recherche, Innsbruck	Rapporteur
Mme Annette de VAUFLEURY	Maître de Conférences, HDR, Université de Besançon	Rapporteur
Mme Cécile GRAND	Ingénieur ADEME	Examineur
M Jean-Claude PIHAN	Professeur à l'Université de Metz, Directeur de thèse	

Remerciements

En premier lieu, je tiens tout particulièrement à remercier le Professeur Jean-Claude PIHAN, directeur de cette thèse, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche depuis mon DEA. Ses nombreux conseils, sa qualité d'écoute, son exigence scientifique ainsi que sa confiance ont été précieux et m'ont permis de mener à terme cette recherche, dans les meilleures conditions.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame Annette de VAUFLEURY et Monsieur Reinhard DALLINGER pour avoir accepté, malgré leur charge de travail respective, d'être les rapporteurs de ce travail.

Je remercie également Mesdames Corinne LEYVAL et Cécile GRAND, ainsi que Monsieur Olivier FAROT pour l'honneur qu'ils me font de participer à ce jury.

Merci au CREED, et tout particulièrement aux collaborateurs rencontrés au cours de ce travail Messieurs VOURYOT et BAILLEUL, pour la confiance qu'ils m'ont accordée et leur précieuse aide lors des expériences réalisées sur leurs sites.

Tous mes remerciements à Etienne et Philippe, pour leur présence et leurs coups de mains, sans qui les analyses et le terrain auraient été beaucoup moins faciles ; merci aussi à Monsieur Jaafar GHANBAJA et Antoinette MEYER pour leur disponibilité et leur précieuse aide apportée en microscopie.

Merci à toutes les personnes croisées dans les bureaux ou lors de pauses cafés pour leur soutien et que je n'oublierai pas : Steph bien sûr mais aussi Nath, Catherine, Virginie, Edwige, Ingrid, Chafik, Manu et tous les autres déjà partis vers d'autres horizons....et Mireille sans qui j'aurais été une étudiante « sans bureau fixe » ! Merci pour ton soutien, tes coups de pouce, ta présence et ton amitié.

Enfin, un grand merci à toute ma famille, ma maman, Pierre, Carole et Emmanuel et tous les *La Rocca*, de Bar sur Aube à Metzervisse, et mes amis, Jojo, Ben, Ludo, Caro, Marie, Isa et Roger, dont le soutien a été essentiel pendant ses années.

Alors que je m'envole vers de nouveaux horizons, merci à vous tous et *merci à toi Papa....*

SOMMAIRE

Liste des Abréviations

Liste des Figures

Liste des Tableaux

Introduction Générale

1

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

3

CHAPITRE I : LES SITES ET SOLS POLLUÉS : ORIGINE DES CONTAMINANTS, COMPORTEMENT ET REGLEMENTATION

<u>I.1. Les différents polluants des sols</u>	4
I.1.1. Les éléments métalliques	5
<i>I.1.1.1. Fond pédogéochimique et contamination naturelle</i>	6
<i>I.1.1.2. Apports naturels et anthropiques</i>	6
I.1.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques	13
<u>I.2. Comportement des polluants dans le sol</u>	16
I.2.1. Mobilité et biodisponibilité des éléments métalliques	16
<i>I.2.1.1. Paramètres influençant la mobilité des éléments métalliques</i>	17
<i>I.2.1.2. Evaluation de la biodisponibilité des éléments métalliques</i>	19
<i>I.2.1.3. Transfert des éléments métalliques du sol vers les plantes</i>	20
I.2.1.3.1. Les paramètres physico-chimiques du sol	25
I.2.1.3.2. Relations entre teneurs en EM du sol et les plantes	26
I.2.1.3.3. Les plantes hyperaccumulatrices	27
<i>I.2.1.4. Transfert des polluants vers les invertébrés terrestres</i>	29
I.2.2. Devenir des HAP dans les sols	33
<u>I.3. Réglementation</u>	34

CHAPITRE II : DEVENIR DES POLLUANTS DANS LES ORGANISMES ET TOXICITE

<u>II.1. Devenir des polluants dans les organismes</u>	38
II.1.1. Devenir des éléments métalliques dans les plantes	38
II.1.2. Devenir des éléments métalliques dans les invertébrés	39
<i>II.1.2.1. Principales voies d'entrée dans l'organisme</i>	39
<i>II.1.2.2. Différentes formes de stockage des EM</i>	39
II.1.2.2.1. Les granules intracellulaires	39
II.1.2.2.1. Les protéines liant les métaux	40
<i>II.1.2.3. Accumulation des EM</i>	41
II.1.3. Devenir des polluants organiques	41
<u>II.2. Evaluation de la toxicité des polluants</u>	42
II.2.1. Les organismes utilisés	42
II.2.2. Les tests écotoxicologiques	43

II.2.3. Toxicité aiguë et chronique des polluants	44
II.2.3.1. <i>Le cadmium (22/01/2004)</i>	44
II.2.3.1.1. Sources d'exposition et comportement	
II.2.3.1.2. Ecotoxicité	
II.2.3.1.3. Toxicité pour l'homme	
II.2.3.2. <i>Le chrome (02/02/2004)</i>	46
II.2.3.2.1. Sources d'exposition et comportement	
II.2.3.2.2. Ecotoxicité	
II.2.3.2.3. Toxicité pour l'homme	
II.2.3.3. <i>Le cuivre (18/03/2004)</i>	47
II.2.3.3.1. Sources d'exposition et comportement	
II.2.3.3.2. Ecotoxicité	
II.2.3.3.3. Toxicité pour l'homme	
II.2.3.4. <i>Le plomb (03/02/2003)</i>	48
II.2.3.4.1. Sources d'exposition et comportement	
II.2.3.4.2. Ecotoxicité	
II.2.3.4.3. Toxicité pour l'homme	
II.2.3.5. <i>Le zinc</i>	50
II.2.3.5.1. Sources d'exposition et devenir	
II.2.3.5.2. Ecotoxicité	
II.2.3.5.3. Toxicité pour l'homme	
II.2.3.6. <i>Cas des autres métaux</i>	51
II.2.3.7. <i>Les HAPs</i>	52
<u>II.3. Evaluation des risques environnementaux (ERA) et pour la santé humaine</u>	52

CHAPITRE III : LES GASTEROPODES TERRESTRES : DES TESTS ECOTOXICOLOGIQUES EN LABORATOIRE A LA BIOSURVEILLANCE DES SITES

<u>III.1. Evaluation la toxicité de contaminants en laboratoire</u>	54
III.1.1. Tests écotoxicologiques	54
III.1.2. Test AFNOR	56
III.1.2.1. <i>Paramètres environnementaux du test</i>	57
III.1.2.2. <i>Détermination des effets sur la croissance</i>	57
<u>III.2. Biosurveillance de sites : Réalisation de diagnostic de contamination</u>	58
III.2.1. La bioindication	58
III.2.2. Biosurveillance passive et active	59
III.2.3. Diagnostic de contamination	61

MATERIELS ET METHODES

63

CHAPITRE I : SYSTÉMATIQUE DES GASTÉROPODES ÉTUDIÉS (KERNEY AND CAMERON, 1987)

<u>I.1. Description d'<i>Helix aspersa aspersa</i> (Müller, 1774)</u>	64
<u>I.2. Description des Gastéropodes autochtones prélevés sur les sites d'étude</u>	64

CHAPITRE II : EXPÉRIENCES DE BIOSURVEILLANCE ACTIVE ; MISE AU POINT DU DISPOSITIF EXPÉRIMENTAL À IMPLANTER SUR LES SITES À DIAGNOSTIQUER (VIARD *et al.*, 2004)

Viard *et al.*, 2004, Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination, *Journal of Environmental Monitoring*, 6: 103-107. 66

CHAPITRE III : LES DIFFÉRENTS SITES D'ÉTUDE RETENUS

<u>III.1. Site 1 : Périphérie du centre de Metz</u>	73
<u>III.2. Site 2 : Ancienne cokerie à Homécourt (54)</u>	74
<u>III.3. Site 3 : SOTRENOR à Courrières (62)</u>	75
III.3.1. Présentation de l'activité industrielle	75
III.3.2. Localisation des microcosmes	75
<u>III.4. Site 4 : Hargarten aux Mines (57)</u>	76
<u>III.5. Site 5 : CEDILOR à Malancourt la Montagne (57)</u>	77
III.5.1. Présentation de l'activité industrielle	77
III.5.2. Localisation des microcosmes	78

CHAPITRE IV : ÉTUDE DE LA SUPPLÉMENTATION EN ÉLÉMENTS MÉTALLIQUES DE LA NOURRITURE FOURNIE AUX ESCARGOTS DANS LES ÉLEVAGES FRANÇAIS

<u>IV.1. Origine des prélèvements</u>	80
<u>IV.2. Nature et rythme des prélèvements</u>	80
<u>IV.3. Identification bactérienne et analyse des métaux</u>	82

CHAPITRE V : CARACTÉRISATION DES ÉCHANTILLONS ET MÉTHODES D'ANALYSES DES ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES, DANS LES DIFFÉRENTS COMPARTIMENTS DES MICROCOSMES, ET DES HAP

<u>V.1. Compartiment 1 : le sol</u>	83
V.1.1. Teneur totale en éléments traces métalliques	85
V.1.2. Fraction métallique biodisponible	85
<u>V.2. Compartiment 2 : la végétation</u>	86
<u>V.3. Compartiment 3 : les organismes vivants</u>	86
<u>V.4. Dosage des métaux</u>	87
<u>V.5. Dosage des HAPs dans les escargots</u>	88

CHAPITRE VI : LOCALISATION INTRACELLULAIRE DES ÉLÉMENTS TRACES MÉTALLIQUES DANS LES ESCARGOTS

<u>VI.1. Protocole d'intoxication des escargots</u>	89
<u>VI.2. Microscopie optique</u>	89
VI.2.1. Fixation	89
VI.2.2. Inclusion	89
VI.2.3. Coupe	90
VI.2.4. Colorations (Martoja et Martoja-Pierson, 1967 ; Gabe 1968)	90

VI.2.4.1. Coloration au bleu alcian associé à des colorants de fond	90
VI.2.4.2. Coloration à l'acide rubéanhydrique	90
VI.2.5. Montage	91
<u>VI.3. Microscopie électronique</u>	91
<u>VI.4. MET associée à l'analyse en rayons X (EDX)</u>	91

CHAPITRE VII : TRAITEMENT STATISTIQUE DES DONNÉES 93

RESULTATS

<i>Première partie : Etude méthodologique</i>	94
---	----

CHAPITRE I : ÉTUDE INTEGREE DE LA CONTAMINATION EN METAUX LOURDS (Pb, ZN, Cd) EN MILIEU AUTOROUTIER : ACCUMULATION DANS LE SOL, LES GRAMINÉES ET LES ESCARGOTS TERRESTRES.

Viard *et al.*, 2004a, Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: bioaccumulation in soil, Graminaceae and land snail, *Chemosphere*, 55: 1349-1359. 95

CHAPITRE II : DEFINITION DES CONDITIONS D'EMPLOI *IN SITU*, DES MICROCOSMES ELABORES, EN FONCTION DES VARIATIONS SAISONNIERES

<u>II.1. Enregistrement de la température et de l'hygrométrie</u>	107
<u>II.2. Evolution de la croissance pondérale et du diamètre</u>	109
<u>II.3. Accumulation en métaux lourds dans les escargots</u>	110
II.3.1. En 2001	110
II.3.2. En 2002	112
II.3.3. En 2003	114
<u>II.4. Teneurs en métaux lourds dans les différents compartiments des microcosmes</u>	115
II.4.1. Le sol	115
II.4.2. La végétation : le trèfle	117
<u>II.5. Discussion et Conclusions</u>	119
II.5.1. Relation entre les paramètres environnementaux et la croissance	119
II.5.2. Bioindication de la qualité du sol par <i>Helix aspersa aspersa</i> - Relation entre les concentrations dans le sol et dans les viscères des escargots	121

CHAPITRE III : BIOSURVEILLANCE DE DIFFERENTS SITES

<u>III.1. Biosurveillance d'un site présentant une contamination naturelle : Hargarten aux Mines (57)</u>	126
III.1.1. Enregistrement de la température et de l'hygrométrie	126
III.1.2. Evolution de la croissance pondérale et du diamètre	127
III.1.3. Accumulation en métaux lourds dans les escargots	127
III.1.4. Caractérisation du sol et de la végétation du site	129
III.1.5. Discussion	131
<u>III.2. Biosurveillance de sites industriels</u>	133
III.2.1. Un site industriel en activité : SOTRENOR (62)	

III.2.1.1. Enregistrement de la température et de l'hygrométrie	133
III.2.1.2. Evolution de la croissance pondérale et du diamètre	134
III.2.1.3. Accumulation en métaux lourds dans les escargots	136
III.2.1.3.1. Concentrations en métaux dans les escargots transférés	136
III.2.1.3.2. Concentrations en métaux dans les escargots autochtones récoltés	138
III.2.1.4. Caractérisation du sol et du trèfle du site	140
III.2.1.5. Discussion	143
III.2.2. Ancienne cokerie d'Homécourt (54)	146
III.2.2.1. Enregistrement de la température et de l'hygrométrie	146
III.2.2.2. Evolution de la croissance pondérale et du diamètre moyen	146
III.2.2.3. Accumulation en métaux lourds dans les escargots	147
III.2.2.3.1. Concentrations en métaux dans les escargots transférés	147
III.2.2.3.2. Concentrations en métaux dans les escargots autochtones récoltés	150
III.2.2.4. Caractérisation du sol et du trèfle du site	151
III.2.2.5. Dosages des HAPs dans le sol et les escargots transférés à Homécourt	153
III.2.2.6. Discussion	155
III.2.3. Intérêt des escargots autochtones dans le diagnostic de sites industriels	157
<u>III.3. Evaluation des risques sanitaires</u>	158

RESULTATS

Deuxième partie

Etude écotoxicologique appliquée concernant le cuivre : problèmes liés à l'héliciculture et accumulation

CHAPITRE IV : PROBLEMATIQUE DE LA SUPPLEMENTATION EN ELEMENTS METALLIQUES, DONT LE CUIVRE, DE LA NOURRITURE DES ESCARGOTS D'ELEVAGE ET COMPORTEMENT DES ELEMENTS METALLIQUES.

<u>IV.1. Mortalité dans les élevages et identification bactérienne</u>	164
<u>IV.2. Bioaccumulation des métaux lourds par <i>Helix aspersa maxima</i> (Tableau 40b)</u>	167
IV.2.1. Elevage E1	167
IV.2.2. Elevage E2	169
IV.2.3. Elevage E3	171
<u>IV.3. Cinétique d'accumulation des éléments métalliques</u>	173
IV.3.1. Cinétique d'accumulation du cuivre	173
IV.3.2. Cinétique d'accumulation du zinc	174
IV.3.3. Cinétique d'accumulation du plomb et du cadmium	175
<u>IV.4. Discussion</u>	175
IV.4.1. Nature de la flore bactérienne dans les escargots d'élevage	175
IV.4.2. Bioaccumulation des éléments métalliques dans les escargots d'élevage	175
IV.4.3. Existe-t-il une relation entre la flore bactérienne et l'accumulation des EM?	180
IV.4.4. Evaluation des risques sanitaires	181

CHAPITRE V : LOCALISATION INTRACELLULAIRE DU CUIVRE DANS LA SOLE PEDIEUSE DES ESCARGOTS

183

CHAPITRE VI : DISCUSSION GENERALE

<u>VI.1. Influence des facteurs externes sur la croissance des escargots</u>	192
VI.1.1. Influence des teneurs en éléments métalliques dans le sol et la végétation	192
VI.1.2. Influence de la température	194
VI.1.3. Intérêt du paramètre croissance lors de la réalisation de diagnostic de sites contaminés	195
<u>VI.2. Capacité bioindicatrice de l'escargot <i>Helix aspersa aspersa</i></u>	196
VI.2.1. Influence des paramètres physico-chimiques du sol	196
VI.2.2. Validation des grilles de contamination existantes	199
<u>VI.3. Evaluation des capacités de bioindication des HAP par l'escargot H.a.a.</u>	200

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

203

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

205

ANNEXES

- Annexe 1** Formules de principaux HAPs
- Annexe 2** Classification des métaux selon Nieboer et Richardson (1980)
- Annexe 3** Plan du site de l'ancienne cokerie d'Homécourt et localisation des différents points de prélèvements des échantillons de sol par le LECES
- Annexe 4** Concentrations éléments métalliques et en HAPs dans le sol d'Homécourt, au niveau des prélèvements réalisés par le LECES
- Annexe 5** Cartographie de la région d'Hargarten aux Mines et concentrations en éléments métalliques dans cette région (dosages réalisés par le BRGM)
- Annexe 6** Données brutes de croissance et de bioaccumulation des EM pour les escargots transférés sur le site de CEDILOR en 2001, 2002 et 2003
- Annexe 7** Valeurs de Constat d'Impact, pour les sols, pour un usage sensible ou non sensible (usage industriel) et Valeur de Définition Source Sol (BRGM, 2002)
- Annexe 8** Données brutes de croissance et de bioaccumulation des EM pour les escargots transférés sur le site d'Hargarten aux Mines
- Annexe 9** Données brutes de croissance pour les escargots transférés sur le site de SOTRENOR au niveau des stations S1, S2, S3 et S4
- Annexe 10** Données brutes de croissance et de bioaccumulation des EM pour les escargots transférés sur le site d'Homécourt

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Baa	benzo(a)anthracène
BAF	facteur de bioaccumulation
Bap	benzo(a)pyrène
Bbf	benzo(b)fluoranthène
Bkf	benzo(k)fluoranthène
Bghip	benzo(ghi)pérylène
CEC	capacité d'échange cationique
CEx	concentration efficace
CMEO	concentration minimale avec effet observé (=LOEC : Lowest observed effect concentration)
CREED	Centre de Recherche pour l'Environnement, l'Energie et le Déchet
CSEO	concentration maximale sans effet observé (= NOEC : No observed effect concentration)
Dbaha	dibenzo(ah)anthracène
DJT ou DHT	dose journalière ou hebdomadaire tolérable
DJR ou DHR	dose journalière ou hebdomadaire recommandée
DLx	dose létale
DTPA	acide Diéthylène Triamine PentaAcétique
EDTA	acide Ethylène Diamine TrétraAcétique
EM	éléments métalliques
ERA	Environmental Risk Assessment
GISFI	Groupeement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles
H.a.a.	<i>Helix aspersa aspersa</i>
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
IGCPM	Indice Global de Contamination Polymétallique
Ip	indénopyrène
LIMOS	Laboratoire d'Interactions Microorganismes-Minéraux-Matières Organiques dans les Sols
MET	Microscope Electronique à Transmission
MT	métallothionéine
MO	matière organique
MS	matière sèche
NF	Norme française

PEC	concentration prédite dans l'environnement
PNEC	concentration prédite dans l'environnement sans effet
PS	poids sec
Redox	Potentiel oxydo-réducteur
VDSS	Valeur de Définition Source Sol
VCI	Valeur Constat d'Impact
VCIus	Valeur Constat d'Impact Usage Sensible
VCIuns	Valeur Constat d'Impact Usage Non Sensible

LISTE DES FIGURES

Synthèse Bibliographique

Figure 1	Estimation des apports annuels sur les sols français en cuivre, zinc, plomb et cadmium en fonction des sources	8
Figure 2	Schéma d'acquisition des teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols	13
Figure 3	Répartition des éléments métalliques entre les compartiments du sol, sous les différentes formes possibles, avec indication de leur mobilité par des flèches	16
Figure 4	Différentes réponses des plantes à la présence de métaux dans les sols	28
Figure 5	Différentes voies de contamination d' <i>Helix aspersa aspersa</i>	29

Matériels et Méthodes

Chapitre I

Figure 6	<i>Helix aspersa aspersa</i> adultes et juvéniles dans leur milieu naturel	64
----------	--	----

Chapitre II

Figure 7	Microcosme implanté sur les sites	72
----------	-----------------------------------	----

Chapitre III

Figure 8	Implantation des microcosmes sur les espaces verts, dans l'enceinte de l'Université	73
Figure 9	Vue aérienne du site de l'ancienne cokerie d'Homécourt (54), avec encadrée en rouge, la future zone d'implantation des dispositifs lysimétriques et la localisation des microcosmes installés sur la parcelle du LIMOS	74
Figures 10	Photographies des coquilles de <i>Ceruella virgata</i> (a), <i>Monacha cartusiana</i> (b) et schéma de l'implantation de l'usine SOTRENOR avec la localisation des microcosmes en 2003 au niveau des quatre stations retenues (c).	75
Figure 11	Zone d'implantation des microcosmes à Hargarten aux Mines, en lisière de forêt	77
Figure 12	Schéma de l'implantation de l'usine CEDILOR et localisation des microcosmes en 2001, 2002 et 2003 à proximité de l'unité de tri des DTQD (1) et de l'évapo-incinérateur (2)	78
Figure 13a	Unité de tri des DTQD et incinérateur au-delà des microcosmes implantés et de la voie de circulation	79
Figure 13b	Vue de l'emplacement des microcosmes et lieu de récolte des escargots autochtones	79

Chapitre V

Figure 14	Récapitulatif des différentes analyses réalisées sur un même échantillon de sol	83
Figure 15	Diagramme triangulaire de classification des sols en fonction de leur texture	84
Figure 16	Anatomie d' <i>Helix aspersa aspersa</i> sorti de sa coquille, avec représentation de la ligne de dissection séparant le pied des viscères et des principaux organes internes	86

Chapitre VI

Figure 17	Principe de l'interaction électron-matière	92
-----------	--	----

Résultats

Chapitre II

Figure 18	Evolution de la température et de l'hygrométrie au cours des expériences menées à CEDILOR en 2001, 2002 et 2003	107
Figure 19	Evolution du poids moyen des escargots transférés dans les microcosmes en 2001 (a), 2002 (b) et 2003 (c) et de leur diamètre moyen au cours des expériences en 2001 (d), 2002 (e) et 2003 (f).	109
Figure 20	Concentrations en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés en 2001 et des escargots témoins placés en laboratoire (témoin labo) ou sur un site de contrôle (témoin terrain), exprimées en mg.kg ⁻¹ de poids sec.	111
Figure 21	Concentrations en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés en 2002 et des escargots témoins placés en laboratoire (témoin labo) ou sur un site de contrôle (témoin terrain), exprimées en mg.kg ⁻¹ de poids sec.	112
Figure 22	Concentrations en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés en 2003 et des escargots témoins placés en laboratoire (témoin labo) ou sur un site de contrôle (témoin terrain), exprimées en mg.kg ⁻¹ de poids sec.	114
Figure 23	Teneurs en éléments métalliques, dans le sol du site de CEDILOR, évaluées par rapport au seuil fixé par la norme AFNOR NF U 44-041, en 2001, 2002 et 2003.	116
Figure 24	Concentrations moyennes en éléments métalliques dans le trèfle ayant poussé à l'intérieur des trois microcosmes en 2001, 2002 et 2003 en mg.kg ⁻¹ PS, sauf pour le fer exprimé en g.kg ⁻¹ PS.	118
Figure 25	Relation entre les températures moyennes mesurées en 2001, 2002, 2003 et les taux de croissance des escargots lors de ces expériences	120
Figure 26	Evolution des concentrations moyennes, entre les trois microcosmes, en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés sur le site de CEDILOR entre 2001, 2002 et 2003.	122

Chapitre III

Figure 27	Evolution de la température et de l'hygrométrie au cours de l'expérience menée à Hargarten aux Mines en 2003.	126
Figure 28	Evolution du poids et du diamètre moyen des escargots transférés à Hargarten aux Mines en automne 2003 et des « témoins laboratoire ».	127
Figure 29	Concentrations en éléments métalliques, en mg.kg^{-1} PS, dans les viscères des escargots transférés à Hargarten aux Mines et dans les témoins laboratoire.	128
Figure 30	Concentrations (Cc) en éléments métalliques, dans le sol du site d'Hargarten aux Mines, évaluées par rapport au seuil fixé par la norme AFNOR NF U 44-041.	129
Figure 31	Concentrations en éléments métalliques dans la végétation (trèfle autochtone) à l'intérieur des microcosmes implantés sur le site d'Hargarten aux Mines.	130
Figure 32	Evolution de la température et de l'hygrométrie au cours de l'expérience menée sur le site de SOTRENOR en 2003, au niveau de la station expérimentale 2.	133
Figure 33	Evolution des poids et diamètres moyens des escargots transférés dans chaque microcosme, implantés sur chacune des quatre stations du site de SOTRENOR, en 2003.	135
Figure 34	Evolution du poids et du diamètre moyen des escargots transférés sur le site de SOTRENOR, pour chacune des stations S1, S2, S3 et S4, comparée à celle des « témoins laboratoire ».	136
Figure 35	Concentrations moyennes en éléments métalliques (mg.kg^{-1} PS) dans les viscères des escargots transférés aux stations S1-S2-S3-S4 et dans les viscères des « témoins laboratoire ».	136
Figure 36	Concentrations en éléments métalliques dans les viscères des escargots autochtones récoltés sur le site de SOTRENOR, avec les niveaux des grilles de contamination définies par Pihan (2001) pour les H.a.a. autochtones récoltés.	138
Figure 37	Concentrations (Cc) en éléments métalliques, dans le sol des quatre stations du site de SOTRENOR (S1-S2/S3-S4), évaluées par rapport au seuil fixé par la norme AFNOR NF U 44-041.	141
Figure 38	Concentrations en éléments métalliques dans le trèfle semé sur les stations S1-S2-S3-S4 du site de SOTRENOR, en mg.kg^{-1} PS.	142
Figure 39	Evolution de la température et de l'hygrométrie au cours de l'expérience menée sur le site d'Homécourt en 2002.	146

- Figure 40 Evolution du poids (en g) et du diamètre moyen (en mm) des escargots transférés sur le site d'Homécourt en 2002 dans les microcosmes M1-M2-M3 et dans les témoins, placés en conditions de laboratoire. 147
- Figure 41 Concentrations moyennes (en mg.kg⁻¹ PS) en éléments métalliques mesurées dans les viscères des escargots transférés dans les microcosmes M1-M2-M3 et dans les « témoins laboratoire ». 148
- Figure 42 Comparaison entre les concentrations en métaux mesurées dans les escargots autochtones *Ceriuella neglecta* du site d'Homécourt et les concentrations moyennes dans les escargots H.a.a. transférés dans les trois microcosmes. 151
- Figure 43 Concentrations (Cc) en éléments métalliques, dans le sol de la parcelle d'étude d'Homécourt, évaluées par rapport au seuil fixé par la norme AFNOR NF U 44-041. 152
- Figure 44 Concentrations en éléments métalliques, en mg.kg⁻¹ PS, dans la luzerne de la parcelle d' Homécourt. 153

Chapitre IV

- Figure 45 Evolution de la flore bactérienne des escargots des trois élevages de leur naissance à 9 mois. 165
- Figure 46 Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd dans les pontes, les jeunes éclos puis dans le pied (a) et les viscères (b1 et b2) des escargots âgés de 1, 3 et 5 mois appartenant à l'élevage E1. 167
- Figure 47 Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd mesurées dans la nourriture à 5 mois (mg.kg⁻¹ PS et µg.l⁻¹ pour l'eau) (a) et le sol, en mg.kg⁻¹ PS, (b) de l'élevage E1 à T0, 1 mois et 5 mois. 168
- Figure 48 Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd dans les pontes, les jeunes éclos de 10 jours, dans le pied (a) et les viscères (b1 et b2) des escargots âgés de 1, 3 et 5 mois appartenant à l'élevage E2. 169
- Figure 49 Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd dans la nourriture (mg.kg⁻¹ PS), l'eau (µg.l⁻¹) (a) et le sol (mg.kg⁻¹ PS) (b) provenant de l'élevage E2. 170
- Figure 50 Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd dans le pied (a1 et a2) et les viscères (b1 et b2) des escargots âgés de 5 et 9 mois appartenant à l'élevage E3. 171
- Figure 51 Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd mesurées dans les végétaux, la farine, le sol (mg.kg⁻¹ PS) et l'eau (µg.l⁻¹) provenant de l'élevage E3. 172
- Figure 52 Evolution des concentrations en cuivre dans les escargots des élevages E1 et E2, de leur naissance (mois « -1 ») à 1 mois de vie dans les parcs. 173

- Figure 53 Evolution des concentrations en zinc dans le pied des escargots des élevages E1 et E2, de leur naissance (mois « -1 ») à 1 mois de vie dans les parcs. 174
- Figure 54 Evolution des concentrations en zinc dans les viscères des escargots des élevages E1 et E2 du premier au cinquième mois d'élevage en parc. 174

Chapitre V

- Figure 55 Photographies (microscopie optique) de cellules sanguines, circulant dans les lacunes sanguines de la sole pédieuse d'un escargot contaminé par 5 % de poudre de cuivre dans la nourriture. 183
- Figures 56 Photographies (MET) et microanalyse de cellules sanguines circulantes, ou macrophages, dans les lacunes sanguines du pied d'*Helix aspersa aspersa* contaminé par l'ajout de poudre de cuivre (5%) à la farine Helixal (N : noyau ; P : phagolysosome ou « corps résiduel ») 184
- Figure 57 Photographie (microscopie optique) d'une cellule à calcium dans le tissu conjonctif de la sole pédieuse d'un escargot (phot de gauche) et d'un amas de granules de carbonate de calcium (photo de droite). 186
- Figure 58 Concrétions de carbonate de calcium (MET, grossissement : X 3800), à différents stades de biogenèse, présents dans une cellule à calcium du tissu conjonctif du pied d'*Helix aspersa aspersa*, et microanalyse de ces concrétions. 187
- Figure 59 Photographies, en microscopie optique, de cellules à pores dans le tissu conjonctif de la sole pédieuse d'un escargot contaminé, à partir de lames colorées à l'acide rubéanhydrique. 188
- Figure 60 Photographie de granules non concrétionnaires présents dans une cellule à pores du pied d'*Helix aspersa aspersa*, contaminé par l'ajout de poudre de cuivre (5%) à la farine Helixal (MET, grossissement : X 27500). 189
- Figure 61 Mise en évidence du cuivre (coloration à l'acide rubéanhydrique) dans la vacuole apicale d'un néphrocyte d'un escargot contaminé en présence de 5% de poudre de cuivre dans l'aliment. 190
- Figure 62 Mise en évidence de cuivre dans une cellule basophile de la glande digestive, en microscopie optique, après coloration à l'acide rubéanhydrique. 190

Chapitre VI

- Figure 63 Relation linéaire existant entre le taux de croissance observé sur les sites et les températures moyennes mesurées, avec les limites de l'intervalle de confiance à 5%. 194

Figure 64 Relation entre les concentrations en HAP dans le sol et celles dans les viscères des escargots transférés sur le site 201

Figure 65 Relation entre les concentrations en HAP dans le sol et les viscères des escargots transférés pour les HAP à 3 cycles (a : phénanthrène, acénaphthène, anthracène et Baa) et pour les HAP à 4 cycles (b : fluoranthène, pyrène et chrysène). 201

LISTE DES TABLEAUX

Synthèse Bibliographique

Chapitre I

Tableau 1	Caractère essentiel et pouvoir toxique des éléments traces vis-à-vis des plantes et des animaux, dans l'environnement terrestre	5
Tableau 2	Teneurs totales en éléments métalliques dans les sols français (Baize, 2000) et fond géochimique du bassin versant de l'Orne, Moselle (Bonnefoy et Bourg, 1985) en mg.kg^{-1} de matière sèche MS	6
Tableau 3a	Liste non exhaustive des teneurs minimum et maximum ou des teneurs moyennes en éléments traces métalliques dans les sols (en mg.kg^{-1} poids sec) rapportées par différents auteurs, en fonction des caractéristiques des sols	9
Tableau 3b	Liste non exhaustive des teneurs minimum et maximum ou des teneurs moyennes en éléments traces métalliques dans les sols (en mg.kg^{-1} poids sec) rapportées par différents auteurs, en fonction des caractéristiques des sols	11
Tableau 4	Liste non exhaustive des teneurs minimum et maximum ou des teneurs moyennes en hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les sols (en $\mu\text{g.kg}^{-1}$) rapportées par différents auteurs	15
Tableau 5	Influence du pH et du potentiel redox sur la mobilité des éléments métalliques étudiés	19
Tableau 6	Liste non exhaustive des teneurs minimum et maximum ou des teneurs moyennes en éléments traces métalliques dans les sols et dans les plantes récoltées dessus (en mg.kg^{-1} poids sec) rapportées par différents auteurs, en fonction des caractéristiques des sols	21
Tableau 7	Coefficients de transfert (CT) des éléments métalliques entre le sol et les plantes	25
Tableau 8	Biodisponibilité des éléments métalliques pour les plantes en fonction des conditions édaphiques	26
Tableau 9	Concentrations en éléments métalliques dans les parties aériennes des plantes (Kabata-Pendias and Pendias, 1986) en mg.kg^{-1} de poids sec	28
Tableau 10	Teneurs en éléments métalliques en mg.kg^{-1} PS, rapportées par différents auteurs, dans les différents maillons de chaîne alimentaire	32
Tableau 11	Normes « sols » en vigueur aux Pays Bas pour les HAP et classification des sols en fonction de leurs concentrations en mg.kg^{-1} de poids sec (PS)	35

Tableau 12	Différentes normes concernant les limites des teneurs totales en éléments métalliques dans les sols, en mg.kg ⁻¹ de poids sec	35
Tableau 13	Concentrations de base en éléments métalliques (mg.kg ⁻¹ PS) pour les Flandres, Belgique, en fonction du contenu des sols en argiles et carbone organique Corg	36

Chapitre II

Tableau 14	Classification des invertébrés terrestres selon Boháč et Pospíšil (1989) et les résultats obtenus par Dallinger (1993) pour quelques gastéropodes terrestres	41
Tableau 15	Différents types de réponses étudiées chez les organismes bioindicateurs de la faune du sol	43
Tableau 16	Toxicité du chlorure de cadmium sur différents invertébrés terrestres	45
Tableau 17	Toxicité du chrome sur différents invertébrés terrestres	46
Tableau 18	Toxicité du cuivre sur différents invertébrés terrestres	48
Tableau 19	Toxicité du plomb sur différents invertébrés terrestres	49
Tableau 20	Toxicité du zinc sur différents invertébrés terrestres	50

Chapitre III

Tableau 21	Concentrations, en µg.g ⁻¹ , de cuivre, zinc, plomb, cadmium et chrome ayant des effets sur la croissance, le taux de consommation et la fécondité de différentes espèces de gastéropodes terrestres, estimés grâce au calcul des NOEC, LOEC, CE 20 et CE 50	55
Tableau 22	Concentration en EM, en mg.kg ⁻¹ PS dans différentes espèces de gastéropodes terrestres exposées à différentes sources de contamination	60
Tableau 23	Classes de contamination des sites (1 : témoin, 2 : ville et trafic, 3 : mine) en fonction des concentrations en éléments métalliques dans les viscères des gastéropodes en mg/kg ⁻¹ PS	61
Tableau 24	Grille de contamination pour les viscères d' <i>Helix aspersa</i> , en mg.kg ⁻¹ de PS	62

Matériels et Méthodes

Tableau 25	Protocole de prélèvement des échantillons dans les élevages hélicoles	81
Tableau 26	Classes granulométriques utilisées en pédologie	84
Tableau 27	Limites de détection des métaux en Spectroscopie d'Absorption Atomique à flamme et en four (µg.l ⁻¹)	88

Résultats

Chapitre II

Tableau 28	IGCPM du site de CEDILOR en 2001.	112
------------	-----------------------------------	-----

Tableau 29	IGCPM du site de CEDILOR en 2002.	113
Tableau 30	IGCPM du site de CEDILOR en 2003.	115
Tableau 31	Evolution des teneurs en EM dans les viscères des escargots transférés (classes de contamination de I à III selon Pihan, 2001) comparée à l'évolution des teneurs dans le sol du site de CEDILOR.	123

Chapitre III

Tableau 32	Classes de contamination, concernant les viscères (Pihan, 2001), pour les témoins laboratoire et les escargots transférés sur le site d'Hargarten aux Mines, dans M1-M2 et M3.	129
Tableau 33	Comparaison entre les niveaux de bioaccumulation en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés, par rapport aux témoins, et les niveaux atteints dans les sols par rapport aux seuils en vigueur en France et aux Pays-Bas.	132
Tableau 34	Classes de contamination, concernant les viscères (Pihan, 2001), pour les « témoins labo » et les escargots transférés au niveau des stations S1-S2-S3-S4, sur le site de SOTRENOR.	138
Tableau 35	Classes de contamination des escargots H.a.a. transférés sur la station 2, comparées à celles des H.a.a. autochtones récoltés au niveau de cette même station.	140
Tableau 36	Comparaison entre les niveaux de bioaccumulation en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés, par rapport aux témoins « laboratoire » et aux <i>Helix aspersa aspersa</i> autochtones de la station S2, et les niveaux atteints dans les sols par rapport aux seuils en vigueur en France et aux Pays-Bas.	145
Tableau 37	Classes de contamination, concernant les viscères (Pihan, 2001), pour les témoins laboratoire, les escargots transférés dans les microcosmes M1-M2-M3 et classe moyenne retenue lors de cette expérience de biosurveillance active sur le site d'Homécourt.	149
Tableau 38	Dosage des 16 HAP (en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ PS) par l'IRH dans le pied et les viscères d'escargots transférés (n=2 individus par microcosme) et teneurs en HAP dans le sol de la parcelle expérimentale du LIMOS en mg.kg^{-1} MS.	154
Tableau 39	Comparaison entre les niveaux de bioaccumulation en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés, par rapport aux témoins et aux escargots autochtones, et les niveaux atteints dans les sols, par rapport aux seuils en vigueur en France et aux Pays Bas.	156
Tableau 40	Détermination des concentrations en métal tolérables dans les escargots, lors de leur consommation, à partir des doses hebdomadaires tolérables (DHT) pour le cuivre, le	

plomb et le cadmium, et de la dose journalière recommandée (DJR) pour le zinc, fournies par l'OMS. 159

Chapitre IV

Tableau 41a	Composition et évolution de la flore bactérienne à Gram négatif chez les escargots des élevages E1, E2 et E3	165
Tableau 41b	Concentration en métaux (Cu, Zn, Pb, Cd) dans le pied P, les viscères V de H.a. et dans certains éléments du biotope (sol et aliment) en mg.kg^{-1} PS \pm écart-type et dans l'eau en $\mu\text{g.l}^{-1}$, pour les élevages E1, E2 et E3	166

Chapitre VI

Tableau 42	Variables ajoutées pas à pas au modèle de la régression multiple réalisée, à partir des concentrations en éléments métalliques dans le sol, et pourcentage d'explication apporté par chacune d'elles (R^2).	192
Tableau 43	Variables ajoutées pas à pas au modèle de la régression multiple réalisée, à partir des concentrations en éléments métalliques dans les végétaux des sites, et pourcentage d'explication apporté par chacune d'elles (R^2).	193
Tableau 44	Variables ajoutées pas à pas au modèle de la régression multiple réalisée et pourcentage d'explication apporté par chacune d'elles.	194
Tableau 45	Principales caractéristiques physico-chimiques des sols d'Homécourt (site A), SOTRENOR (site B) et Hargarten aux Mines (site C).	196
Tableau 46	Concentrations en éléments métalliques totales et biodisponibles dans les sols d'Homécourt, de SOTRENOR et d'Hargarten aux Mines, en mg.kg^{-1} PS.	197
Tableau 47	Coefficient de corrélation linéaire R^2 correspondant aux relations entre les concentrations dans le sol totales ou biodisponibles et les concentrations dans les viscères des escargots transférés.	197
Tableau 48	Correspondances entre les concentrations (en mg.kg^{-1} PS) en plomb, cuivre, cadmium et zinc dans les viscères des escargots transférés sur les sites, et les grilles de contamination définies par Pihan (2001) et Berger et Dallinger (1993).	199

INTRODUCTION GÉNÉRALE

Désormais, les politiques environnementales s'orientent, par exemple, vers le développement de technologies basées sur l'utilisation d'énergies considérées comme propres et vers la réalisation de centres spécialisés dans le traitement des déchets domestiques ou des déchets industriels spéciaux, avec diminution des rejets à potentialités toxiques. De plus, la notion de développement durable apparaît comme le challenge du XXI^{ème} siècle, afin de léguer aux générations futures une Terre où ils puissent vivre en harmonie avec la nature. La préservation des écosystèmes est donc une des préoccupations majeures au niveau mondial.

Pour évaluer leur qualité, les recherches actuelles sont axées principalement sur la détection précoce de signes traduisant des altérations plutôt que sur la réalisation d'un état des lieux trop tardif. Dans cette optique, l'écotoxicologie revêt une importance primordiale : elle s'intéresse particulièrement aux interactions entre les produits chimiques présents dans l'environnement et le biotope et englobe plusieurs domaines dont la toxicologie, l'écologie appliquée, la chimie environnementale mais aussi la mise au point de bioindicateur. La bioindication utilise des organismes animaux ou végétaux, apportant des renseignements sur les caractéristiques écologiques de leur habitat, par la bioaccumulation de micropolluants dans leurs organes ou la variation de processus physiologiques sensibles aux xénobiotiques, les biomarqueurs.

Les capacités bioaccumulatrices d'animaux ou de végétaux ainsi que les biomarqueurs sont mis à profit dans l'étude de l'historique d'un écosystème, par la biosurveillance des sites. Il existe deux types de biosurveillance :

- *active*, par le transfert d'organismes sains, provenant d'un élevage, sur le site à diagnostiquer
- *passive*, les analyses reposent sur l'étude d'organismes autochtones, récoltés sur le site à étudier.

Après la participation à la mise au point du test AFNOR concernant les effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles *Helix aspersa*, au cours de mon DEA, il nous a semblé naturel de poursuivre nos recherches dans le domaine de la biosurveillance de sites. L'objectif du travail de thèse a été orienté vers la mise au point et la validation, sur sites contaminés, d'un test de biosurveillance en microcosme.

Dans un premier temps, nous nous sommes attachés à transposer le test AFNOR de laboratoire sur le terrain. Le dispositif expérimental, utilisé au cours de précédentes expériences de transfert d'organismes réalisées au laboratoire (Pihan, 2001), a été amélioré afin de permettre l'implantation d'escargots sur les terrains les plus hostiles. Un plan expérimental, testant différentes combinaisons de nourriture à apporter aux escargots lors du transfert sur site, nous a permis de déterminer la combinaison offrant le meilleur compromis entre la croissance et l'accumulation d'éléments métalliques.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à valider sur sites le protocole de transfert d'escargots, déterminé à la suite du plan expérimental, pour les études de biosurveillance active. Différents sites industriels, en activité ou non, ont été mis à notre disposition afin de tester, d'une part, l'influence de la contamination du sol sur la croissance et, d'autre part, de mettre en évidence et de confirmer les capacités de bioindication d'*Helix aspersa aspersa*.

Enfin, une étude écotoxicologique appliquée a été réalisée par rapport un élément métallique particulier, le cuivre, élément essentiel pour les escargots, avec une approche de sa localisation cellulaire.

L'ensemble de ce travail sera présenté selon le plan décrit ci-dessous.

- Dans un premier temps, l'analyse bibliographique résumera l'état des connaissances concernant l'origine des micropolluants, leur comportement et leurs effets sur l'environnement, avant de présenter plus précisément l'utilisation d'organismes bioindicateurs, tel que *Helix aspersa*, pour la biosurveillance de sites.
- Le chapitre Matériels et Méthodes présentera tout d'abord les Gastéropodes terrestres, le plan expérimental réalisé, en vue de réaliser une biosurveillance active en microcosme, et ses conclusions sous forme de publication, puis les différents sites d'études retenus et enfin la méthodologie mise en place en vue de répondre aux objectifs fixés.
- L'ensemble des résultats obtenus sera articulé en deux parties concernant, dans un premier temps, une étude méthodologique précisant les conditions de transfert d'escargots sur site et les intérêts pour l'étude de sites contaminés, et dans un deuxième temps, une étude écotoxicologique du cuivre soulevant la question de la supplémentation en cuivre de la nourriture des escargots d'élevage et recherchant à localiser le cuivre particulière (forme trouvée dans les poussières industrielles et les cendres volantes) dans la sole pédieuse des escargots. Les résultats seront discutés à la fin de chacun des chapitres et au cours d'une discussion générale.
- Enfin, le dernier chapitre sera consacré aux conclusions et aux perspectives ouvertes à l'issue de ce travail.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

L'émission de polluants dans l'environnement par les activités humaines (agriculture, transport et surtout industrie) fait l'objet d'une prise de conscience récente, une vingtaine d'année tout au plus. Pourtant le passif environnemental, lié aux activités industrielles notamment, est lourd : plus de 3700 sites sont répertoriés comme pollués sur le territoire français (Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable – BASOL). Pour prendre un exemple récent, les concentrations en métaux rencontrées dans les sols où était implantée l'usine de METALEUROP SA à Noyelles-Godault : pendant plus de cent ans, cette fonderie, la plus grosse d'Europe, a rejeté entre deux tonnes, avant l'apparition des filtres, et 80 kg de poussières de plomb dans l'atmosphère. Ainsi, plus de 500 hectares aux alentours ont été pollués avec des teneurs en plomb actuelles dans les sols comprises entre 3000-4000 ppm à proximité de l'usine et 500 ppm dans les zones les plus éloignées.

Ce cas très médiatisé a mis en évidence les limites du pouvoir dépurateur du sol vis-à-vis des contaminants et soulève le problème des transferts de polluants dans l'environnement via l'atmosphère, les eaux de ruissellement, les eaux interstitielles ou la chaîne trophique, par accumulation dans les végétaux.

Chapitre I. LES SITES ET SOLS POLLUÉS : ORIGINE DES CONTAMINANTS, COMPORTEMENT ET REGLEMENTATION

Un site pollué se définit comme un site présentant un risque pérenne, réel ou potentiel, pour la santé humaine ou l'environnement, du fait d'une pollution résultant d'activités anthropiques actuelles ou anciennes. Ainsi, le territoire français compte 3735 sites pollués dont les plus grandes concentrations sont localisées dans le Nord Pas de Calais (13.5% soit 505 sites), en région Rhône Alpes (12.8% soit 478 sites), en Ile de France (10.4% soit 390 sites) et en Lorraine (7.63% soit 285 sites). Les origines de ces pollutions sont diverses et engendrent, le plus souvent, des pollutions mixtes.

I.1. Les différents polluants des sols

Le sol est un milieu complexe composé de quatre compartiments (compartiments gazeux, liquide, minéral et organique) dont la principale caractéristique est d'être dynamique : les constituants et les structures du sol sont en perpétuelles transformations, cycliques ou non, avec transferts de matières solides, liquides, gazeuses ou biologiques (Garrett, 2000). Situé à l'interface entre la roche mère, l'air et l'eau, il peut être assimilé à un réservoir (Senesi, *et al.*, 1999) : en effet, il concentre tous les polluants émis (Facchinelli, *et al.*, 2001), parmi lesquels les éléments métalliques (EM) et les

hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Les dix principaux polluants constatés, seul ou en mélange, dans les sols et/ou les nappes d'eau souterraine sont les hydrocarbures (37.88%), les HAPs (15.72%), le Pb (15.39%), le Cr (13.04%), les solvants halogénés (12.29%), le Cu (12.16%), l'As (10.07%), le Zn (10.04%), le Ni (8.41%) et le Cd (5.49%) (Tableaux de bord BASOL, 2004).

I.1.1. Les éléments métalliques

Les éléments métalliques peuvent être séparés en deux catégories, les éléments traces métalliques (ou ETM) et les éléments majeurs, dont il convient de préciser leur signification. Par définition, les **éléments traces** sont « les éléments minéraux constituant de la croûte terrestre, dont la concentration, pour chacun d'entre eux, est inférieure à 0,1% » (Baize, 1997) tels que le chrome, le nickel, le zinc, le cuivre, le plomb ou le cadmium. A l'inverse, les **éléments** dits **majeurs** interviennent pour 99,4% dans le total des éléments chimiques sur Terre et regroupent, entre autres, le fer et le manganèse.

Après cette première classification, il est nécessaire de distinguer :

- *les oligo-éléments ou métaux essentiels*, indispensables au fonctionnement des organismes biologiques, tels que le cuivre, le fer, le manganèse, le nickel, le zinc et le chrome. Toutefois, présents à des concentrations excessives, ils deviennent toxiques pour les organismes.
- *les éléments à caractère non indispensable*, toxiques aussi quand leurs concentrations dépassent certains seuils ^a.

Le tableau 1 résume l'appartenance des différents éléments métalliques étudiés aux catégories présentées ci-dessus, ainsi que leur potentialité toxique. Ces dernières seront détaillées dans le chapitre II.3.

Tableau 1 : Caractère essentiel et pouvoir toxique des éléments traces vis-à-vis des plantes et des animaux, dans l'environnement terrestre (adapté de Schwartz, 1997 ; Senesi *et al.*, 1999).

Elément	Essentiel ou bénéfique pour		Toxique à forte concentration	
	plantes	animaux	plantes	animaux
Cd	non	non	oui	oui
Cr	non	oui	oui	oui
Cu	oui	oui	oui	oui
Mn	oui	oui	oui (pH<5)	
Ni	oui	oui	oui	oui
Pb	non	non	oui	oui
Zn	oui	oui	oui	oui

1.1.1.1. Fond pédogéochimique et contamination naturelle

Les éléments traces métalliques sont présents naturellement dans les sols, en absence de toute contamination humaine. Leur concentration constitue le fond pédogéochimique naturel et correspond essentiellement aux apports de la roche mère sur laquelle se développent les sols : un sol sera d'autant plus riche en EM que la roche mère l'est également. C'est pourquoi, les fonds pédogéochimiques varient à l'échelle de la région en fonction de la géologie et du type de genèse de la couche supérieure. Bonnefoy et Bourg (1985) ont estimé les fonds pédogéochimiques en région Lorraine : ils sont de 133, 35 et 39,6 mg.kg⁻¹ de poids sec PS pour, respectivement, le Zn, le Pb et le Cr.

Dans le cadre du programme INRA-ASPITET (Apports d'une Stratification Pédologique pour l'Interprétation des Teneurs en Eléments Traces) en 1994 (Baize, 2000), les teneurs naturelles dans les sols français et leurs variations d'un point à un autre ont été déterminées. Seuls les sols de zones rurales ont été échantillonnés ; les résultats sont présentés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Teneurs totales en éléments métalliques dans les sols français (Baize, 2000) et fond géochimique du bassin versant de l'Orne, Moselle (Bonnefoy et Bourg, 1985) en mg.kg⁻¹ de matière sèche MS

	Cu	Zn	Fe	Mn	Pb	Cd	Cr	Ni
<i>Nombre de valeurs</i>	787	804	767	735	790	768	791	797
Minimum	< 2	< 5	50	< 10	2,2	< 0,02	< 2	< 2
Moyenne	14,9	149	3650	1585	64,8	0,42	75	41,3
Maximum	107	3820	19160	24975	3088	6,99	691	478
<i>Fond géochimique</i>	20,6	133			35		138	39,6

Toutefois, des sols situés dans des zones rurales, éloignées de toutes activités industrielles ou anthropiques, actuelles ou passées, peuvent présenter des teneurs en métaux largement supérieures à celles communément rencontrées en absence de contamination. Ces « contaminations naturelles » se rencontrent au niveau d'accidents géologiques ayant entraîné l'affleurement de couches riches en minerais : les processus pédogénétiques ont alors enrichis naturellement les horizons de surface.

1.1.1.2. Apports naturels et anthropiques

Il existe plusieurs sources dites naturelles d'éléments métalliques dans l'environnement, décrites notamment par Senesi (1999) ou Garrett (2001) : les processus de pédogenèse et d'érosion du sol, les activités volcaniques ainsi que la libération de la phase gazeuse de certains sols contribuent à

augmenter les concentrations dans les sols. Pour exemple, lors de son éruption en Juin 1991, le Mont Pinatubo aurait émis dans l'atmosphère, entre autres, 600 000 tonnes de cuivre et 800 000 tonnes de zinc.

Toutefois, les concentrations mesurées dans les sols sont liées, pour l'essentiel, à des émissions d'origine anthropiques :

➤ **les sources agricoles** correspondent aux impuretés présentes dans les produits phytosanitaires (comme le cuivre dans la bouillie bordelaise ou le plomb dans les pesticides), les lisiers (Cu, Zn, Cd) ou les engrais (Mn dans les scories potassiques, Cd dans les engrais phosphatés). La contamination provient d'apports directs gérés au niveau de la parcelle ou de son environnement proche par les eaux de ruissellement.

➤ **les sources urbaines** regroupent l'épandage des boues de station d'épuration ou des boues de curage (apport de Cr, Cu et Pb), l'incinération de déchets domestiques (Cd) ou le trafic routier (apport de Zn, de Cd lors de la combustion des carburants ou de Pb utilisé comme antidétonant).

➤ **les sources industrielles** émettent dans l'environnement tous les éléments métalliques par les activités métallurgiques telles que le traitement des minerais, l'exploitation minière, le raffinage, l'élaboration d'alliages ou d'acier mais aussi lors de processus industriels plus élaborés comme le recyclage du plomb des batteries ou l'élaboration de peintures. L'essentiel des émissions retombe sous forme de poussières dans un rayon proche du site industriel émetteur (3 à 5 km)

D'une manière plus globale, les sources urbaines et industrielles entraînent une contamination en éléments traces à la fois diffuse, avec des retombées atmosphériques lointaines, et locale par les retombées atmosphériques proches. Ainsi, 95 % du plomb susceptible de contaminer l'environnement provient du trafic routier par l'utilisation de composés organométalliques comme antidétonants dans les moteurs à explosion : cette contamination peut être visible jusqu'à 320m de part et d'autre d'une autoroute, avec un maximum observé sur entre 5 et 20 m (Viard *et al.*, 2004). De même, 35 % des émissions totales de chrome dans l'atmosphère sont d'origine industrielle (ADEME, CITEPA 1997). Dans le cas de la contamination en cadmium de l'environnement, 80 % provient des engrais phosphatés et 13 % trouve son origine dans une contamination générale diffuse (Godin).

En 1998, l'ADEME a estimé les apports annuels sur les sols français, pour différents métaux et par source majeure (Figure 1).

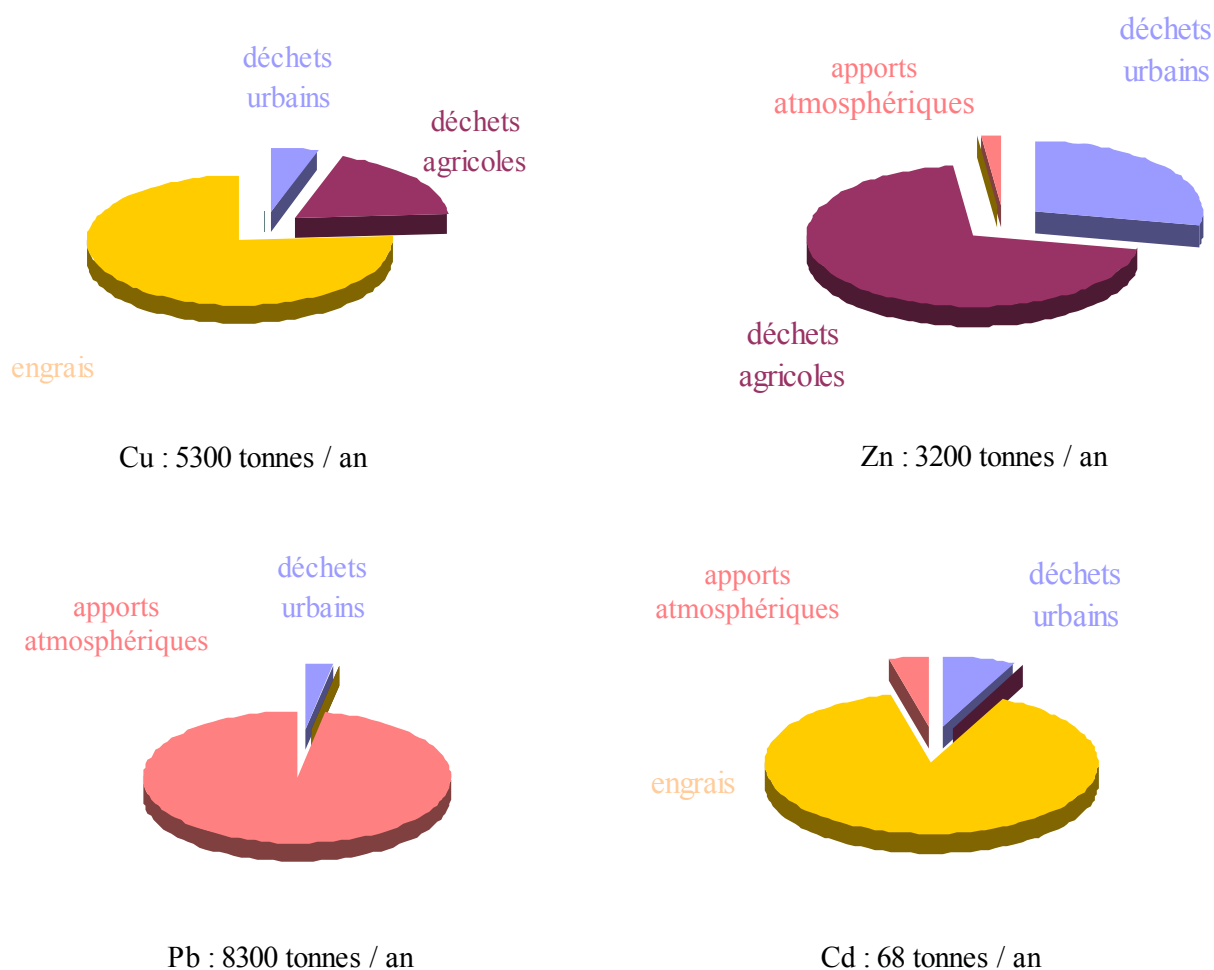


Figure 1 : Estimation des apports annuels sur les sols français en cuivre, zinc, plomb et cadmium en fonction des sources

Les niveaux en polluants des sols dans les zones industrielles, urbaines ou rurales ont fait l'objet de nombreuses études, regroupées dans les Tableaux 3a et b. Toutefois, les comparaisons directes entre les teneurs en éléments métalliques mesurées sont difficiles à réaliser en raison des diverses méthodes analytiques utilisées et des propriétés physico-chimiques des sols eux-mêmes.

D'après les études répertoriées, les niveaux de référence dans les sols non pollués peuvent évoluer entre 1,7-21,4 mg Cu.kg⁻¹, 6,2-82 mg Zn.kg⁻¹, 11,8-134 mg Mn.kg⁻¹, 5,1-102 mg Pb.kg⁻¹, 1,3-49,9 mg Ni.kg⁻¹, 0,06-20,6 mg Cd.kg⁻¹ et 2,1-21 mg Cr.kg⁻¹. Par ailleurs, les concentrations maximales rencontrées dans les sols contaminés étudiés atteignent jusqu'à 4700 mg Cu.kg⁻¹, 54600 mg Fe.kg⁻¹, 12400 mg Zn.kg⁻¹, 20400 mg Mn.kg⁻¹, 11000 mg Pb.kg⁻¹, 26000 mg Ni.kg⁻¹, 336 mg Cd.kg⁻¹ et 10000 mg Cr.kg⁻¹.

Les quantités d'éléments métalliques retrouvées dans les sols reflètent la nature de la source de contamination : importantes quantités de Mn, Zn et Cu dans les environnements urbanisés, dominance de Pb, Zn, Cr, Fe et Mn dans les sols industriels.

Tableau 3a : Liste non exhaustive des teneurs minimum et maximum ou des teneurs moyennes en éléments traces métalliques dans les sols (en mg.kg⁻¹ poids sec) rapportées par différents auteurs, en fonction des caractéristiques des sols (hab. : habitants / C org : carbone organique)

Echantillons de sol prélevés	Propriétés physico-chimiques du sol						Référence bibliographique
	pH	CEC	C org %	Limons %	Argiles %	Sables %	
sols urbains, ville de 3000 hab	6,49						1- Abollino <i>et al.</i> , 2002
ville de 19000 hab	7,01						
Sols Danois agricoles et industriels							2- Bak <i>et al.</i> , 1997
site référence	4,25-4,75						3- Buszewski <i>et al.</i> , 2000
sols contaminés par des boues	6,2-7,4	76-263µmol.g ⁻¹	1-5,6				4- Chander <i>et al.</i> , 2001
sols contaminés par sédiments	7,5-7,8	151-353µmol.g ⁻¹	1,7-4,5				
sols contaminés par industries	7-7,6	41-216µmol.g ⁻¹	1-3,6				
sols de référence sols éloignés du site industriel sols industriels							5- Citterio <i>et al.</i> , 2002
proximité mines de Pb et Zn	5,6	13	27,7 g.kg ⁻¹	20,1	51,7	28,2	6- Denaiz <i>et al.</i> , 2001
sols industriels							7- Facchinelli <i>et al.</i> , 2001
site référence sites industriels							8- Fakayode & Onianwa, 2002
sols à proximité de voies ferrées	6,47-8,55	6,07-21,8	1,39-14,3				9 - Ge <i>et al.</i> , 2000
	7,-8,01		13,3-21,2	3,7-6,5	11,1-18,3	75,2-85,2	10- Imperato <i>et al.</i> , 2003
sol agricole près mine Cu et Ni	6,34-7,08	2,6-9,7	1,4-0,9	3-17	16-65	18-81	11- Kaasalainen & Yli-Halla, 2003
sols industriels							12- Kabata Pendias & Pendias, 1993
jardins +/- près mine de Pb	6,5-7,1		6,7-29,7		1,9-16,1		13- Kugonič & Kopušar, 2000
Fond pédogéochimique Référence Proximité autoroute faible trafic Proximité autoroute trafic intense							14- Morton-Bermea <i>et al.</i> , 2002

sols à proximité de voies ferrées	6,4-7,9 8,3-8,4	6-21,8 9,1-18,2	2,5-15 1,4-5	6,6-52,3 6,3-13,5			15- Murray <i>et al.</i> , 2000
site référence	7,11	20,7		0,6	9,5	90	16- Olajire <i>et al.</i> , 2002
sites industriels	6,62-7,34	11,3-21,1		0,9-3,6	8,7-14,6	85-88	
Site de référence			3				17- Samsøe-Petersen <i>et al.</i> , 2002
Site moyennement contaminé			3				
Site industriel fortement contaminé			19				
sol agricole amendé	6	9,5	5,9				18- Speir <i>et al.</i> , 2003
sol de référence							19- Swaileh <i>et al.</i> , 2001
Sol à 20m axe autoroutier majeur							
sols ruraux			0,6-1,1				20- Thuy <i>et al.</i> , 1998
sols urbains			0,6-3	5	15	75	
sols cultivés			0,4-2,5				
sols industriels			1,1-805				
sol urbain (trafic et industries)							21- Ordóñez <i>et al.</i> , 2003
sol industriel (métallurgie)	5,31-7,4			19,6-34,8			22- Van Straalen <i>et al.</i> , 2001
Proximité autoroute 40000 véh/jour	5,2-7,4	7-31	1-3,5	58-66	18-24	12-20	23- Viard <i>et al.</i> , 2004
Proximité autoroute 60000 véh/jour	5,2-6,4	35-45	3,7-5,5	14-36	32-51	3-23	
sols industriels							24- Vendetti <i>et al.</i>

Tableau 3b : Liste non exhaustive des teneurs minimum et maximum ou des teneurs moyennes en éléments traces métalliques dans les sols (en mg.kg⁻¹ poids sec) rapportées par différents auteurs, en fonction des caractéristiques des sols (ER : digestion à l'eau régale / PER : digestion avec acide fluorhydrique et perchlorique)

	Extraction EM totaux	Teneurs totales en éléments traces métalliques (mg.kg ⁻¹ poids sec)							
		Cu	Fe	Zn	Mn	Pb	Ni	Cd	Cr
1	ER	73,6	45457	255	850	69,4	30	7,5	63,8
		20,6	43176	125	779	28,1	31,3	0,05	68,3
2	Hno3	0,2-92,6		0,3-135		0,1-102,1	0,5-75,9	0,1-0,85	0,4-64
3	Hno3 0,5M	5,03-9,69	207-234,9	13,52-19,88		13,7-16,4		0,51- 0,54	
4	Hno3			76-459		26-108			
				480-4760		306-4070			
				204-10086		2308-9974			
5	ER	8,53				Nd	49,9	0,06	117,6
		21,4				47,9	49,4	3,4	126,7
		19,1				51,3	798,8	131,6	4810,7
6			11995		2340		169		
7	ER	12,7-354		34-135,5		4,2-46,2	13,3-246,4		9,3-114,3
8	PER	1,7		6,2	11,8	5,1	1,3	0,09	2,1
		8,9-72		205,3-328	134-460	65,7-426	9,7-30,9	1,61-5,34	7,1-42
9	Hno3-hclo4	58,7-476		203-1350		90,4-1190	25,6-243	1-13,3	
10	ER	6,2-28,6		30-2550		4-3420			1,7-73
11	ER	52,4-263		61-67,3		9,79-15,8	16,7-54,2	0,25-0,66	9,09-31,6
12		1090-2020		3625-12400		3075-4560	6000-26000	270-336	10000
13				160-704		734-4470		0,89-23	
14	Hno3 + Hcl +	28,9		115,6		8,1		1	
		43,5		195,8		49,7		1,1	

	Hclo4	61,7 98,2		335,5 741,7		354,1 1188,9		1,4 1,6	
15	Hno3+Hclo4	59-417 81-196		203-934 203-701		90-973 234-1190	26-116 37-114	1,9-13,3 2,8-10,6	
16	PER	21,4 31,7 - 102		44,5 68,1-134		102 146-1620	11,4 12,8-26	20,6 46,2-61,5	
17	Hno3	4,5-18 32-360 38-4700		23-82 101-2445 121-2681		7,6-30 69-388 93-11000	4,1-10 7,1-25 8,3-85	0,17-0,44 0,15-1,7 0,21-18	6,6-21 9,5-85 11-540
18		58-160		259-366		24-64	25-49		91-155
19		13,71 ± 1,51 23,85 ± 1,15		85,14 ± 4,37 128,27 ± 7,98		10,46 ± 0,98 149,88 ± 16,5		0,12 ± 0,02 0,45 ± 0,05	
20		27,6-58,9 36,6-208 29,7-494,6 23,4-232,4		42,7-99,8 48-465,3 52,9-561,7 35,2-717		0,8-3,2 0,4-20,1 0,8-5,3 136,6-742,7	11-31,5 9,4-67,9 4,9-64,7 11,3-240,7	0,1-0,2 0,1-4,6 0,1-0,7 0,1-2,2	80,8-116,7 23,2-174,5 25,9-171,6 86,9-230
21	ER	19-1040	1,67-9,83 %	110-1959	185-4261	54-1160	5-48	0,80-7,8	9-110
22	ER	13,7-58,6	18800-54600	48-276	1260-20400	9,6-54,9	13,4-43,1		
23	ER			329 500		60 102		0,35 0,83	
24				633-1078		301-1810		0,12-16,5	79,8-1543

EN RESUME

- Le fond pédogéochimique local résulte de phénomènes naturels géologiques, pédogénétiques et autres présentés au niveau de la figure 2 par les flèches 1, 2, 3, 4 et 6.
- Toutefois, les sols sont aussi soumis à des apports d'éléments métalliques résultant d'activités anthropiques, représentés au niveau de la figure 2 par les flèches 5, 6, 7, 8 et 9.

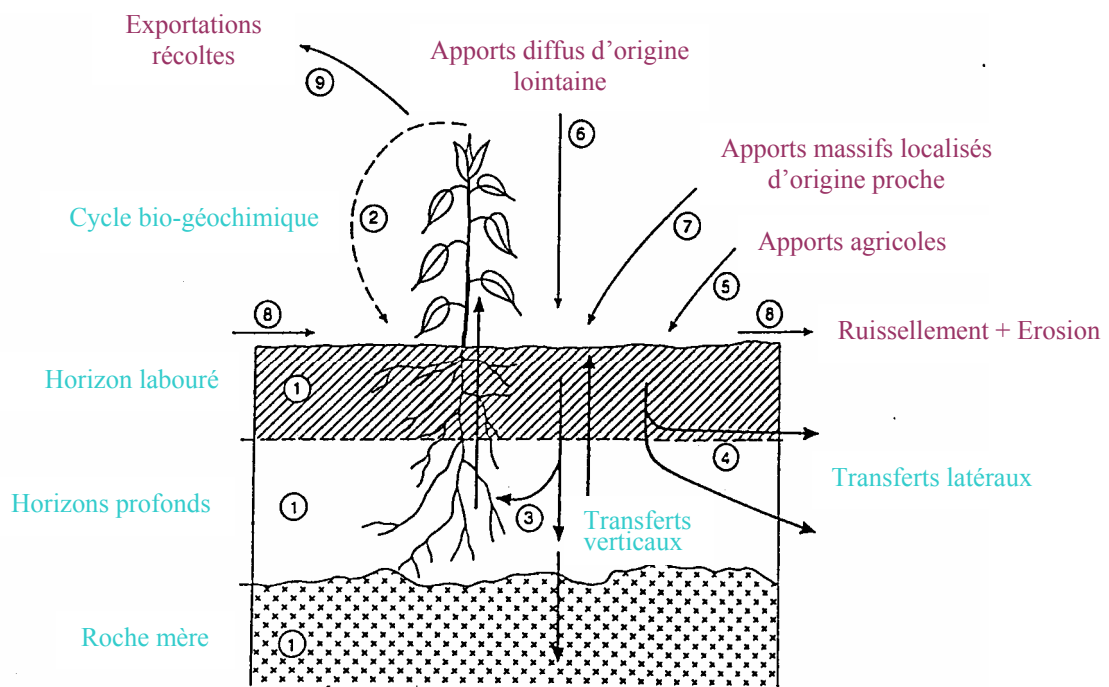


Figure 2 : Schéma d'acquisition des teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (d'après Baize, 1997)

I.1.2. Les hydrocarbures aromatiques polycycliques

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (ou HAP) constituent un groupe de composés organiques constitués d'atomes de carbone et d'hydrogène, formant au moins deux cycles aromatiques condensés. Ils sont caractérisés par de hauts potentiels mutagènes et cancérigènes. Le plus simple des HAP est le naphthalène ($C_{10}H_8$) issu de la fusion de deux cycles benzéniques et le plus complexe est le coronène ($C_{24}H_{12}$) avec sept cycles. Ce sont des contaminants ubiquistes de notre environnement. Le bruit de fond des HAP présents dans les sols varie entre 50 et 500 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ (Atanassova and Brümmer, 2003). US EPA recommande la détermination des concentrations de 16 HAP, lors d'études de sites et sols pollués : le naphthalène, l'acénaphthylène, l'acénaphtène, le fluorène, le phénanthrène, l'anthracène, le fluoranthène, le pyrène, le benzo[a]anthracène, le chrysène, le benzo[b]fluoranthène et le benzo[k]fluoranthène.

Les caractéristiques physico-chimiques des HAP sont primordiales car elles déterminent en grande partie leur comportement dans l'environnement. Relativement non volatiles et peu solubles, les HAP sont généralement absorbés sur les matières particulaires sur lesquelles ils sont transportés ou dégradés lentement par l'activité microbienne (Loi Canadienne sur la Protection de l'Environnement, 1994). De façon générale, lorsque leur masse moléculaire augmente, leur solubilité dans l'eau diminue. A l'inverse, leur solubilité dans les tissus gras ainsi que leurs points de fusion et d'ébullition augmentent avec leur masse moléculaire.

Les HAP sont émis:

- lors de combustions incomplètes de matières organiques récentes ou fossiles telles que le charbon ou le pétrole (HAP pyrolytiques). Les quantités formées et les vitesses de formation dépendent des produits et du niveau de combustion. Les combustions qui ont lieu dans les véhicules à moteur à explosion sont les sources principales de HAP atmosphériques. En France, en 2002, la part relative des transports routiers dans les émissions de HAP a été estimée à 17.2% (www.citepa.fr).
- lors de la formation des énergies fossiles. Ceci explique leur présence dans le pétrole, le charbon et leurs produits dérivés. A l'inverse des processus pyrolytiques, ces formations se produisent à des températures relativement basses (50~150 °C).
- lors de biosynthèses. Certains champignons, bactéries et plantes sont en effet capables de synthétiser une grande variété de pigments précurseurs de HAP (DDASS 76, 1995). L'existence de cette biosynthèse reste cependant controversée.
- lors d'éruptions volcaniques ou d'incendies de forêts. Les HAP formés pendant la combustion restent dans la phase gazeuse tant que les températures sont supérieures à 150°C ; dès que la température baisse, ils vont se condenser autour des particules de cendres et se déposer à la surface du sol (Kim *et al*, 2003). Ainsi, 47% des émissions atmosphériques de HAP au Canada proviendraient des feux de forêts.

Les sources de contamination des sols par les HAP sont principalement associées aux activités industrielles (pollutions ponctuelles) telles que les cokeries et les usines métallurgiques, les alumineries, l'industrie de traitement du bois (produits traités à la créosote) ou les complexes pétroliers. D'après le CITEPA, en 2002, 251t de HAP ont été émises dans l'atmosphère avec la répartition suivante : combustion résidentielle 37%, métallurgie des métaux ferreux 18%, transport 17.1% et autres 6.5%. Le Tableau 4 présente une liste non exhaustive des études menées à travers le monde rapportant les teneurs mesurées en HAP dans les sols. Dans le cas du Benzo a Pyrène (BaP), alors que les sites de référence, les teneurs observées ne dépassent pas 84 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, elles peuvent atteindre 1600 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ en ville ou à proximité d'anciennes cokeries et même monter jusqu'à 15000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. En ce qui concerne le Pyrène, les concentrations dans les sols de référence ne dépassent pas

Tableau 4 : Liste non exhaustive des teneurs minimum et maximum ou des teneurs moyennes en hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les sols (en $\mu\text{g.kg}^{-1}$) rapportées par différents auteurs

Echantillons de sol prélevés	Concentrations en HAPs						Référence bibliographique	
	BaP	Pyr	BaA	Fluo	Ip	$\Sigma 14$ HAP		$\Sigma 16$ HAP
Sols contaminés		7000-9000	2000-3000					1- Johnson <i>et al.</i> , 2002
Anciennes cokeries	1300						11473	4- LCPE
Sols industriels	2-248	1-429	1-220	1-483			28-2447	5- Maliszewska-Kardybach, 1996
Sols urbains							2700	6- Meharg <i>et al.</i> , 1998
Site industriel	246	1178	222	1496	1409		5650	7- Motelay-Massei, 2004
Site urbain	126	219	127	292	116		2780	
Site péri-urbain	38,5	527	70,4	437	36,9		1670	
Site référence	14,4	160	30,9	144	9,84		450	
Tallinn	62	117	49	177			1019	8- Saltiene <i>et al.</i> , 2002
Helsinki	236	539	384	1115			6041	
Vilnius	43	127	36	103			650	
Chicago	1634	3263	1006	3167			16745	
Londres	1652	1728	909	2372			16025	
Sol de référence	84			135	71			9- Samsøe-Petersen <i>et al.</i> , 2002
Sol moyennement contaminé	2100			4700	2000			
Sol fortement contaminé	15000			31000	12000			
Sites industriels	336	94,3-544	44,7-356,7	122,3-712	312,7		1083-6248	10- Tao <i>et al.</i> , 2004
Sols ruraux	6-8	31	20	27			187	11- Wilde & Jones, 1995
Sols urbains	379	645	1153	1256			4239	
Sol forestier	352	573	796	1132			4809	
Sol usine électrique	260	491	662	2174			4441	
Sols en environnement routier							3000	12- Yang <i>et al.</i> , 1991

160 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ alors que dans les sols urbains ou industriels, elles peuvent atteindre, respectivement, 3263 et 9000 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. En tenant compte des 16 HAP de la liste de l'US EPA, les concentrations en HAPs totaux peuvent atteindre 16745 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dans les sols urbains et 6248 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ dans les sols industriels.

I.2. Comportement des polluants dans le sol

I.2.1. Mobilité et biodisponibilité des éléments métalliques

Une fois dans les sols, les éléments métalliques se répartissent entre la phase liquide et la phase solide qui constituent ces sols. Le plus souvent, la quantité d'EM dans la phase liquide est infime, les métaux se concentrant surtout dans la phase solide du sol dans laquelle ils se répartissent entre les différentes fractions organiques et minérales (Figure 3).

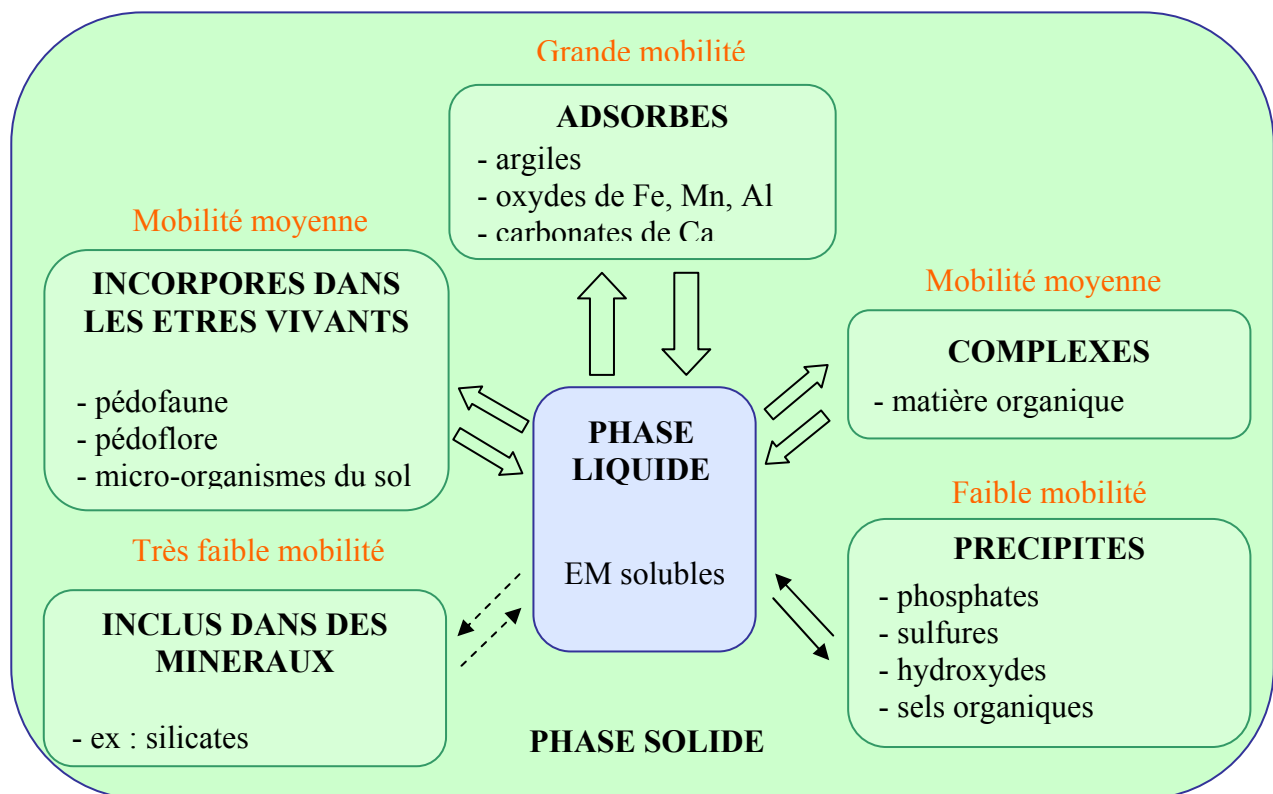


Figure 3 : Répartition des éléments métalliques entre les compartiments du sol, sous les différentes formes possibles, avec indication de leur mobilité par des flèches (modifiée d'après Juste, 1995).

Par définition, la **mobilité** désigne l'aptitude d'un élément à être transféré vers des compartiments du sol où il est de moins en moins énergétiquement retenu, le compartiment ultime étant la solution du sol (Juste, 1995). La **biodisponibilité** caractérise l'aptitude d'un élément à passer d'un

compartiment du sol dans un organisme. Selon Phillips et Rainbow (1994), l'élément métallique qui se trouve dans un organisme est par définition biodisponible. Pourtant, selon la formation scientifique des auteurs, la définition de la biodisponibilité évolue (Coourdassier, 2002). Toutefois, la définition de Peijnenburg *et al.* (1997), inspirée de celle de Hamelink *et al.* (1994) apparaît comme la plus appropriée pour les transferts sol-organismes. Pour ces auteurs, la biodisponibilité recouvre deux phénomènes distincts :

- la disponibilité environnementale tient compte des processus physico-chimiques régissant la partition des EM entre la phase solide et la phase liquide du sol
- la biodisponibilité environnementale s'intéresse aux processus physiologiques liés à l'absorption de l'élément métallique.

Le pool labile d'un élément métallique (i.e. sa mobilité et sa biodisponibilité) varie en fonction des propriétés du sol. La répartition des EM entre les différents compartiments, qui a un impact direct sur leur biodisponibilité, n'est pas figée et se trouve sous l'influence de facteurs externes tels que les propriétés physico-chimiques du sol (pH, CEC, matière organique, texture...), le type de végétation présente à la surface ou les facteurs environnementaux (conditions climatiques, pratiques agricoles, topographie...) (Kabata-Pendias and Adriano, 1995, Perrono, 1999).

1.2.1.1. Paramètres influençant la mobilité des éléments métalliques

De nombreuses études ont mis en évidence l'influence du pH sur la mobilité des éléments métalliques dans un sol (Ge, *et al.*, 2000; Hund-Rinke and Kördel, 2003; Peakall and Burger, 2003; Peijnenburg and Jager, 2003; Terrés, *et al.*, 2002). La majorité des éléments métalliques est plus mobile en conditions acides qu'en conditions alcalines : l'abaissement du pH favorise la mobilité des EM notamment par la mise en solution des sels métalliques alors que, *a contrario*, l'augmentation du pH provoque l'immobilisation des éléments métalliques par la formation de composés insolubles (Perrono, 1999 ; (Richards, *et al.*, 2000). Ce phénomène s'explique par la compétition avec les protons (Yin *et al.*, 2001 SP 185). Dans les sols à pH acide, la plupart des sites de liaison potentiels sont occupés par des protons, les métaux sont donc libres et mobiles. Par contre, quand le pH augmente pour devenir alcalin voire basique, la compétition des éléments métalliques avec les protons, en nombre inférieur, diminue : les sites de liaison sont occupés par les éléments métalliques et donc immobilisés.

La représentation graphique de la relation entre la concentration total d'un élément métallique, dans la solution d'un sol, et son pH montre une forte relation dans le cas du nickel et du zinc, et une influence plus réduite du pH pour le chrome, le plomb et le cuivre (Speir *et al.*, 2003). Toutefois, la solubilité du cuivre augmente fortement quand le pH d'un sol inférieur à 4,5 diminue. Dans une

étude récente, Peakall et Berger (2003) ont montré que, pour un pH compris entre 4 et 7,7, la capacité d'absorption du cadmium d'un sol est multipliée par 2 ou 3 pour chaque augmentation de une unité de pH : la mobilité du Cd diminue donc. De même, des études sur la spéciation chimique des éléments ont montré que, si à pH bas, 80 à 100% du nickel de la solution d'un sol est sous forme d'ion libre, ce pourcentage diminue fortement quand le pH du sol augmente. Römken et Salomons (1998) observent que des sols forestiers acides, avec des concentrations totales en cadmium inférieures à celles mesurées dans un sol agricole, présentent des quantités supérieures de cadmium solubles. L'influence du pH sur la mobilité des éléments métalliques est mise à profit lors du chaulage des sols : l'augmentation artificielle du pH des sols permet ainsi de diminuer la mobilité des éléments métalliques. Knight et al. (1998) ont montré que le chaulage de sols, faisant passer le pH de 4,5 à 5,1 et de 6,3 à 7, réduisait significativement la mobilité du cadmium et du zinc.

Par son action sur la mobilité et la forme des éléments métalliques dans les sols, le pH est l'un des paramètres qui contrôle leur disponibilité pour les plantes et les organismes terrestres (Morel, 1997 ; (Winder, *et al.*, 1999). Amrani *et al.* (1999) ont montré que la mobilité, et donc la disponibilité, du zinc pour les plantes augmente quand le pH du sol diminue. Le chaulage de deux sols, ayant fait passer les pH de 6,94 à 7,25 et de 5,80 à 7,26, a permis de diminuer, respectivement, le prélèvement du cadmium par les plantes de 32 et 57%, respectivement (Lehoczky *et al.*, 2000). A l'inverse, une acidification du sol entraîne l'augmentation de l'activité des ions libres Cu^{2+} , Ni, Pb et Zn, forme particulièrement assimilable par les organismes : ce processus peut donc être à l'origine de phénomènes de toxicité (Ge, *et al.*, 2000).

D'autres facteurs édaphiques interviennent, dans une moindre mesure, sur la mobilité des éléments métalliques : la matière organique (MO), la granulométrie ou le potentiel d'oxydo-réduction. La matière organique joue un rôle dans la partition des éléments métalliques, entre la phase solide et la phase liquide du sol, par complexation des éléments métalliques à la MO (Singh *et al.*, 2000). Ainsi, un sol riche en carbone organique produira une grande quantité de CO_2 , formant des composés stables dans le sol (Hui, 2002). Un sol de texture grossière présentera une quantité plus importante d'éléments métalliques mobiles (McBride, 1994). Les facteurs favorisant l'anoxie d'un sol (pratiques culturales influençant le degré d'aération d'un sol ou les conditions climatiques) modifient la mobilité de certains EM comme le manganèse et le fer, dont les formes réduites sont plus mobiles dans les sols que les formes oxydées. De plus, les conditions d'oxydo-réduction ont aussi une influence sur les composants du sol fixant les EM : ainsi, en condition aérobie, les composés ferriques et manganiques sont très peu solubles et immobilisent donc les EM qui leur sont associés. A l'inverse, en condition anaérobie, ces composés vont être réduits et solubilisés,

entraînant une libération des EM associés (Förstner, 1985). Dans le même temps, les réactions d'oxydo-réduction peuvent avoir une action importante pour certains éléments métalliques dont la toxicité varie selon leur forme chimique : ainsi, le chrome est beaucoup plus toxique sous forme Cr(VI) que sous forme Cr(III) (Wetterhahn et Hamilton, 1989 ; Gauglhofer et Bianchi, 1991 ; Coeurdassier, *et al.*, 2000). Le Tableau 5 synthétise la mobilité potentielles des éléments métalliques étudiés en fonction du pH du sol et de son potentiel d'oxydo-réduction (adapté de Förstner, 1985 ; Perrono, 1999).

Tableau 5 : Influence du pH et du potentiel redox sur la mobilité des éléments métalliques étudiés

Mobilité relative	pH		Potentiel redox	
	neutre-alkalin	acide	oxydant	réducteur
Très haute				
Haute		Zn, Cd, Ni, (Mn)	Cu, Ni, Zn, Cd	
Moyenne	Mn	Fe (III)	Pb	Mn
Faible	Pb, Fe, Zn, Cd		Cr, Fe, Mn	Fe, Zn, Ni
Très faible	Cr, Ni			Cr, Cu, Cd, Pb

L'influence de chaque paramètre édaphique est donc difficile à évaluer, d'autant plus qu'ils sont étroitement liés et que la variation d'un seul entraîne la variation de plusieurs autres. La biodisponibilité des éléments métalliques dépend donc de leur mobilité dans le sol mais aussi de leur disponibilité et de la forme chimique sous laquelle ils sont présents ou spéciation.

1.2.1.2. Evaluation de la biodisponibilité des éléments métalliques

La biodisponibilité correspond au caractère assimilable d'un contaminant par les organismes vivants ; dans le cas des plantes, le terme phytodisponibilité est préféré. La biodisponibilité d'un élément métallique est directement liée à sa mobilité.

La concentration totale d'un élément métallique dans un sol ne représente pas la quantité réellement disponible pour les organismes. Toutefois, de nombreuses normes, comme la NF 44-041, préconisent de déterminer la teneur totale des éléments. Il apparaît donc essentiel, lors de diagnostic de sites et d'évaluation des risques associés, de coupler la détermination de la teneur totale d'un élément à celle de sa fraction biodisponible. La biodisponibilité peut être mesurée et calculée par de nombreuses méthodes incluant des études en laboratoires et des expérimentations sur le terrain, par la détermination des concentrations en EM dans les organismes à différents niveaux trophiques et dans la chaîne alimentaire (Peakall and Burger, 2003). Cette détermination est souvent difficile et

fastidieuse, voire impossible dans le cas des microorganismes. C'est pourquoi, l'utilisation de réactifs chimiques s'est développée afin de mesurer cette fraction du sol. Les réactifs les plus couramment utilisés sont des solutions salines (NH_4NO_3 , CaCl_2 , ...), parfois légèrement acides, ou complexantes (ex : EDTA, DTPA,...), pouvant aussi être associées. Toutefois, l'estimation du pool disponible semble mieux estimée par les agents complexants : l'EDTA permet l'extraction de 74 à 88% du cuivre total et 13 à 44 % du zinc total alors que le CaCl_2 n'extrait que 0,3 à 7,8 % et 0,5 à 22 %, respectivement (Kabata-Pendias, 2004). Lehoczky *et al.* (2000) ont montré que l'EDTA associé à l'acétate d'ammonium permet d'extraire de 29 à 77 % du cadmium total du sol, avec une corrélation positive entre la concentration totale en cadmium du sol et la fraction extraite disponible ($R^2 = 0,982$). Lors d'une étude sur les grains de blé, après avoir trouvé une forte corrélation entre les concentrations totales en métaux dans le sol et celles extraites par l'EDTA ($0,94 < r < 0,98$), Krauss *et al.* (2002) ont mis en évidence des corrélations significatives entre les concentrations retrouvées dans les grains de blé et la fraction disponible du sol : corrélations supérieures pour le zinc et le cadmium ($r = 0,71$ et $r = 0,69$ respectivement) à celles du cuivre et du plomb ($r = 0,44$ et $r = 0,41$ respectivement).

1.2.1.3. Transfert des éléments métalliques du sol vers les plantes

Les plantes prélèvent les EM dans leur milieu de croissance (i.e. sol, air, solution nutritives) pour les répartir ensuite entre les racines et le feuillage (Fytianos *et al.*, 2001). Les plantes absorbent préférentiellement les éléments métalliques de la solution du sol, sous forme ionique libre ou complexée. Si certains éléments traces sont essentiels à leur nutrition, les végétaux poussant dans des environnements fortement contaminés peuvent accumuler d'importantes concentrations en EM. Plusieurs risques environnementaux sont liés à cette entrée d'EM dans les plantes : l'introduction des contaminants dans la chaîne alimentaire, la possibilité d'une perte de la couverture végétale par phytotoxicité ou la modification du cycle des EM à la surface du sol par les plantes tolérantes (Kabata-Pendias, 2004). Le transfert des éléments métalliques du sol vers les plantes dépend des paramètres physico-chimiques du sol, des concentrations en métaux dans les sols (totales ou disponibles), de leur mobilité et de leurs interactions, ainsi que de l'espèce végétale considérée ((Dudka, *et al.*, 1995; Fakayode and Onianwa, 2002; Kabata-Pendias, 2004; Kugonic and Kopusar, 2000; Lehoczky, *et al.*, 2000; Senesi, *et al.*, 1999; Tack and Verloo, 1996). En effet, les capacités de prélèvement d'EM par les espèces végétales diffèrent d'une espèce à l'autre (Fytianos, *et al.*, 2001), sur un même site : les comparaisons entre études sont donc difficiles à réaliser. Toutefois, le Tableau 6 présente une liste non exhaustive des études menées dans ce domaine et leurs principaux résultats.

Tableau 6 : Liste non exhaustive des teneurs minimum et maximum ou des teneurs moyennes en éléments traces métalliques dans les sols et dans les plantes récoltées dessus (en mg.kg⁻¹ poids sec) rapportées par différents auteurs, en fonction des caractéristiques des sols (PER : acide perchlorique, ER : eau régale, HF : acide fluorhydrique) (1. Murray et al., 2000; 2. Samsøe-Petersen *et al.*, 2002; 3. Athar and Ahmad, 2002; 4. Lorenz *et al.*, 1997; 5. Fakayode and Onianwa, 2002; 6. Speir *et al.*, 2003; 7. Tack and Verloo, 1996; 8. Garcia and Millan, 1998; 9. Piotrowska and Kabata-Pendias, 1997; 10. Lehoczyk *et al.*, 2000a; 11. Buszewski *et al.*, 2000; 12. Kugonic and Kopusar, 2000; 13. Dudka *et al.*, 1995; 14. Lehoczyk *et al.*, 2002; 15. Lehoczyk *et al.*, 2000b; 16. Fytianos *et al.*, 2001)

Espèce	Propriétés édaphiques							Concentrations en mg.kg ⁻¹ PS dans le sol et les plantes								ref	
	pH	MO	Corg	N t	Argile	Limon	CEC	Cu	Zn	Mn	Fe	Ni	Pb	Cd	Cr		extraction
amendement boues	7,7								110,1-187,5							HNO ₃ HClO ₄	1
Canne à sucre								5,48								HNO ₃ H ₂ O ₂	
sol agricole	7,55							70,5-242,5									
Sol non contaminé		3%			31			13	61			9	20	0,33	16	HNO ₃	2
laitue								0,46	1,82			0,03	< 0,01	0,03	0,007	HNO ₃	
haricot								0,84	3,22			0,25	<0,01	nd	0,009		
radis								0,15	2			0,03	0,03	0,009	0,03		
faible contamination		3%			16			58	259			11	130	0,56	21		
laitue								0,53	2,28			0,02	0,02	0,02	0,007		
haricot								0,85	3,82			0,3	0,02	nd	0,01		
radis								0,24	1,8			0,03	0,14	0,007	0,04		
forte contamination		19%						1035	1544			49	997	2,4	189		
laitue								0,92	7,83			0,09	0,12	0,03	0,04		
haricot								1,05	5,36			0,48	0,06	nd	0,04		
radis								0,65	6,54			0,08	0,27	0,008	0,11		
Sol test	7,7	0,62	0,36				11,7	18,6	96			12,9	30	nd	15		3
blé														-			
ajout EM X2								1471	10235			603,8	388,4	24,8	148,9		

blé											0,7	10		
Sol		8,6 g.kg ⁻¹	1,2 g.kg ⁻¹	14,8	34	1317	367	24400	16,3	879	16,5	55,3		4
feuilles radis						340					30			
tubercules						117					4,8			
sol		6,7 g.kg ⁻¹	0,8 g.kg ⁻¹	32,6	95,3	5433	2507	101000	31	7490	11	67,3		4
feuilles radis						446					14			
tubercules						107					2,6			
sol non contaminé					1,7	6,2	11,8		1,3	5,1	0,09	2,1	PER	
herbe					0,1	0,1	0,3		0,1	0,3	0,02	0,1	HNO ₃	5
contamination					25,6	247,4	282,9		17	143,2	2,9	26,6	PER	
herbe					0,93	0,72	3,7		2,3	2,9	0,73	2,3	HNO ₃	
sol contrôle	6,2				50	276			41	17		104	HNO ₃	
racines					30	40			1	1		5		
herbes					20	45			1	1		1		6
sol contaminé	4,9	5,9%	0,48%	9,5	252	389			56	37		200	HNO ₃	
racines					140	540			29	1		28		
herbes					25	550			12	1		1		
sol	4-8,1	0,2-10,4%	0,1-53,8%	2,7-62,1	5,2-615,6	14,9-1817	0,6-792	0-10506	4,5-40	0-244	0,04-13,8	5,2-615,6	ER	7
ortie + herbe (Poa.)					2,2-841	23-532	4,9-3302	6,1-2037	0-97	0-357	0,03-9,26	0-180		
1m route 2160 véh/jr	7,2	15		38	20	85	373	25400		46	0,14		ER HF	
Lolium sp.					9	18	154,7	36,3		3,4	0,12		PER	
3m route 2160 véh/jr	5,2	7,3		38	17	63	228	26200		42	0,07			8
Lolium sp.					11,7	27	142,2	212,6		1,6	0,13			
1m route 30700 véh/jr	8	5,9		17	162	463	940	66000		471	0,84			
Lolium sp.					10,8	26,9	246,2	37,3		5,1	0,13			
3m route 30700	7	9,6		35	58	195	827	55000		102	0,32			

véh/jr													
Lolium sp.				6,8	26,2	159,3	44,7	3,4	0,15				
contrôle	7,5- 8,1	0,6- 0,8	12-16					0,3	ER				
P de terre avec peau								0,11					
P de terre sans peau								0,13					
tige								0,63					
contamination								106,5	ER	9			
P de terre avec peau								3,72					
P de terre sans peau								1,78					
tige								38,75					
sol 1	7,3		12,8	28	41,5								
laitue								1,65	ER				
								1,71	HNO ₃				
sol 2	6,94		21,7	18,7	33					10			
laitue								3,88					
								5,33					
sol 5	5,54		53,3	27,9	46,3								
laitue								0,26					
								1,82					
sol	4,75					9,69	19,88	234,88	16,43	0,54	HNO ₃		
herbes								20,77	79,12	325,73	21,39		11
mousses								4,60	39,6	335,34	12,56		
aiguilles de pin								7,33	63,26	241,53	8,73		
sol site 1	6,8	12,1	3,9			704				4470	19,8		
laitue								80,3		13,6	5,7		
endive								197		21,9	17,4		
carotte								23,1		2,1	0,11		
sol site 18	6,8	18,1	14,4			249				573	0,89		
laitue								41,3		0,37	0,1		
endive								40,5		1,5	1		

carotte						14,8			0,07	0,33				
sol site 2	3,4-7,3	0,59-9,37		1-54		0,4-140	11-10500	33-3500	650-19700	1-69	6-7100	0,3-102	1-48	HNO ₃ H ₂ O ₂ HClO ₄
Graines céréales						1,9-41	21-145	6-108	21-375	0,2-1,6	0,1-15	0,1-3,6	0,1-1,6	
Paille céréales						0,4-9	5-720	5-380	28-1820	0,1-3	0,5-34	0,1-5,2	0,1-2,8	
P d Terre avec peau						1,2-9,8	16-68	2-26	11-130	0,5-4	0,5-4,5	0,3-1	0,1-0,4	HCl
P d Terre sans peau						0,6-10	21-84	2-23	11-102	0,2-1,4	0,2-4,3	0,3-0,9	0,1-0,6	
sol	7,2-7,91	0,73-1,94		17,3-49,6	18,05-40,1	19,8-49,3					16,2-1232,4	1,61-16,80		HNO ₃ +H ₂ O ₂
laitue, ray-grass, moutarde											1-55	0,15-11,06		HNO ₃ +H ₂ O ₂
sol 1	6,9	2,24		21,7	18,7							3,86		HNO ₃
laitue												3,2-4,4		HNO ₃
sol 2	5,8	2,07		49,4	40,3							0,57		
laitue												3,6-6,5		
sol non contaminé						16-48	50-84	350-540		190-42	6-14	0,23-0,36		HNO ₃ HClO ₄
laitue						5	22	85		5	4	0,14		HNO ₃
endive						12	68	150		2	2	0,45		
carottes						2	18	20		5	2	0,26		
sol contaminé						20-27	80-154	330-430		39-50	13-17	0,27-0,45		
laitue						5	30	70		1	5	0,65		
endive						5	32	80		2	5	0,4		
carottes						5	23	10		2	1	0,50		

Les teneurs retrouvées dans les végétaux diffèrent fortement selon l'espèce considérée et le métal étudié. Ainsi, les endives présentent des concentrations en plomb et en cadmium respectivement 10 et 160 fois supérieures à celles mesurées dans des carottes ayant poussé sur le même sol (Kugonic and Kopusar, 2000). De même, les radis présentent des concentrations en chrome 3 à 4 fois supérieures à celles mesurées dans des haricots (Samsøe-Petersen *et al.*, 2002). Il est important aussi de tenir compte de la partie du végétal prise en compte : les feuilles de radis présentent des concentrations en zinc et en cadmium respectivement 3 et 10 fois supérieures aux concentrations mesurées dans les tubercules (Lorenz *et al.*, 1997).

Il est à noter que, compte tenu du risque de transfert des EM dans la chaîne alimentaire jusqu'à l'homme (Tableau 7), la plupart des études ont été menées sur des plantes de culture, comestibles (pomme de terre, laitue, carotte, endive, choux...) (Fatyanos *et al.*, 2001). Il ressort de cette étude que la laitue accumule particulièrement le cadmium dans ses feuilles, tout comme l'épinard, qui accumule aussi le fer ; à l'opposé, le chou apparaît comme le légume accumulant le moins les éléments métalliques.

Tableau 7 : Coefficients de transfert (CT) des éléments métalliques entre le sol et les plantes (Senesi *et al.*, 1999)

	Cd	Cr	Cu	Ni	Pb	Zn
CT	1-10	0,01-0,1	0,1-1	0,1-1	0,001-0,1	1-10

1.2.1.3.1. Les paramètres physico-chimiques du sol

Plusieurs propriétés édaphiques influencent le transfert des EM du sol vers les plantes : pH, CEC, texture, Carbone organique ou taux de matière organique. Le pH est un des paramètres le plus important contrôlant la mobilité des EM et leur phytodisponibilité (Dudka, *et al.*, 1995; Kugonic and Kopusar, 2000; Lehoczy, *et al.*, 1998) : plus le pH d'un sol est bas, meilleure est la disponibilité métallique. Dans des sols bien aérés acides, plusieurs métaux dont le cadmium et le zinc sont mobiles et disponibles pour les plantes ; dans des sols faiblement aérés neutres ou alcalins, la disponibilité des métaux diminue (Tableau 8) (Kabata-Pendias, 2004). Lehoczy *et al.* (2000) ont montré que le pH acide d'un sol augmente la mobilité du cadmium, jusqu'à concerner 60% du cadmium total présent dans le sol. Lors d'une étude sur la pomme de terre, une des principales cultures du monde, Piotrowska *et al.* (1997) ont étudié la biodisponibilité du cadmium en fonction du pH et de la matière organique. Quand le pH est inférieur à 8, les concentrations en cadmium retrouvées dans les tubercules s'échelonnent entre 0 et 1 mg.kg⁻¹. Dès qu'il dépasse 8, les concentrations dans les tubercules augmentent et varient entre 3 et 4,5 mg.kg⁻¹ : l'augmentation de

la phytodisponibilité du cadmium est liée à la formation d'espèces chimiques du cadmium facilement mobilisable ainsi qu'au relargage de Cd lors de la décomposition de la matière organique en condition alcaline.

Tableau 8 : Biodisponibilité des éléments métalliques pour les plantes en fonction des conditions édaphiques (d'après Kabata-Pendias et Pendias, 2002)

Conditions édaphiques		Phytodisponibilité		
Potentiel redox	pH	facile	moyenne	réduite
oxydation	< 3	Cd, Zn, Cu, Ni	Mn	Fe, Cr
oxydation	> 5	Cd, Zn		Fe, Cr
oxydation, riche en Fe	> 5		Cd, Zn	Fe, Cr
réduction	>5		Cd, Zn, Cu, Mn, Pb	Fe, Cr
réduction, avec H ₂ S	> 5		Mn	Fe, Cr

De même, lorsque les teneurs en argile et en matière organique augmentent, la phytodisponibilité des EM diminue : la présence de minéraux argileux (teneur > 10%) et de matière organique (Corg > 3%) abaisse la mobilité et la disponibilité du zinc et du manganèse (Tack and Verloo, 1996).

I.2.1.3.2. Relations entre teneurs en EM du sol et les plantes

Les études portant sur l'existence ou non d'une relation entre les teneurs en EM dans les sols et les concentrations mesurées dans les plantes sont multiples et contradictoires, selon les espèces végétales étudiées et les caractéristiques des sols. Ainsi Piotrowska et Kabata-Pendias (1997) ont montré que l'absorption des EM par les plantes est liée à leur niveau dans le sol : dans le cas des plants de pomme de terre, la relation la plus significative se rencontre dans les branches dans lesquelles les concentrations en cadmium sont dix fois supérieures à celles rencontrées dans les tubercules. Cette constatation traduit, de plus, un transfert facile du cadmium des racines aux parties supérieures. Samsoe-Petersen *et al.* (2002) ont étudié la corrélation entre la concentration d'un EM dans le sol et sa concentration dans les végétaux : pour la plupart des espèces végétales, le coefficient de corrélation R^2 est élevé pour le chrome, le cuivre, le plomb et le zinc (compris entre 0,76 et 0,96), faible pour le nickel (compris entre 0,2 et 0,9) et très bas dans le cas du cadmium (compris entre 0,006 et 0,4). Dans une étude similaire, de fortes corrélations ont été observées pour le cadmium ($R^2 = 0,83$), le plomb, le nickel et le manganèse ($R^2 = 0,94$), avec le classement suivant des EM en fonction de leur R^2 décroissant : Mn > Ni > Cd > Pb > Cu > Cr (Fakayode and Onianwa, 2002). Toutefois, d'autres auteurs n'ont trouvé aucune relation entre les teneurs en EM dans les sols et les concentrations dans les plantes étudiées (Terrés *et al.*, 2002) : les concentrations en zinc

mesurées dans des pieds de sucre de canne ou de laitue ne sont pas en relation directe avec la teneur totale en Zn dans le sol. Par contre, les concentrations en zinc mesurées dans des Graminées seraient reliées aux fractions extraites par l'eau ou le NaNO_3 (Speir *et al.*, 2003). Même dans des sols où les concentrations en Cd, Pb et Zn sont élevées, la teneur totale en EM ne signifie pas que la totalité des EM est disponible pour les plantes (Kugonic and Kopusar, 2000). Au niveau de la rhizosphère, l'activité des micro-organismes et la sécrétion d'exudats peuvent modifier la forme des EM et donc leur disponibilité. Les exudats racinaires, substances impliquées dans l'absorption des EM, sont des composés de poids moléculaire léger tels que l'acide oxalique, l'acide acétique ou les acides aminés (Kabata-Pendias, 2004). Un stress environnemental peut entraîner une modification de la composition des exudats sécrétés, pouvant être à l'origine d'une augmentation de la disponibilité des EM.

Les teneurs en EM dans les sols peuvent être toxiques pour les plantes et, par exemple, exercer une influence sur les rendements des cultures : des concentrations inférieures à 3 mg.kg^{-1} en cadmium n'ont aucun effet sur le rendement de la culture de pommes de terre alors que, pour des concentrations pouvant atteindre 100 mg.kg^{-1} , la baisse est significative même pour des pH élevés. Un doublement des concentrations en chrome ou en cadmium dans un sol entraîne une diminution de 40% ou de 84%, respectivement, de la croissance de semences de blé (Athar and Ahmad, 2002). La combinaison de deux métaux ne provoque pas une addition de leurs effets toxiques mais les effets observés sont liés au métal le plus toxique des deux. En parallèle, des interactions entre métaux peuvent survenir : le zinc et le cuivre se comportent comme des antagonistes au nickel lors de son prélèvement par les plantes (Schwartz, 1997). Quand le rapport Zn/Cd des concentrations dans le sol dépasse 109, le zinc exerce un effet inhibiteur sur l'absorption du cadmium par les plantes : pour des concentrations inférieures en cadmium (rapport Zn/Cd de 147), aucun effet antagoniste du zinc n'est visible (Piotrowska and Kabata-Pendias, 1997).

I.2.1.3.3. Les plantes hyperaccumulatrices

Certaines espèces sont capables de se développer sur des sols très riches en éléments métalliques grâce à des mécanismes de tolérance (Murray *et al.*, 2000 ; Schwartz, 1997 ; Peakall and Burger, 2003) faisant appel à deux processus : l'exclusion et l'accumulation (Baker, 1991). L'exclusion se traduit par la réduction de l'absorption racinaire et la diminution du transfert des EM des racines vers les parties supérieures. L'accumulation survient essentiellement dans les tiges : les métaux sont principalement concentrés dans les parties aériennes de la plante que les concentrations en EM soient faibles ou élevées.

Certaines plantes prélèvent et transfèrent le EM de manière linéaire : elles sont indicatrices, la concentration en EM dans la plante reflète celle dans le sol. Les stratégies mises en œuvre par les plantes sont donc de trois types : indicatrices, exclusives ou accumulatrices (Figure 4).

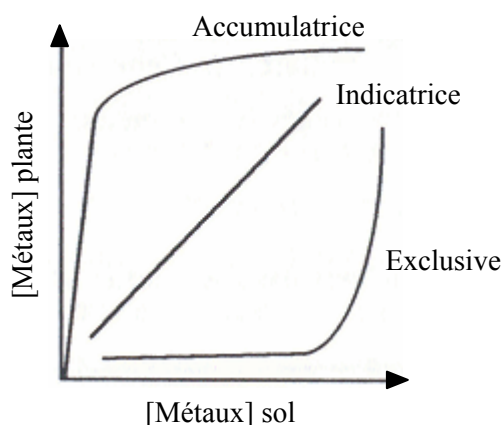


Figure 4 : Différentes réponses des plantes à la présence de métaux dans les sols (Baker, 1981)

Les plantes accumulatrices ou métallophytes présentent des concentrations en EM dans leurs tissus non proportionnelles aux concentrations en métaux des sols sur lesquels elles se développent (Tableau 9). Contrairement à la majorité des espèces végétales concentrant les EM extraits dans les racines, les plantes hyperaccumulatrices les transfèrent en majorité dans les parties aériennes.

Les propriétés particulières des plantes métallophytes, tolérance et prélèvement des EM, sont intéressantes pour la remédiation de sites pollués (Song *et al.*, 2004) : la phytoextraction utilise ces plantes capables de prélever les métaux toxiques et de les accumuler dans les parties aériennes (*Thlaspi caerulescens* peut accumuler le zinc à des concentrations allant jusqu'à 3% de la masse sèche foliaire), avant leur récolte et leur incinération (Schwartz, 1997). Une des hypothèses apportées à ce phénomène serait une stratégie de défense contre les herbivores : Boyd *et al.* (2002) ont ainsi montré que des escargots terrestres *Helix aspersa* préfèrent se nourrir de feuilles de plantes non hyperaccumulatrices que des feuilles de *Senecio coronatus* ayant accumulé de grandes concentrations de nickel (12100 mg.kg⁻¹ de nickel).

Tableau 9 : Concentrations en éléments métalliques dans les parties aériennes des plantes (Kabata-Pendias and Pendias, 1986) en mg.kg⁻¹ PS

	Élément essentiel	Teneur normale	Critique pour plantes sensibles	Excessif ou toxique	Tolérable pour plantes de culture	Plantes hyperaccumulatrices
Cd	-	0,05-0,2	5-10	5-30	3	> 100
Cr	-	0,1-0,5	1-2	5-30	2	
Cu	2-5	5-30	15-20	20-100	50	

Ni	-	0,1-5	20-30	10-100	50	> 1000
Pb	-	5-10	-	30-300	10	> 1000
Zn	10-20	27-150	150-200	100-400	300	> 10000

1.2.1.4. Transfert des polluants vers les invertébrés terrestres

Les organismes terrestres ont, potentiellement, plusieurs voies d'absorption dépendant principalement de l'écologie de l'organisme considéré (Peijnenburg *et al.*, 2000 ; Heikens *et al.*, 2001) :

- voie digestive par ingestion de nourriture (sol, végétaux ou animaux en décomposition, eau)
- voie cutanée par contact direct avec les polluants du sol
- voie respiratoire par inhalation de gaz et de particules en suspension dans l'atmosphère.

Les principales voies d'exposition de l'organisme, *Helix aspersa aspersa*, utilisé lors de nos expériences, sont présentées sur la Figure 5.

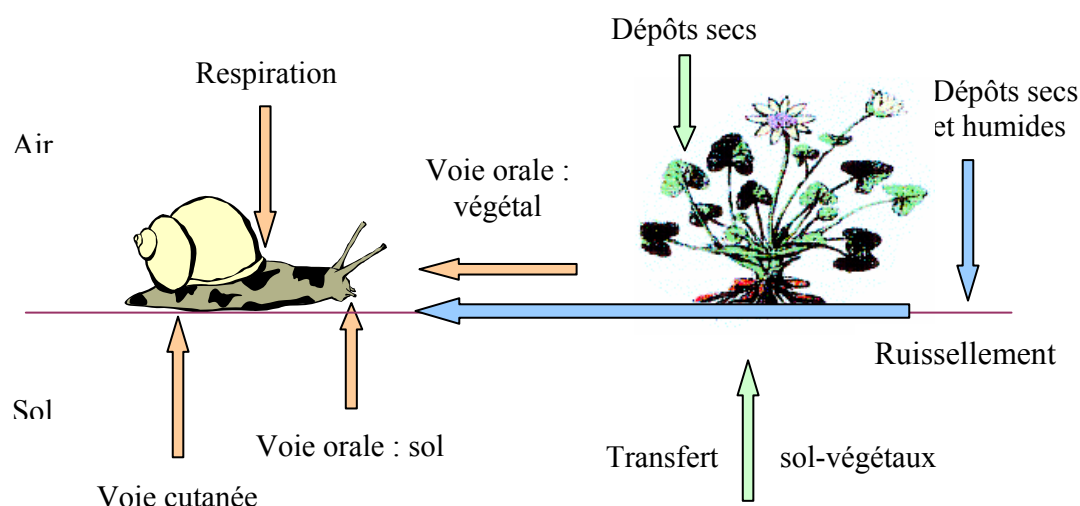


Figure 5 : Différentes voies de contamination d'*Helix aspersa aspersa*

Les risques encourus par les organismes dépendent de la durée d'exposition au toxique, de l'importance des dommages physiologiques engendrés (diminution du taux de croissance, de reproduction ou de survie) et de la vitesse à laquelle l'organisme est capable de recouvrer son état d'origine, ou **réversibilité**, une fois le toxique éliminé, inactivé ou transformé (van Straalen, 1994). L'évaluation de l'**exposition** est difficile à réaliser mais revêt une importance capitale : des différences entre espèces peuvent s'expliquer par des expositions différentes. Ainsi, les organismes vivant à l'interface air-sol sont exposés à des doses supérieures de contaminants car ces derniers tendent à se concentrer à ce niveau. De plus, chaque espèce présente une **sensibilité** propre déterminée par les propriétés intrinsèques des organismes, comme la présence de système de

détoxification adapté ou de cibles biochimiques potentielles : elle s'exprime grâce aux doses létales (DLx) ou concentrations ayant un effet (CEx). Par exemple, Scharenberg et Ebeling (1996) ont déterminé les DL₅₀ (dose de toxique entraînant la mort de 50% de la population étudiée) de sol pour *Eisenia fetida* : 555 mg Cu.kg⁻¹ PS, 745 mg Zn.kg⁻¹ PS, 3700 mg Pb.kg⁻¹ PS et des concentrations supérieures à 1000 mg Cd.kg⁻¹ PS. Exposition, sensibilité et réversibilité déterminent la vulnérabilité d'une espèce (van Straalen, 1994) : les espèces vulnérables ont de fortes probabilités d'être exposées, possèdent une sensibilité inhérente à l'espèce et ne sont pas capables de réversibilité après les perturbations.

L'écotoxicité d'une substance varie non seulement entre les espèces mais aussi en fonction des caractéristiques du sol, pouvant influencer la bioconcentration en métaux par modification de leur biodisponibilité (Lock and Janssen, 2001). Le cadmium présente des toxicités aiguës, vis-à-vis d'*Eisenia fetida*, différentes en fonction de la variation des propriétés édaphiques :

- toxicité plus élevée dans un sol acide sableux,
- toxicité intermédiaire dans un sol limoneux, avec un pH élevé, un taux élevé d'argiles et une faible teneur en matières organiques,
- toxicité réduite dans un sol ISO avec un pH élevé et de fortes teneurs en matières organiques et argiles.

Les comparaisons entre études sont difficiles à réaliser car pour un même sol, tel que le sol ISO, de grandes différences dans les résultats obtenus apparaissent : la CL₅₀ à 14 jours, pour *Eisenia fetida*, varie de 374 à 1843 mg Cd.kg⁻¹ PS, celle pour *Folsomia candida* de 818 à 3930 mg Cd.kg⁻¹ PS.

Les concentrations mesurées dans les animaux sont déterminées par la balance entre le taux d'absorption et le taux d'excrétion. Ces taux varient d'une espèce à une autre et sont déterminants pour la capacité d'accumulation des différents organismes terrestres. La variation des quantités accumulées dépend non seulement des caractéristiques physiologiques spécifiques à une espèce (mode de nourriture, régime alimentaire, cinétiques d'accumulation et d'élimination ou stratégies de compartimentation mises en œuvre) mais aussi de l'âge ou de facteurs environnementaux (van Straalen, *et al.*, 2001).

Une distinction doit être faite entre les métaux essentiels et non essentiels. Dans le cas des métaux essentiels comme le zinc et le cuivre, les invertébrés ont développé des mécanismes de régulation leur permettant de maintenir à un niveau constant leur concentration interne, pour une certaine gamme de concentrations rencontrées dans les sols (Heikens, *et al.*, 2001; van Straalen, *et al.*, 2001). Au contraire, la régulation des métaux non essentiels est très faible voire nulle, entraînant leur accumulation dans les organismes (Jess et Marks, 1998).

Toutefois, certaines espèces peuvent présenter de fortes concentrations en zinc dans leurs tissus, sans pour autant montrer des signes de toxicité (Lock and Janssen, 2001). Même si les concentrations dans les sols sont faibles, les concentrations atteintes dans les animaux peuvent dépasser les seuils toxiques par biomagnification ou bioaccumulation dans des organes spécifiques (Gorree, *et al.*, 1995). Des modèles ont été développés pour tenter d'estimer les risques encourus par les animaux sur les sites contaminés et suivent l'équation suivante :

$$[\text{consommateur}] = \sum [\text{nourriture}]_i \times \% \text{ chaque nourriture} \times \text{BAF}_i$$

avec $\text{BAF}_i = [\text{organisme}] / [\text{nourriture}]_i$ appelé **facteur de bioaccumulation**
ou $\text{BAF}_i = [\text{organisme}] / [\text{environnement}]$ appelé **facteur de bioconcentration**

Si le toxique n'est pas dégradé le long de la chaîne trophique, il est transmis d'un organisme à un autre: avec augmentation du taux de la substance concentrée depuis le producteur primaire jusqu'aux derniers consommateurs : on parle alors de **bioamplification**. Le Tableau 10 regroupe plusieurs études permettant d'évaluer le transfert des EM du sol aux végétaux puis aux différents consommateurs. Dans une étude sur le mode d'exposition au zinc dans un agrosystème, Winder *et al.* (1999) ont montré que le scarabée accumule du zinc *via* la chaîne sol - plante (froment) – herbivore (pucerons) – prédateur (scarabée). Ainsi, les concentrations mesurées dans les différents maillons de cette chaîne sont, respectivement, 31,1 – 31,7 – 116 – 242 mg Zn.kg⁻¹ PS. Les facteurs de transferts entre les maillons plante-herbivore et herbivore-prédateur sont de 3,7 et 2,1 : il y a donc transfert du zinc des plantes au prédateur. De plus, la concentration observée dans les scarabées s'avère être en relation avec la quantité de pucerons ingérés et le taux d'amendement des boues sur la parcelle étudiée.

Dans une étude plus récente, Scheifler *et al.* (2002) ont étudié le transfert et les effets du cadmium sur une chaîne alimentaire expérimentale, impliquant l'escargot *Helix aspersa* et le carabe *Chrysocarabus splendens* (Scheifler, *et al.*, 2002). Les résultats obtenus montrent une accumulation du cadmium dans les tissus des escargots à partir de farine contaminée par du cadmium, avec des facteurs de bioaccumulation compris entre 1.87 et 3.39. Au niveau du prédateur, l'augmentation des concentrations en cadmium dans les tissus de ses proies entraîne une hausse de la mortalité des carabes, pouvant atteindre 31 % pour les animaux exposés aux plus fortes concentrations.

Tableau 10 : Teneurs en éléments métalliques en mg.kg⁻¹ PS, rapportées par différents auteurs, dans les différents maillons de chaîne alimentaire (sol – végétation – consommateur – **prédateur**)

Concentrations en mg.kg-1 PS dans le sol, les végétaux et les animaux								Référence
Espèce	Cu	Zn	Mn	Fe	Ni	Pb	Cd	Biblio
Sol amendé		31.1						
<i>Froment</i>		31.7						Winder <i>et al.</i>
Puceron		116						1999
Scarabée		242						
Sol	4.6	22				40.4	0.07	
<i>Litière</i>	5.3-10.9	68-88				0.9-2.9	0.1-0.3	Scharenberg
<i>Arion sp.</i>	51.2	320				0.5	3.62	et Ebeling,
Scarabée	192	382				1.2	7.58	1996
Sol plombé						16200		
<i>Salicorne</i>						6.25		Hui, 2002
<i>Horn snail</i>						1987		
Sol 400m usine	58.6	276	20400	54600	43.1	54.9	< 1	
<i>Litière</i>	24.5	122	3100	44300	43.1	13.2		van Straalen
Ver de terre	9.3-19.5	336-480		374-3309		0.5-126	6.2-26.9	<i>et al.</i> ,
Scarabée	5.8-32.4	78.8-170		59.6-438		12.4-59.6	2.32-9.16	2001
Cd dans farine							13	
<i>Helix aspersa</i>							38.11	Scheifler
Carabe							0.04	2002a
Cd dans farine							83.20	
<i>Helix aspersa</i>							282.33	
Carabe							0.53	
Site témoin						17.56		
Ver de terre						56.2		Cortet <i>et al.</i>
Site pollué						1908.57		1999
Ver de terre						133.6		
250 m mine	100.2	2743				2440	23.6	
<i>Helix pomatia</i>	50	10000				330	280	Rabitsch
700 m mine	54	1187				347	8.9	1996
H.p.	75	2000				250	100	
1000 m mine	62.9	1212				828	11.4	
H.p.	30	3500				210	100	
Site témoin	13.7	85.1				10.5	0.12	
<i>H. enggadensis</i>	100.3	38.5				12.8	16.2	Swaileh <i>et al.</i> ,
Proximité route	23.8	128.3				149.9	0.45	2001a
H.e.	132.4	69.1				24.3	27.8	
Amendement								Scheifler <i>et al.</i> ,
H.a.a.	16.83	68.6			0.76	0.66	0.22	2003

EN RESUME

Le cadmium est particulièrement dangereux car il combine plusieurs particularités : un des plus mobile EM, facilement assimilable, tendance à s'accumuler dans la chaîne alimentaire, persistant dans la nature et donc peut poser de sérieux problèmes d'empoisonnement. N'ayant pas de fonction essentielle, il peut être très toxique pour les végétaux, les animaux ou les hommes.

Le plomb a une mobilité réduite dans le sol et tend à s'accumuler dans les horizons de surface.

Le zinc possède une faible toxicité. C'est un élément trace essentiel pour les animaux et les plantes, pouvant devenir toxique quand ses concentrations sont trop élevées.

Le chrome est le moins toxique des EM à cause de son insolubilité dans la plupart des conditions : il n'a pas d'effet sur la croissance des plantes sauf quand les concentrations deviennent trop élevées.

Le cuivre, le manganèse et le fer sont des éléments constitutifs essentiels avec des fonctions spécifiques dans le métabolisme des végétaux ainsi que pour l'homme et les animaux.

Phytotoxicité des EM : Cd > Cu > Ni > Zn > Pb > Cr

I.2.2. Devenir des HAP dans les sols

Dans les sols, les HAP peuvent s'accumuler (liaison avec des composants du sol ou transfert dans les organismes), se dégrader, se volatiliser (dans le cas des composés les plus légers) ou migrer dans l'eau, par ruissellement pour les eaux de surface et par percolation pour les eaux souterraines (Jones *et al.*, 1996). La dégradation des HAP dans le sol est essentiellement due à l'action des microorganismes. Ces derniers peuvent utiliser les HAP dans leur métabolisme comme source de carbone. Les vitesses de dégradation varient selon les conditions environnementales (température, type de sol, présence d'autres contaminants, Wild *et al.*, 1991 ; Cooper, 1991) et selon la masse moléculaire des composés. Pour les HAP les plus lourds (au moins 4 cycles), la dégradation est quasi-nulle (Groenewegen in DDASS 76, 1994). Les demie vies de biodégradation ont été évaluées pour plusieurs HAP y compris l'anthracène [de 170 jours (Herbes et Schwall, 1978) à 8 ans (Wild *et al.*, 1991)]; le phénanthrène [de 2,5 à 210 jours (Sims et Overcash, 1983) à 5,7 ans (Wild *et al.*, 1991)], et le BaP [8,2 ans (Wild *et al.*, 1991) et de 0,3 à 58 ans (Herbes et Schwall, 1978)]. En parallèle, les polluants organiques subissent des processus de vieillissement, ou «ageing», réduisant leur biodisponibilité par la formation de résidus non extractibles (Hatzinger et Alexander, 1995), le sorbant principal des molécules hydrophiles étant la matière organique. Ce processus est significatif

en toxicologie car il permet une réduction de l'assimilation, et donc une diminution des toxicités aiguës et chroniques de ces composés (Alexander, 2000).

La principale voie d'exposition aux HAP pour les végétaux à feuilles est le contact direct entre les feuilles et le sol contaminé. Ainsi, une espèce de laitue à feuilles larges présente des concentrations en HAP dix fois supérieures à celles rencontrées dans les feuilles étroites d'une espèce différente (Samsoe-Petersen, *et al.*, 2002). Les concentrations totales en HAP mesurées dans les plantes sont très variables, selon les espèces considérées et l'origine de la contamination. A proximité d'une autoroute, les concentrations mesurées dans des laitues varient de 17 à 90 ng.g⁻¹ PS alors que celles retrouvées dans des oignons ou des tomates peuvent atteindre 1900 ng.g⁻¹ PS. A proximité d'une mine, les concentrations en HAP totaux dans des laitues atteignent jusqu'à 920 ng.g⁻¹ PS (Bakker, *et al.*, 2000). Après absorption, les HAP subissent peu de transfert ou de déplacement dans la plante (Edwards, 1986). Peu de travaux ont été menés sur l'évaluation de la biodisponibilité des HAP pour les organismes terrestres autres que les annélides (Belfroid *et al.*, 1995 ; White *et al.*, 1997) ou les microorganismes (White *et al.*, 1997). Toutefois, leur déposition continue via l'air associée à leur persistance due à l'absorption sur la matière organique morte, provoque une accumulation dans les couches superficielles des sols : les animaux saprophytes (ver de terre ou isopodes) sont donc exposés à des doses supérieures de HAP mais ils possèdent un système métabolique efficace leur permettant de maintenir leurs concentrations internes réduites (somme de 10 HAP retrouvée dans *Arion subfuscus* 230 ng.g⁻¹ ou dans les Hexapodes 750 ng.g⁻¹) (van Straalen, 1994).

Lors de nos études, cette évaluation vis-à-vis des escargots terrestres sera évaluée par la mesure directe des concentrations en HAP dans leurs tissus.

I.3. Réglementation

Le sol est un compartiment essentiel des écosystèmes. Sa contamination par des polluants entraîne des problèmes de contamination de la chaîne alimentaire, pouvant avoir une incidence sur la santé humaine directement ou indirectement, *via* les végétaux. Une réglementation a donc été mise en place afin de définir les teneurs dans les sols acceptables et les seuils d'intervention dans le cas des polluants organiques (Tableau 11) et des polluants métalliques (Tableau 12). Dans certains pays, comme la Grande Bretagne, les seuils ont été fixés en fonction de l'utilisation prévue des sites (sols destinés à la production agricole, jardins familiaux et espaces de loisirs).

Tableau 11 : Normes « sols » en vigueur aux Pays Bas pour les HAP et classification des sols en fonction de leurs concentrations en mg.kg⁻¹ de poids sec (PS)

	Σ 10 HAP (mg.kg ⁻¹ PS)	Σ 16 HAP (mg.kg ⁻¹ PS)
Pays Bas, 1997		
valeur usuelle rencontrée A	1	
valeur d'intervention C	40	
Maliszewska-Kardybach, 1996		
pas de contamination		< 0,2
légère contamination		0,2 – 0,6
contamination		0,6 – 1
forte contamination		> 1

Tableau 12 : Différentes normes concernant les limites des teneurs totales en éléments métalliques dans les sols, en mg.kg⁻¹ de poids sec (A : niveau de référence du seuil d'alerte, B : seuil d'étude, C : seuil de décontamination)

	Cd	Pb	Zn	Cr	Cu	Ni
France, P. Godin 1983						
seuil d'anomalie	2	100	300	150	100	50
seuil d'investigation	4	200	600	300	200	100
seuil de traitement	10	500	1500	750	500	250
seuil d'urgence	20	1000	3000	1500	1000	500
France, 1998, Norme NF U 44-041						
	2	100	300	150	100	50
Pays Bas, 1997						
valeur usuelle rencontrée A	0,8	85	140	100	36	35
valeur d'intervention C	12	530	720	380	190	210
Directive européenne 1986						
valeur limite	1	50	150		50	30
valeur limite	3	300	300		140	75
Grande Bretagne						
jardins familiaux	3	500		600		
espaces de loisirs	15	2000		1000		
Québec 1988						
critère indicatif A	1,5	50	100	75	50	50
critère indicatif B	5	200	500	250	100	100
critère indicatif C	20	600	1500	800	500	500
Canada						
critère fédéral de remédiation	3	375	600	750	150	150

Les valeurs fixées par la norme AFNOR sont placées trop haut pour signaler des anomalies, naturelles ou anthropiques, et donc pour servir valablement de seuils d'alerte. Baize (1997) propose d'abaisser ces valeurs et de définir les « seuils d'investigation » suivants : 0,6-0,8 mg Cd.kg⁻¹, 50-60 mg Pb.kg⁻¹, 150 mg Zn.kg⁻¹, 100 mg Cr.kg⁻¹, 30-35 mg Cu.kg⁻¹ et 75 mg Ni.kg⁻¹.

De plus, les valeurs sont fixes quelque soit la nature du sol, alors qu'elle joue un rôle important dans la mobilité et la biodisponibilité des métaux. Dans cette optique, les normes hollandaises sont modulables selon les teneurs en matières organiques et minérales du sol étudié. Ceci explique donc leur utilisation fréquente en France comme valeur de référence. La correction des valeurs seuil et d'intervention est différente selon le polluant considéré :

- pour les métaux

$$V_c = ((V_s \times (A+B \times AR)) + (C \times MO)) / ((A + B \times 25) + (C \times 10))$$

- pour les composés organiques

$$V_c = V_s \times MO/10$$

avec V_c : valeur corrigée

V_s = valeur sol standard (10% matière organique et 25% argiles)

A, B et C : constantes de correction fonction de l'élément

AR : % d'argile

MO : % de matières organiques.

De même, les concentrations de base dans les sols non contaminés sont exprimées dans les Flandres, Belgique, en fonction des pourcentages en argiles et en carbone organique dans les sols (Tack *et al.*, 1999) (Tableau 13).

Tableau 13 : Concentrations de base en éléments métalliques (mg.kg⁻¹ PS) pour les Flandres, Belgique, en fonction du contenu des sols en argiles et carbone organique Corg

	Argile 5%		Argile 15%		Argile 25%	
	Corg 1%	Corg 3%	Corg 1%	Corg 3%	Corg 1%	Corg 3%
Cd	0,6	1	1,1	1,5	1,5	2
Cu	17	21	21	26	23	29
Pb	38	51	47	60	53	68
Zn	56	70	72	88	84	101

La présence de polluants dans l'environnement peut être source de risques pour les cultures, la faune et, à terme, pour l'homme. Cette toxicité est fonction de la mobilité et de la disponibilité des polluants pour les végétaux et les différents organismes concernés. Les organismes ont développé des stratégies de résistance vis-à-vis des toxiques : ainsi, la compartimentation et l'isolement des polluants contribuent à diminuer leurs effets délétères.

Face à ce constat, les pouvoirs publics prennent conscience de l'importance de limiter les émissions de polluants lors des multiples processus industriels mais surtout de la nécessité d'établir des diagnostics, aussi précis que possible, des sites sensibles afin de suivre les niveaux de contaminants dans les sols et d'évaluer leur toxicité potentielle.

Chapitre II. DEVENIR DES POLLUANTS DANS LES ORGANISMES ET TOXICITE

Dans l'environnement, les métaux sont présents, le plus souvent, à l'état de traces. En raison de la complexité des sols, l'évaluation de la contamination métallique s'avère très délicate. Les méthodes chimiques utilisées ne donnent que des informations fragmentaires sur les polluants présents, sans aborder leurs éventuelles conséquences sur l'écosystème. Dans cette optique, les analyses en laboratoire, permettant de connaître le niveau de contamination d'un site, doivent être couplées à des expériences sur le terrain afin de déterminer les effets toxiques des polluants et leurs impacts sur l'environnement. L'**écotoxicologie** permet d'appréhender la pollution d'un écosystème.

II.1. Devenir des polluants dans les organismes

Pour évaluer les transferts de polluants dans les chaînes alimentaires, il est nécessaire de connaître leur devenir (accumulation, excrétion ou transformation), leur distribution au sein de l'organisme et leur forme de stockage.

II.1.1. Devenir des éléments métalliques dans les plantes

La majorité des éléments métalliques présents dans le sol est facilement absorbée par les plantes et redistribuée dans leurs tissus (Zn, Mn, Cd). A l'opposé, certains éléments peuvent être fortement retenus dans les racines des plantes et n'atteindront donc jamais les parties supérieures (Fe, Pb, Cr³⁺) (Banuelos et Ajwa, 1999). Le devenir des EM dans les plantes est fortement lié aux processus régulant le métabolisme minéral et l'homéostasie. En conditions physiologiques normales, les plantes absorbent, solubilisent, transportent et utilisent ou séquestrent un grand nombre d'éléments (Banuelos et Ajwa, 1999). Lorsqu'ils sont présents en excès, les éléments métalliques absorbés par les cellules racinaires sont majoritairement immobilisés et détoxifiés par la formation de complexes avec des composés organiques tels que les acides aminés ou les phytochélatines (Morel, 1996). Les phytochélatines sont des protéines de liaison des éléments métalliques contenant des groupements sulphydryl et carboxyl capables de chélater les éléments métalliques. Elles possèdent une forte affinité pour le cadmium, le plomb ou le cuivre et jouent un rôle important dans la détoxification des EM et le maintien de l'homéostasie. Les EM sont alors transportés dans les différentes parties des

plantes en fonction de l'élément métallique considéré mais aussi des caractéristiques physiologiques de la plante (Morel, 1996).

II.1.2. Devenir des éléments métalliques dans les invertébrés

II.1.2.1. Principales voies d'entrée dans l'organisme

La majorité des invertébrés terrestres, dont les gastéropodes, absorbent les EM essentiels ou toxiques par la nourriture et une absorption via l'épithélium digestif, ou par la peau (Marigomez, *et al.*, 2002; Scheifler, *et al.*, 2003). Une fois les différentes barrières biologiques passées (épithélium cutané et digestif), les éléments métalliques circulent dans l'organisme grâce à l'hémolymphe et sont distribués entre les différents organes où ils peuvent être stockés. Les hémocytes jouent un rôle important dans le métabolisme des métaux et leur distribution dans les différents tissus (Cheng et Sullivan, 1984; Suresh et Mohandas, 1990), grâce à leur faculté de phagocytose des corps étrangers (Bulla and Cheng, 1997 ; Marigomez *et al.*, 2002).

Le transfert des éléments métalliques, au travers des membranes plasmiques cellulaires, s'effectue majoritairement par diffusion passive ou par des mécanismes nécessitant de l'énergie comme le transport par des protéines membranaires, spécifiques ou non, ou par endocytose des molécules (Marigomez, *et al.*, 2002).

II.1.2.2. Différentes formes de stockage des EM

II.1.2.2.1. Les granules intracellulaires

Au niveau cellulaire, certains métaux sont directement dirigés vers des cellules spécifiques dans lesquelles ils seront séquestrés dans des granules de nature variée (Dallinger, 1993 ; Pihan, 2001). Les granules sont des structures sphériques, denses aux électrons, classés en quatre catégories par Hopkin (1989) en fonction des affinités des métaux pour les ligands oxygénés (classe A), les ligands azotés ou soufrés (classe B) ou pour les deux types de ligands (classe intermédiaire) (Annexe 2 : Nieboer et Richardson, 1980) :

➤ *les granules de type A*, constitués de couches concentriques de phosphates, de calcium et de magnésium, peuvent séquestrer des métaux de classe A et intermédiaire (Mn, Zn...). Chez les mollusques, ces granules, désignés concrétions ou sphérocristaux, permettraient la détoxification de ces EM ou la constitution de réserves de calcium. La tolérance de l'escargot vis-à-vis de concentrations élevées en Zn est due à l'incorporation de ce métal dans des granules de

pyrophosphate riches en calcium, présents dans les cellules à calcium de la glande digestive (Dallinger, 1993).

- *les granules de type B*, d'aspect plus hétérogène, contiennent de grandes quantités de soufre, probablement issues de la dégradation de métallothionéines (Dallinger, 1993 ; Coeurdassier, 2001), associées avec des métaux de classe B ou intermédiaire (Cu, Cd, Zn, Pb...). Ces granules présentent une forme de stockage importante permettant la détoxification des EM.

- *les granules de type C* sont composés presque exclusivement de fer, associés à d'autres EM (Pb ou Zn) chez les individus exposés à de fortes concentrations.

- Dans *les granules de type D*, aucun métal n'a jamais été détecté en quantité significative

- Cas particulier des concrétions à silice dans les cellules rénales (Pihan, 2001).

Lorsqu'ils sont séquestrés dans des granules, les EM peuvent être stockés dans les tissus pendant de longues périodes (Dallinger, 1993) ou excrétés dans la lumière du tube digestif (Rainbow, 2002). Ces granules ont été observés chez de nombreux invertébrés terrestres dont les gastéropodes (Coeurdassier, 2001 ; Pihan, 2001).

II.1.2.2.2. Les protéines liant les métaux

Au niveau moléculaire, quelques métaux tels que le zinc, le cuivre ou le cadmium, peuvent se lier à des métallothionéines cytosoliques ou d'autres protéines liant les métaux (Dallinger, 1993). Les métallothionéines sont des molécules de faible poids moléculaire, de composition en acides aminés distincts et riches en soufre, grâce auquel elles sont capables de lier des métaux des classes B ou intermédiaires. Inductibles lors d'exposition aux EM, les métallothionéines interviennent non seulement dans la détoxification des éléments toxiques mais aussi dans le maintien de l'homéostasie ou le métabolisme des éléments essentiels comme le cuivre ou le zinc, afin de les maintenir disponibles pour d'autres métalloprotéines comme l'hémocyanine (Dallinger, 1993 ; Hamza-Chaffai, *et al.*, 2000 ; Scheifler, 2002). Les métaux présentent une affinité variable pour les MTs selon l'ordre Hg>>Cu-Ag>>Cd>Pb>Zn>Co>Fe. Dans la glande digestive des escargots, un des isoforme d'une métallothionéine entre en jeu dans l'accumulation, la fixation et la détoxification du cadmium. Le second isoforme, présent lui dans le manteau, se lie exclusivement au cuivre et permet la régulation de la concentration intracellulaire en cuivre (Dallinger, *et al.*, 2000; Hamza-Chaffai, *et al.*, 2000). Quand les possibilités de liaison aux métallothionéines sont saturées, soit des effets toxiques apparaissent dans les cellules, soit une autre stratégie de détoxification intervient comme l'excrétion (Berger *et al.*, 1997). L'induction de la synthèse des métallothionéines, lors d'expositions au cadmium, au cuivre ou au zinc, permet leur utilisation comme biomarqueur d'exposition (Dallinger, *et al.*, 2000 ; Hamza-Chaffai, *et al.*, 2000).

II.1.2.3. Accumulation des EM

L'accumulation est un phénomène par lequel une substance, présente dans l'environnement, pénètre dans un organisme même si elle n'a aucun rôle métabolique, voire même si elle est toxique pour ce dernier (Ramade, 1992). L'accumulation traduit un état d'équilibre dynamique entre les processus d'absorption, de stockage et d'excrétion (Rainbow et Dallinger, 1993) et permet d'indiquer le niveau de contamination d'un milieu.

Parmi la faune du sol, les Collemboles, les Vers de terre, les Isopodes et les Gastéropodes présentent des facultés d'accumulation importantes. Boháč et Pospíšil (1989) ont proposé une classification des invertébrés terrestres en différents groupes en fonction de leur capacité à accumuler les métaux lourds (Tableau 14), représentée par le facteur de bioaccumulation pour chacun des métaux :

BAF > 2	macroconcentreur
$1 \leq \text{BAF} \leq 2$	microconcentreur
BAF < 1	déconcentreur

Tableau 14 : Classification des invertébrés terrestres selon Boháč et Pospíšil (1989) et les résultats obtenus par Dallinger (1993) pour [quelques gastéropodes terrestres](#)

Elément	Macroconcentreur	Microconcentreur	Déconcentreur
Cd	<i>Helix pomatia</i> , <i>Helix aspersa</i> , <i>Cepaea nemoralis</i> , <i>Arianta arbustorum</i>		
Cr	-	-	Toutes les espèces étudiées
Cu	Arachnides, Lombricidés, Isopodes, Diplopodes, <i>Helix pomatia</i> , <i>Helix aspersa</i> , <i>Arianta arbustorum</i>	-	Hétéroptères
Mn	-	Lombricidés	Lombricidés, Arachnides, Diplopodes, Isopodes
Pb	Lombricidés, Isopodes, Diplopodes, Chilopodes	Coléoptères, <i>Helix pomatia</i> , <i>Arianta arbustorum</i>	-
Zn	<i>Helix pomatia</i> , <i>Arianta arbustorum</i>	<i>Helix aspersa</i>	

II.1.3. Devenir des polluants organiques

La majorité des études concernant le devenir des polluants organiques, dont les HAPs, dans les organismes vivants ont été réalisées dans des écosystèmes aquatiques, afin d'évaluer leur

accumulation dans les sédiments et la faune ainsi que leur transfert dans la chaîne trophique par biomagnification (Sijm et Opperhuizen, 1989, Meador *et al.*, 1995 ; Tracey et Hansen, 1996 ; Van der Oost *et al.*, 2003). Les composés organiques peuvent s'accumuler dans les organismes après leur pénétration directement à partir de l'eau au niveau des branchies et de la peau, par ingestion de particules en suspension dans l'eau ou par la consommation d nourriture contaminée (Van der Oost *et al.*, 2003). Les BAF des HAP dans les organismes varient entre 0.01 et 10, selon le composé considéré (Bauman et Harshbarger, 1995).

Une fois que le polluant organique a pénétré dans un organisme, il se répartit entre quatre sites distincts :

- site de métabolisme où les polluants organiques sont métabolisés par des enzymes soit en métabolites détoxifiés (métabolites polaires hydrophiles plus facilement excrétables) soit, au contraire, en métabolites plus toxiques (phénomène d'activation).
- sites d'action toxique où les molécules interagissent avec des molécules endogènes (ADN, protéine) ou des structures cellulaires, à l'origine de toxicité
- sites de stockages dans les quels les polluants sont conjugués ou complexés. Chez les animaux, les structures de stockage sont surtout des structures lipophiles ou des membranes cellulaires.
- sites d'excrétion du contaminant ou de ses métabolites. L'excrétion se fait généralement par les fécès ou l'urine, en fonction des métabolites produits et de l'espèce.

II.2. Evaluation de la toxicité des polluants

II.2.1. Les organismes utilisés

La faune du sol présente des caractéristiques biotiques susceptibles de traduire les perturbations engendrées par le polluant vis-à-vis de la qualité d'un sol. Elle participe au fonctionnement du sol, en y assurant plusieurs fonctions : décomposition de la MO, régulation partielle des activités microbiennes, intervention dans le cycle des nutriments et création et conservation de la structure grumeleuse du sol. Acariens, collemboles, enchytréides, vers de terre, isopodes ou gastéropodes sont potentiellement des indicateurs biologiques (Cortet, *et al.*, 1999). Le Tableau 15 synthétise les différents types de réponses des organismes du sol en fonction de leur appartenance, soit aux indicateurs biologiques de bioaccumulation, soit aux indicateurs biologiques d'effets (toxicologiques ou écologiques).

Tableau 15 : Différents types de réponses étudiées chez les organismes bioindicateurs de la faune du sol (Ac : Acariens, Col : Collemboles, Ench : Enchytréides, V d T : Vers de Terre, Isop : Isopodes, Gast : Gastéropodes) d'après Cortet *et al.* (1999)

		Ac	Col	Ench	VdT	Isop	Gast
	Bioaccumulation		X		X	X	X
bioindicateurs toxicologiques	Fonction	X	X		X		
	Mortalité	X	X	X	X	X	X
	Reproduction / développement	X	X	X	X	X	X
	Perturbation neurologique				X		
	Biomarqueurs d'exposition		X		X	X	X
bioindicateurs écologiques	Abondance	X	X	X	X	X	X
	Biomasse	X	X	X	X	X	X
	Richesse spécifique	X	X	X	X	X	X
	Diversité	X	X	X	X	X	X

La bioaccumulation est un phénomène important qui donne des informations sur la biodisponibilité des polluants et entraîne souvent une biomagnification des polluants le long de la chaîne trophique. Dans le cas des éléments métalliques, leur bioaccumulation dépend de l'élément considéré, de sa concentration dans l'environnement mais aussi des conditions physiques et chimiques du sol (Cortet *et al.*, 1999).

II.2.2. Les tests écotoxicologiques

La toxicité potentielle d'une substance est évaluée par des **tests écotoxicologiques** : il s'agit d'essais expérimentaux déterminant l'effet d'un ou de plusieurs produits sur un groupe d'organismes sélectionnés, dans des conditions bien définies (Keddy *et al.*, 1994). Ces tests de toxicité, appelés aussi des bioessais, sont de deux types :

- *les tests de toxicité aiguë* se réalisent sur une durée très courte (par rapport au temps de génération de l'organisme). Leurs avantages sont leur rapidité et leur faible coût. Ces tests impliquent généralement des concentrations élevées du polluant; de ce fait, les effets à long terme des faibles concentrations ne sont pas mis en évidence.
- *les tests de toxicité chronique* se déroulent sur une relativement longue durée par rapport au temps de génération de l'organisme. Ce sont par exemple les tests sur la reproduction. Ils sont plus longs et plus coûteux que les tests aigus, mais ils permettent de mettre en évidence des effets à long terme d'un polluant.

De nombreux termes en relation avec les tests de toxicité ont été définis. La CSEO (Concentration maximale sans effet observée ou NOEC) correspond à la plus forte concentration testée n'entraînant pas d'effet statistiquement significatif par rapport aux témoins ; la CMEO (concentration minimale avec effet observé ou LOEC) correspond à la plus faible concentration testée pour laquelle un effet statistiquement significatif est observé par rapport aux témoins ; les CE 20 ou 50 correspondent aux concentrations efficaces à 20 ou 50%, concernant le paramètre étudié (par exemple, la concentration inhibant la croissance chez 50% des animaux testés) et déterminées statistiquement ; la CL 50 correspond à la concentration entraînant la mort de 50% des organismes testés.

A partir des résultats obtenus en laboratoire, concernant la toxicité aiguë et chronique des substances, l'évaluation des risques liée à un site dont les éventuelles contaminations sont identifiées est réalisable.

Les données présentées dans ce paragraphe sont issues des fiches toxicologiques éditées par l'INERIS. Les données de toxicité chronique ont particulièrement été retenues.

II.2.3. Toxicité aiguë et chronique des polluants

II.2.3.1. Le cadmium (22/01/2004)

II.2.3.1.1. Sources d'exposition et comportement

Le cadmium est un élément rare, présent dans la croûte terrestre à des concentrations entre 1 et 2 ppm, le plus souvent associé au zinc et au plomb. Le cadmium rejeté dans l'atmosphère provient de sources naturelles et anthropiques, telles que le raffinage de métaux non ferreux, la combustion de charbon et de produits pétroliers, l'incinération d'ordures ménagères, les engrais phosphatés ou la métallurgie. Dans l'environnement, il n'est quasiment jamais retrouvé à l'état particulaire mais est présent dans son état d'oxydation unique Cd^{2+} , sous forme d'oxyde, de chlorure ou de sulfure.

Dans les sols, le cadmium est assez mobile mais a tendance à s'accumuler dans les horizons de surface riches en matières organiques. Sa mobilité est fonction du pH. Peu volatile dans l'air, il est présent majoritairement sous forme particulaire.

II.2.3.1.2. Ecotoxicité

De nombreuses données sont disponibles concernant la toxicité du cadmium, c'est pourquoi seules les données concernant sa toxicité sur les invertébrés terrestres sont présentées dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Toxicité du chlorure de cadmium sur différents invertébrés terrestres

Organismes	espèce	Critère d'effet	Valeur ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ PS)	Référence
Annélides	<i>Eisenia fetida</i>	NOEC 56 jours	5	INERIS
	<i>Eisenia andrei</i>	NOEC 21 jours	10	INERIS
	<i>Enchytraeus albidus</i>	CL 50	554	Lock et Janssen, 2002a
CE 50		130		
Insectes	<i>Folsomia candida</i>	NOEC 42 jours	50	INERIS
		NOEC 35 jours	71-148	INERIS
		CL 50	778-977	Crommentuijn <i>et al.</i> (1995a, 1995b)
		CE 50	159-326	
		CSEO	34.8-326	
Gastéropodes	<i>Helix aspersa</i>	CE 50	140	Gomot, 1997

II.2.3.1.3. Toxicité pour l'homme

Les principales voies d'absorption du cadmium chez l'homme sont l'inhalation et l'ingestion. Une fois absorbé, il va être transporté dans le sang, fixé à l'hémoglobine ou à des métallothionéines, et va se concentrer principalement dans le foie et le rein (à hauteur de 50 à 70% du cadmium total) ainsi que dans le pancréas, les testicules, la glande thyroïde et les glandes salivaires. Il pourra enfin être excrété dans les phanères, les fécès ou l'urine.

Une intoxication aiguë due à ce métal, lors d'exposition par voie orale, est à l'origine de l'apparition de différents symptômes tels que des épisodes gastro-entériques, des vomissements, des diarrhées ou des douleurs musculaires. En cas d'inhalation de fumées de cadmium, la mortalité est estimée entre 15 et 20% des sujets exposés, trois jours après, suite à une irritation pulmonaire sévère.

Lors d'une exposition chronique à ce métal, le rein est l'organe cible principal ; des néphropathies irréversibles peuvent se développer, pouvant évoluer vers des insuffisances rénales. Des troubles respiratoires sont associés aux particules et poussières présentes dans les fumées, dus à leur caractère irritant. Dans certains cas, le squelette peut aussi être atteint par modification de métabolisme du calcium.

Selon la classification de l'IARC (International Agency for Research on Cancer), le cadmium et ses dérivés appartiennent au groupe 1 soit « agent cancérigène pour l'homme ».

II.2.3.2. Le chrome (02/02/2004)

II.2.3.2.1. Sources d'exposition et comportement

Le chrome est présent de manière ubiquitaire dans l'environnement, largement distribué dans la croûte terrestre principalement sous forme d'un minerai, la chromite. Seuls les composés trivalent et hexavalent sont détectés en quantité significative dans l'environnement, le Cr VI provenant majoritairement des activités industrielles. Le chrome rejeté dans l'atmosphère provient des émissions de l'industrie chimique, de la combustion du gaz naturel, des huiles ou du charbon, des poussières de routes ou d'usines produisant du ciment. Peu volatile, le chrome est également peu soluble dans l'eau. Une fois qu'il a atteint le sol, le Cr VI est largement réduit en Cr III, transformation favorisée par des conditions anaérobiques et un pH faible.

Le Cr III a une tendance plus importante que le Cr VI à s'adsorber sur les particules du sol.

II.2.3.2.2. Ecotoxicité

De nombreuses données sont disponibles concernant la toxicité du chrome, c'est pourquoi seules les données concernant sa toxicité sur les invertébrés terrestres sont présentées dans le Tableau 17. Il est important de souligner que le chrome VI possède une écotoxicité supérieure au chrome III.

Tableau 17 : Toxicité du chrome sur différents invertébrés terrestres

Organismes	espèce	Critère d'effet	Valeur mg Cr.kg ⁻¹ PS	Référence	
Annélides	<i>Eisenia fetida</i>	CE 50 Cr VI	792	INERIS	
		CL 50 Cr VI	146	INERIS	
	<i>Enchytraeus albidus</i>	CL 50	1620		
		CE 50	637	Lock et Janssen, 2002b	
		CSEO	560		
		CMEO	1000		
		<i>Eisenia fetida</i>	NOEC Cr III	32 (21 jours)	INERIS
			CE 50	892	
			CSEO	560	Lock et Janssen, 2002b
			CMEO	1000	
Insectes	<i>Folsomia candida</i>	CE 50	604		
		CSEO	560	Lock et Janssen, 2002b	
		CMEO	1000		
Gastéropodes	<i>Helix aspersa</i>	CMEO	250	Coeurdassier <i>et al.</i> , 2000	
		CE 50	355		

II.2.3.2.3. Toxicité pour l'homme

Le chrome est essentiel au métabolisme du cholestérol, des graisses et du glucose. Les principales voies d'absorption chez l'homme sont l'inhalation et l'ingestion. La majorité du chrome est réduit en Cr III et se distribue dans tout l'organisme. Son élimination s'effectue par excrétion urinaire.

Une intoxication aiguë au chrome se traduit par une inflammation massive du tube digestif suivie d'une nécrose, avec douleurs abdominales, vomissements et diarrhées. Dans le cas d'intoxication chronique, l'organe cible est le tractus respiratoire : les dérivés du Cr III et Cr VI provoquent des atteintes au site de contact telles que des irritations et démangeaisons nasales, des bronchites...Le chrome peut également avoir un effet allergisant, se manifestant par de l'asthme ou des dermatites. En milieu professionnel, lors d'exposition prolongée, des atteintes gastro-intestinales sont possible par inhalation (ulcération, douleurs stomacales, crampes, gastrites...).

Selon la classification de l'IARC, le chrome VI appartient au groupe 1 « agent cancérigène pour l'homme » alors que le chrome III appartient au groupe 3 « agent ne pouvant être classé pour sa cancérogénéicité pour l'homme ».

II.2.3.3. Le cuivre (18/03/2004)

II.2.3.3.1. Sources d'exposition et comportement

Le cuivre est présent naturellement dans les sols, à l'état natif. L'apport de cuivre dans l'environnement provient de sources naturelles comme le transport par le vent des poussières du sol, les éruptions volcaniques ou les feux de forêts ; les sources industrielles sont liées à son utilisation en métallurgie, à l'incinération d'ordures ménagères ou à la fabrication de fertilisants. 97% du cuivre libéré dans l'environnement se retrouve dans le sol. Ces derniers peuvent être contaminés par les scories d'extraction et de broyage du minerai de cuivre ou par l'épandage des boues de stations d'épuration.

Dans le sol, le cuivre s'accumule surtout dans les horizons de surface. Il se fixe préférentiellement à la matière organique et son comportement dépend de nombreux facteurs comme le pH, le potentiel d'oxydo-réduction, la capacité d'échange cationique, la matière organique ou la texture.

II.2.3.3.2. Ecotoxicité

De nombreuses données sont disponibles concernant la toxicité du cuivre, c'est pourquoi seules les données concernant sa toxicité sur les invertébrés terrestres sont présentées dans le Tableau 18.

Tableau 18 : Toxicité du cuivre sur différents invertébrés terrestres (juv : juvéniles, sem : semaines)

Organismes	espèce	Critère d'effet	Valeur mg Cr.kg ⁻¹ PS	Référence
Annélides	<i>Eisenia fetida</i>	NOEC Cu(NO ₃) ₂	32 (8 sem)	INERIS
	<i>Eisenia fetida</i>	NOEC Cu acétate	500 (8 sem)	INERIS
	<i>Enchytraeus albidus</i>	CL 50	671	Lock et Janssen, 2002a
		CE 50	305	
	<i>Eisenia andrei</i> juv	NOEC CuCl ₂	60 (3 sem)	INERIS
Gastéropodes	<i>Helix aspersa</i>	NOEC	500	Gomot, 2000
		CE 50	1200	

II.2.3.3.3. Toxicité pour l'homme

Le cuivre est un métal essentiel pour l'homme et les animaux : il intervient dans la synthèse de l'hémoglobine et est un co-facteur spécifique enzymatique. L'absorption se fait principalement par voie orale et par absorption gastro-intestinale ; l'élimination s'effectue par la voie biliaire.

Très peu de cas d'intoxication aiguë au cuivre sont rapportés. L'exposition chronique, en milieu professionnel, par inhalation provoque une irritation des voies aériennes supérieures et des troubles gastro-intestinaux et, parfois, des atteintes rénales. Lors de contact avec la peau, des dermatites peuvent apparaître.

Aucune classification du cuivre n'est fournie par l'IARC.

II.2.3.4. Le plomb (03/02/2003)

II.2.3.4.1. Sources d'exposition et comportement

Le plomb est présent dans tous les compartiments de la biosphère. Les sources principales d'émission de plomb dans l'atmosphère sont les fumées industrielles et les gaz d'échappement mais aussi les déchets industriels solides provenant de l'extraction des minerais de plomb, du recyclage des batteries électriques ou de l'affinage du plomb. Toutefois, depuis l'apparition de carburants non plombés, la contribution des gaz d'échappement est en nette diminution.

La plupart des composés inorganiques du plomb (galène, cérusite et anglésite) sont peu solubles dans l'eau, les composés halogénés ou les acétates de plomb étant plus solubles. Dans le sol, la mobilité du plomb est réduite en raison de sa forte affinité pour les constituants du sol (matière organique, oxydes de manganèse, argile). Il s'accumule donc dans les horizons de surface.

II.2.3.4.2. Ecotoxicité

De nombreuses données sont disponibles concernant la toxicité du plomb, c'est pourquoi seules les données concernant sa toxicité sur les invertébrés terrestres sont présentées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Toxicité du plomb sur différents invertébrés terrestres (sem : semaines)

Organismes	espèce	Critère d'effet	Valeur mg Pb.kg ⁻¹ PS	Référence
Annélides	<i>Eisenia fetida</i>	NOEC Pb(CH ₃ COO) ₂	2000 (8 sem)	INERIS
	<i>Lumbricus rubellus</i>	NOEC PbCl ₂	200 (12 sem)	INERIS
	<i>Enchytraeus albidus</i>	CL 50	4530	Lock et Janssen, 2002a
CE 50		320		
Gastéropodes	<i>Arion ater</i>	NOEC Pb(NO ₃) ₂	1000 (7 jours)	INERIS
	<i>Helix aspersa</i>	CE 50 juvéniles	> 30000	Gomot, 2000

II.2.3.4.3. Toxicité pour l'homme

Les principales voies de pénétration du plomb chez l'homme sont la voie digestive et la voie pulmonaire. Le plomb atmosphérique, présent sous forme de gaz, vapeur ou particules, peut alors migrer jusque dans les alvéoles pulmonaires et passer dans le sang. Il peut alors soit se fixer aux hématies, soit être stocké dans les tissus (os, foie, rein, poumon, cerveau). Le plomb non absorbé lors de son passage dans le tractus gastro-intestinal est éliminé par les fèces.

Les cas d'intoxication aiguë sont très rares et se rencontrent lors d'inhalation ou d'absorption accidentelles de plomb. Les symptômes les plus précoces sont les troubles digestifs, suivis d'atteintes rénales et hépatiques.

Les intoxications chroniques se traduisent par des effets sur le système nerveux central ou saturnisme : irritabilité, troubles du sommeil, anxiété, perte de mémoire, confusion... Chez les enfants, le plomb peut avoir des effets sur le développement cérébral et les fonctions cognitives.

Outres ces effets sur le système nerveux, le plomb peut être à l'origine d'effets hématologiques (anémie par inhibition de la synthèse de l'hème), d'atteintes rénales, d'hyperthyroïdie ou de troubles du système immunitaire.

Selon l'IARC, le plomb et ses dérivés sont classés dans le groupe 2B « substance potentiellement cancérogènes pour l'homme ».

II.2.3.5. Le zinc

II.2.3.5.1. Sources d'exposition et devenir

La contamination anthropique des écosystèmes est principalement due aux activités minières et industrielles, à l'épandage agricole (lisiers de porcs très riches en zinc) et aux activités urbaines (trafic routier et utilisation du zinc dans le bâtiment).

Dans le sol, le zinc s'accumule dans les horizons de surface mais est considéré comme relativement mobile dans la plupart des sols.

II.2.3.5.2. Ecotoxicité

De nombreuses données sont disponibles concernant la toxicité du zinc, c'est pourquoi seules les données concernant sa toxicité sur les invertébrés terrestres sont présentées dans le Tableau 20.

Tableau 20 : Toxicité du zinc sur différents invertébrés terrestres (sem : semaine)

Organismes	espèce	Critère d'effet	Valeur mg Zn.kg ⁻¹ PS	Référence
Annélides	<i>Eisenia fetida</i>	NOEC Zn(NO ₃) ₂	350 (3 sem)	INERIS
		NOEC Zn(NO ₃) ₂	199 (8 sem)	INERIS
		NOEC ZnCl ₂	237 (3 sem)	INERIS
	Enchytréides	CE 50	188-366	Posthuma <i>et al</i> , 1997
Insectes	<i>Folsomia candida</i>	NOEC Zn(NO ₃) ₂	300-620 (4 sem)	INERIS
		NOEC Zn(NO ₃) ₂	300 (6 sem)	INERIS
		NOEC ZnCl ₂	399 (4 sem)	INERIS
Gastéropodes	<i>Helix aspersa</i>	NOEC	4000	Gomot, 2000
		CE 50	5500	

II.2.3.5.3. Toxicité pour l'homme

Le zinc est un des oligo-éléments le plus abondant chez l'homme ; il est essentiel à la croissance, au développement osseux et cérébral, à la reproduction et au développement fœtal, au goût et à l'odorat. Les doses journalières recommandées sont de 12 mg chez la femme et 15 mg chez l'homme.

La pénétration s'effectue principalement par voie orale (nourriture) et par inhalation en milieu professionnel. Après absorption, le zinc est transporté au niveau du plasma et se répartit de façon

non sélective dans les tissus et les organes. Le zinc restant est alors excrété par les fécès et, dans une moindre mesure, par les urines.

L'inhalation de vapeurs de zinc, fortement contaminées (33000mg Zn/m^3) peut entraîner la mort. L'exposition en milieu professionnel à des fumées contenant de l'oxyde de zinc peut conduire au développement de la « fièvre des fondeurs » : le symptômes de cette maladie sont la gorge sèche, une toux, de la fièvre, des douleurs musculaires, des céphalées, associées parfois à des troubles cardiaques et gastro-intestinaux.

Peu de données sont disponibles concernant la toxicité chronique du zinc. Toutefois, une exposition prolongée peut entraîner des troubles gastro-intestinaux et avoir des effets sur le système immunitaires (diminution des réponses immunes et inflammatoires).

Le zinc et ses dérivés ne font pas l'objet d'une classification par l'IARC.

II.2.3.6. Cas des autres métaux

Le fer, le nickel et le manganèse font, actuellement, l'objet de la rédaction des fiches toxicologiques par l'INERIS. Toutefois, quelques données sont disponibles dans la littérature concernant le nickel (Lock et Janssen, 2002c).

Le nickel, comme le chrome, n'entraîne aucune mortalité chez *Eisenia fetida*, même pour les concentrations les plus élevées testées soit $1000\text{ mg Ni.kg}^{-1}\text{ PS}$ et $1800\text{ mg Cr.kg}^{-1}\text{ PS}$ (Lock et Janssen, 2002b – 2002c). Dans le cas de *Folsomia candida*, la mortalité est inférieure à 10% pour ces concentrations. Alors qu'aucune mortalité n'est observée pour *Eisenia fetida*, Neuhauser *et al.* (1985) trouvait une CL 50 à 14 jours de $757\text{ mg Ni.kg}^{-1}\text{ PS}$. En ce qui concerne les études de toxicité chronique sur la reproduction, les CSEO et CMEO obtenues pour *Enchytraeus albidus* et *Eisenia fetida* sont de 180 et $320\text{ mg Ni.kg}^{-1}\text{ de PS}$; dans le cas de *Folsomia candida*, les CSEO et CMEO sont de 320 et $560\text{ mg Ni.kg}^{-1}\text{ PS}$ (Lock et Janssen, 2002c). Des données sont aussi disponibles concernant l'isopode *Porcellio scaber* : dans le cadre de l'inhibition de leur croissance, les CE 10 et CE 50 déterminées sont, respectivement, de 0.041 et $0.33\text{ }\mu\text{mol.g}^{-1}$ selon Frias-Esperiareta *et al.* (2003) alors que Crommentuijn *et al.* (1995a) trouvaient une CE 50 de $195\text{ mg.kg}^{-1}\text{ PS}$.

La variation importante des quelques résultats de la littérature provient de la variabilité dans la biodisponibilité des métaux testés en fonction du sol artificiel sur lequel sont réalisées les expériences. Ainsi, Lock et Janssen rapporte une variation d'ordre 2 sur la CL 50 à 14 jours pour deux sols artificiels de composition différente (Lock et Janssen, 2002c).

II.2.3.7. Les HAPs

Les HAPs sont émis majoritairement lors des combustions incomplètes des combustibles fossiles mais sont aussi présents dans les fumées industrielles, les fumées de cigarettes, les émissions d'incinérateurs d'ordures ménagères, les aliments grillés au charbon de bois.... Leur mobilité dans les sols est très réduite dans la plupart des cas, toutefois le naphthalène et le benzo [k] fluorentène présente une mobilité modérée dans les sols.

Pour la majorité de ces composés, aucune donnée de toxicité aiguë et chronique n'est disponible pour les gastéropodes terrestres. Il n'existe que quelques données concernant *Eisenia fetida*, *Porcellio scaber* ou *Folsomia* sp.. Ainsi, les CMEO à 28 jours et CSEO à 63 jours, chez *Eisenia fetida*, sont respectivement de 10 et 32 mg.kg⁻¹ de PS de benzo [a] pyrène. Dans le cas du fluorène, les CL50 et CE50 obtenues pour *Folsomia fimetaria* sont respectivement de 39 et 14 mg.kg⁻¹ PS. La CE 50 à 21 jours concernant la reproduction d'*Eisenia fetida* est de 240 mg.kg⁻¹ PS de phénanthrène ; en ce qui concerne *Folsomia candida*, les CE 50 et NOEC en rapport avec la reproduction sont égales à 120 et 75 mg.kg⁻¹ PS de phénanthrène (Fiches toxicologiques de l'INERIS). La préoccupation née de la présence de HAP dans l'environnement est liée à leurs propriétés cancérogènes ; c'est le cas tout particulièrement du benzo [a] pyrène, du benzo [a] anthracène, du benzo [b] fluoranthène, de l'indéno [1,2,3-cd] pyrène et du benzo [g,h,i] pérylène, même à de faibles concentrations. En milieu professionnel, ils peuvent être responsables de cancers de la peau chez les ramoneurs et les ouvriers du goudron, et de cancers du poumon chez les ouvriers exposés au charbon ou aux vapeurs de diesel notamment.

II.3. Evaluation des risques environnementaux (ERA) et pour la santé humaine

L'évaluation des risques est une méthodologie née au début des années 80 pour répondre aux préoccupations croissantes de la société en matière de santé environnementale et à son souci de précaution. Il est nécessaire d'adopter une approche intégrée associant concepts environnementaux, chimiques, toxicologiques et écologiques afin de pouvoir comprendre les effets écotoxicologiques des polluants dans les écosystèmes contaminés (Fent, 2003).

L'évaluation des impacts d'une substance sur le milieu se déroule en trois étapes :

- évaluation des dangers par la caractérisation de l'écotoxicité d'une substance en vue d'identifier sa **concentration prédite sans effet sur l'environnement ou PNEC**
- évaluation de l'exposition des populations et de l'écosystème à une substance visant à déterminer sa **concentration prédite dans l'environnement ou PEC**

➤ caractérisation des risques correspondant à une confrontation de la concentration d'exposition à la substance et de sa concentration prédite sans effet pour l'environnement.

Si le rapport PEC/PNEC est inférieur à 1, le milieu récepteur n'est pas directement menacé par la substance ; si le rapport PEC/PNEC est supérieur à 1, il existe un risque potentiel pour le milieu récepteur.

Pour chaque compartiment de l'environnement (eau douce, eau marine, sédiment, sol, etc.), la concentration prédite sans effet (PNEC) d'une substance peut être déterminée lorsqu'il existe suffisamment d'informations sur l'écotoxicité de cette substance. En dessous de cette concentration, la substance ne devrait pas avoir d'effet indésirable sur le compartiment de l'environnement considéré. Une PNEC est extrapolée à partir de résultats d'essais d'écotoxicité réalisés en laboratoire, sur des organismes représentant tous les niveaux trophiques du milieu récepteur.

La PNEC peut être déterminée soit à partir de la concentration la plus faible d'une substance ayant un effet sur un des organismes de la chaîne trophique (CE50 pour un organisme ou une NOEC pour un autre) divisée par un **facteur d'extrapolation** qui dépend du nombre et de la nature des informations disponibles pour l'écosystème, soit par extrapolation de l'ensemble des données de toxicologie chronique disponibles (Aldenberg et Slob, 1993 ; Aldenberg et Jaworska, 2000 ; Fent, 2003). Pour la première méthode, le facteur d'extrapolation est plus élevé si l'on dispose seulement de données de toxicité aiguë que si des données de toxicité chroniques sont disponibles pour chaque niveau trophique. Si on ne dispose que d'une CL 50 pour chacun des niveaux trophiques, le facteur d'extrapolation à appliquer est de 1000 alors qu'il ne sera que de 10 si on dispose de trois NOEC à long terme pour au moins trois espèces de chaque niveau trophique.

La PEC se définit comme la concentration d'exposition en situation de « pire cas réaliste ».

Pour évaluer les risques d'une substance sur la santé humaine, l'analyse des données toxicologiques permet de déduire les valeurs de **Dose Journalière Tolérable (DJT)**, valeur à comparer à l'exposition réelle des hommes à la substance dans l'environnement, exprimée par la **Dose Journalière (DJ)** : si le rapport DJ/DJT est inférieur à 1, il n'y a aucun risque pour l'homme.

Il existe peu de tests standardisés pour l'évaluation de la contamination du sol ou la détermination du potentiel toxique de polluants sur la faune du sol : on recense un test de toxicité aiguë chez le ver de terre Eisenia fetida (ISO/DIS 11268-1, 1994) ainsi que trois tests chroniques, basés sur la détermination des effets des polluants sur la reproduction chez le ver de terre Eisenia fetida (ISO/DIS 11268-2, 1994), le collembole Folsomia candida (ISO/DIS 11267, 1999) et l'enchytréide Enchytraeus albidus (OECD 220). Toutefois, depuis 2001, un test supplémentaire est disponible et permet de déterminer les effets des polluants, vis-à-vis des escargots juvéniles, sur leur croissance (NF X 31-255-1 et NF X 31-255-2).

CHAPITRE III LES GASTEROPODES TERRESTRES : DES TESTS ECOTOXICOLOGIQUES EN LABORATOIRE A LA BIOSURVEILLANCE DE SITES

Les gastéropodes terrestres, limaces et escargots, sont des herbivores et des détritivores qui jouent un rôle majeur dans de nombreux écosystèmes (Russell-Hunter, 1983). De part leur position dans la chaîne trophique, ils sont les proies de nombreux prédateurs, tels que les oiseaux, les mammifères ou les invertébrés, et peuvent donc être à l'origine de transferts de contaminants dans la chaîne trophique (Laskowski et Hopkin, 1996). C'est pourquoi, ces gastéropodes terrestres sont de plus en plus utilisés pour évaluer l'impact de contaminations sur leur milieu soit lors de tests en laboratoire, soit directement sur les sites à étudier.

III.1. Evaluation de la toxicité de contaminants en laboratoire

En laboratoire, l'évaluation de l'impact de contaminants sur les escargots terrestres s'effectue en observant leurs effets sur diverses fonctions physiologiques et comportementales.

III.1.1. Tests écotoxicologiques

Lors des tests réalisés en laboratoire, les effets des contaminants sur la croissance, le taux de consommation, la fécondité ou la reproduction des organismes sont étudiés. Dans la majorité des expériences menées, les escargots (ou autres invertébrés du sol) reçoivent de la nourriture contaminée par des éléments métalliques (Cu, Zn, Pb, Cd ou Cr) ou des contaminants organiques (pentachlorophénol), pendant quatre semaines ou plus. La mortalité est observée au cours de l'expérience et les NOEC-LOEC-CE 20 ou CE 50 sont calculées.

Il n'existe pas de relation entre les concentrations en métaux dans la nourriture fournie aux escargots et la mortalité pour les expériences de quatre semaines (Coeurdassier, *et al.*, 2000; Gomot-de-Vaufleury, 2000; Laskowski et Hopkin, 1996). Toutefois, une mortalité de 50% est observée, au bout de 10 semaines pour les H.a. adultes consommant de la nourriture contaminée par 200 $\mu\text{g Cd.g}^{-1}$ et au bout de 7 semaines pour les H.a. adultes consommant de la nourriture contaminée par 400 $\mu\text{g Cd.g}^{-1}$ (EN 21). De même, Gomot (1997) a montré que des escargots exposés à des concentrations en cadmium, sous forme de CdCl_2 , entre 50 et 800 $\mu\text{g.g}^{-1}$ ne présentent pas de mortalité au bout de quatre semaines, alors que pour une exposition plus longue à des

concentrations inférieures (entre 200 et 400 $\mu\text{g.g}^{-1}$) une forte mortalité est observée chez les jeunes adultes.

Les effets des éléments métalliques sur la croissance, le taux de consommation et la fécondité des escargots varient en fonction du métal et de l'espèce considérés (Tableau 21).

Tableau 21 : Concentrations, en $\mu\text{g.g}^{-1}$, de cuivre, zinc, plomb, cadmium et chrome ayant des effets sur la croissance, le taux de consommation et la fécondité de différentes espèces de gastéropodes terrestres, estimés grâce au calcul des NOEC, LOEC, CE 20 et CE 50 (H.a. : *Helix aspersa*, H.e. : *Helix enggadensis*, juv : juvéniles, ad : adultes) (d'après les données de Laskowsky and Hopkin, 1996; Gomot, 1997 ; Coeurdassier et al., 2000; Gomot de Vaufleury, 2000; Swaileh and Ezzughayyar, 2000-2001).

Métal	Espèce	Croissance			Taux de consommation		Fécondité
		NOEC	LOEC	CE 50	CE 20	CE 50	CE 20
Cuivre	H.a. juv	500		1200	248	1350	
	ad				275	859	533
	H.a. juv			1180			
	H.e.	20	100	100			
Zinc	H.a. juv	4000		5500	855	4080	
	ad			5800	1240	6980	1740
	H.e.	20	100	40		210	
Plomb	H.a. juv			> 30000	5290	13900	
	ad				3120	10000	
	H.e. ad	100	500	360			
Cadmium	H.a.			140			
	H.a. juv				60	206	
	ad				147	396	120
	H.e.	50	100	100		140	
Chrome	H.a.		250	355			
		200		299			

Le cadmium, le chrome, le zinc, le cuivre et le plomb induisent une inhibition de la croissance dose - dépendante. Toutefois, cette toxicité résulte de phénomènes physiologiques différents, en fonction des propriétés intrinsèques des métaux. En ce qui concerne le cuivre et le plomb, l'inhibition de croissance est due à un jeûne provoqué par la répulsion de la nourriture contaminée et par l'estivation induite. Les effets induits par ces métaux disparaissent dès que les escargots disposent de nouveau de nourriture non contaminée : il y a réversibilité du phénomène. A l'inverse, le cadmium et le zinc provoquent des effets toxiques irréversibles : les escargots sont sensibles à ces

métaux. Une étude menée à proximité d'une fonderie de zinc, plomb et cadmium en Grande-Bretagne, a révélé l'absence d'*Helix aspersa* des zones extrêmement polluées (Jones, 1991), malgré sa capacité à tolérer de fortes concentrations en métaux dans son environnement. D'autres mécanismes, différents d'un empoisonnement direct, peuvent donc être responsables de la disparition des escargots : rejet de nourriture trop contaminée, diminution du taux de croissance et de la fécondité, augmentation de la période juvénile.

La toxicité de ces métaux suit l'ordre suivant **Cd > Cr > Cu > Zn > Pb** en ce qui concerne *Helix aspersa*. Toutefois, la sensibilité des escargots aux métaux varie selon l'espèce considérée : ainsi, *Helix enggadensis* se montre plus sensible que H.a..

En ce qui concerne les HAP, aucun test écotoxicologique sur gastéropodes terrestres n'a été mené.

En complément à ces tests écotoxicologiques, des mesures d'accumulation des EM dans les organismes peuvent être réalisées à la fin des expériences, afin d'évaluer leur capacité à accumuler les métaux. Il ressort de ces expériences que le cadmium et le zinc sont concentrés dans les organismes, même pour des concentrations testées faibles : il y a donc accumulation de ces métaux. Les escargots sont peu sensibles au cuivre et sont donc capables d'en accumuler de grandes quantités dans leur organisme (Swaileh, *et al.*, 2002).

Toutefois, une augmentation des concentrations en métaux dans la nourriture entraîne une diminution des facteurs de bioaccumulation (Laskowski et Hopkin, 1996 ; Coeurdassier *et al.*, 2000).

III.1.2. Test AFNOR

Il existe peu de tests standardisés pour l'évaluation de la contamination du sol ou la détermination du potentiel toxique de polluants sur la faune du sol. L'utilisation de l'escargot *Helix aspersa* a donc été proposée pour développer un test de toxicité standardisé afin d'observer les effets de matrices contaminées sur la croissance des escargots.

Deux modes de contamination complémentaires ont été proposés : le premier évalue les effets sur la croissance et la mortalité de jeunes escargots *Helix aspersa aspersa* soumis à une nourriture contaminée (NF X 31 255-1) alors que le second teste les effets d'un sol contaminé sur ces mêmes paramètres (NF X 31 255-2).

III.1.2.1. Paramètres environnementaux du test

Les conditions expérimentales sont les suivantes : température $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, humidité 80-95% et photopériode 18L/6O (L : lumière, O : obscurité).

Les escargots sont nourris avec un aliment conçu spécifiquement pour l'alimentation des escargots, la farine Helixal[®] 2^{ème} âge (Annexe 2'). Les escargots sont placés dans des bacs à souris et reposent sur du substrat ISO, élaboré selon la norme ISO 11268-2 (10% de tourbe de sphaignes, 20% d'argile kaolinique, 70% de sable de quartz, humidification à 50% de sa capacité de rétention en eau). Ils sont répartis en lots de cinq individus, de poids et diamètre homogènes (H.a.a. juvéniles de $1 \text{ g} \pm 0,3 \text{ g}$ et de diamètre de coquille $15,5 \text{ mm} \pm 1 \text{ mm}$) : trois lots témoins et trois lots par concentration testée. Le test dure quatre semaines ; pendant cette période, les escargots sont pesés et mesurés individuellement, hebdomadairement. La mortalité éventuelle est consignée sur les feuilles de résultats.

III.1.2.2. Détermination des effets sur la croissance

La contamination par l'aliment permet de tester les effets d'une intoxication par la **voie digestive**. La nourriture est contaminée par la substance (comme le CdCl_2 lors de l'essai circulaire) ou la matrice à tester (le sol d'un site à diagnostiquer), à différentes concentrations. Dans le cas du CdCl_2 , la contamination de l'aliment sec s'est effectuée par pulvérisation de manière à obtenir une humidité finale de 20%. ; les concentrations testées étaient 0-75-127-216-368 et 626 $\mu\text{g Cd.g}^{-1}$ d'aliment sec. Le renouvellement de la nourriture s'effectue trois fois par semaine.

La contamination du substrat ISO permet de tester les effets d'une intoxication par la **voie cutanée**. Le substrat ISO est contaminé par la substance ou la matrice à tester, à différentes concentrations. Dans le cadre de l'essai circulaire inter laboratoire, les concentrations en CdCl_2 testées étaient 0-197-296-444-667 et 1000 $\mu\text{g Cd.g}^{-1}$ de substrat sec. Le substrat est préparé extemporanément et renouvelé une fois par semaine.

Les effets sur la croissance sont évalués par le calcul des CE 50 (inhibition de la masse et de la croissance), CL 50 28 jours, CSEO et CMEO, quand les critères de validité sont respectés : mortalité totale inférieure à 10%, masse moyenne multipliée par 4, diamètre moyen multiplié par 1.5 et coefficient de variation de la croissance inférieur à 40%.

Ainsi, en suivant cette méthodologie, Gomot de Vaufleury (2000) a pu déterminer les CE 50, concernant la croissance, d'escargots *Helix aspersa* exposés à une nourriture contaminée par du cuivre, du zinc et du plomb : les CE 50 calculées sont 1180 mg Cu.kg^{-1} PS, 5500 mg Zn.kg^{-1} PS et supérieures à 30000 mg Pb.kg^{-1} PS.

III.2. Biosurveillance de sites : Réalisation de diagnostic de contamination

III.2.1. La bioindication

Les organismes vivants (plantes ou animaux) sont non seulement capables de donner des indications sur les caractéristiques « naturelles » d'un site mais donnent aussi des informations qualitatives et quantitatives sur les changements provoqués par les activités anthropiques (Markert, *et al.*, 1997). Blandin fut le premier, en 1986, à définir le concept de bioindicateur comme étant « un organisme ou un ensemble d'organismes qui, par référence à des variables biochimiques, cytologiques, physiologiques, éthologiques ou écologiques, permet de façon pratique et sûre de caractériser l'état d'un écosystème ou d'un écosystème et de mettre en évidence, aussi précocement que possible, leurs modifications naturelles ou provoquées ».

La bioindication utilise des organismes animaux ou végétaux ; leur présence (espèces polluo-résistantes) ou leur absence (espèces polluo-sensibles) renseigne sur les caractéristiques écologiques de leur habitat. Le rôle d'organisme bioindicateur dépend des caractéristiques biodémographiques, du mode de vie et de la taille des organismes

Les gastéropodes terrestres, parmi d'autres espèces, répondent parfaitement aux critères définis par Phillips pour qu'un organisme soit considéré comme un bioindicateur :

- présent dans les aires polluées et tolérance importante aux variations de l'environnement,
- facile à élever et à transférer,
- organisme sédentaire, à large répartition géographique,
- espèce abondante et facile à récolter,
- durée de vie assez longue,
- taille suffisante pour analyses *in toto* ou par organe.

Ils évoluent à la surface du sol en mangeant des végétaux et du sol et, de plus, une partie de leur cycle biologique (hivernation, ponte, développement embryonnaire) se déroule dans le sol à partir duquel ils absorbent alors les nutriments et les contaminants. Ils sont connus pour leur grande capacité d'accumulation des EM et leur tolérance importante à de fortes concentrations dans l'environnement : ils appartiennent aux bioindicateurs par bioaccumulation. Cette résistance provient de leur capacité à retenir et inactiver les métaux toxiques, soit par compartimentalisation cellulaire (granules...) et excrétion, soit par liaison des métaux à des protéines, dont les métalloprotéines, pour de longues périodes (Coughtrey et Martin, 1976 ; Hopkin, 1989 ; Berger *et al.*, 1993 ; Dallinger, 1993 ; Cortet *et al.*, 2000 ; Gomot de Vaufleury, 2000).

Les teneurs retrouvées dans ces organismes sont, le plus souvent, en relation avec le niveau de contamination du milieu : ils sont donc utilisés comme bioindicateurs de contamination par les EM.

Boháč et Pospíšil (1989) préconisaient déjà l'utilisation d'organismes macroconcentrateurs (BAF > 2) lors d'études de surveillance des sites avec l'aide d'organismes bioindicateurs.

La plupart des métaux s'accumule principalement dans la glande digestive (Rabitsch, 1996 ; Hopkin, 1989 ; Berger et Dallinger, 1993, Dallinger, 1993), suivi par le rein et le pied. Seul le cuivre est distribué dans tous les organes car il intervient dans la composition de l'hémocyanine, protéine respiratoire transportant l'oxygène dans l'organisme (Rabitsch, 1996). Les niveaux de bioaccumulation en éléments métalliques dans différentes espèces de gastéropodes terrestres dépendent d'une part, des concentrations en EM rencontrées sur les sites à étudier, mais aussi des caractéristiques biologiques propres à chaque espèce : *Helix aspersa* est un macroconcentreur de cuivre (BAF compris entre 1,5 et 10) et de cadmium (BAF compris entre 3 et 8) et un microconcentreur de zinc (BAF compris entre 1 et 2) alors que *Helix pomatia* est un macroconcentreur de cadmium et de zinc et un microconcentreur de plomb.

III.2.2. Biosurveillance passive et active

Les gastéropodes terrestres sont largement utilisés lors d'expériences de **biosurveillance passive**, pour déterminer les niveaux de contamination d'un site : les concentrations en EM sont déterminées dans des individus récoltés sur les sites d'études ou à proximité. Ainsi, des concentrations élevées en cadmium, plomb, cuivre et zinc ont été détectées dans les tissus d'escargots ou de limaces à proximité de mines (Rabitsch, 1996), d'infrastructures routières (Menta et Parisi, 2001; Swaileh, *et al.*, 2001a) ou de zones industrielles suburbaines (Beeby et Richmond, 2001; Swaileh, *et al.*, 2001c) (Tableau 22).

Tableau 22 : Concentration en EM, en mg.kg⁻¹ PS dans différentes espèces de gastéropodes terrestres exposées à différentes sources de contamination (**Limaces** A.a : *Arion ater* ; **Escargots** H.a. : *Helix aspersa*, H.p. : *Helix pomatia*, A.ar. : *Arianta arbustorum*, C.n. : *Ceruella neglecta*, H.e. : *Helix enggadensis*, L.h. : *Levantina hierosylina*, C.h. : *Cepaea hortensis*)

Référence bibliographique	Source de contamination	Sp.	Cu	Zn	Pb	Cd	Fe	Mn	Ni
Berger et Dallinger, 1993	Sites urbains	A.ar	100-400	130-301					
Coughtrey et Martin, 1976	mines	H.a.	15.7	418.4	22.1	52.2			
	mines	H.a.	181	1780	490	271			
Hopkin, 1989	site non contaminé	H.a.	104 ± 28	103 ± 14	5.79 ± 1.06	4.88 ± 0.62			
	site contaminé	H.a.	228 ± 43	418 ± 71	121 ± 24	49.6 ± 10.7			
Menta et Parisi, 2001	200 m axe routier	H.a.	34.69 ± 5.32	384.69 ± 64.11	23.04 ± 3.77	15.9 ± 5.77	620.35 ± 159.3	299.16 ± 69.3	
		H.p.	55.68 ± 15.5	187.32 ± 37.31	10.65 ± 2.95	13.4 ± 2.63	385.96 ± 92.97	210.78 ± 32.3	
Pihan, 2001	Bordure d'autoroute	H.a.	277	164	5	4.2	160	41	
Popham et D'Auria, 1980	Route principale	A.a.	61-105		507-846				
Rabitsch, 1996	250 m mine	H.p.	50	10000	330	280			
	1000 m mine	H.p.	30	3500	210	100			
Scheifler <i>et al.</i> , 2003	Sol forestier amendé	H.a.	21.28 ± 6.96	81.17 ± 19.1	0.66 ± 0.07	0.25 ± 0.07			0.75 ± 0.4
Storelli et Marcotrigiano, 2001	Zone industrielle	C.n.			0.79 ± 0.02	0.11 ± 0.03			
	Usine métallurgique	C.n.			0.94 ± 0.06	0.43 ± 0.05			
Swaileh, 2001a	Axe autoroutier	H.e.	132.4	69.1	24.3	27.8			
Swaileh, 2001c	Site suburbain	L.h.	91.7-146.1	30-57.1	11.3-26.2	13.3-28			
Williamson, 1980	Axe autoroutier	C.h.		1555.5	120.2	40.3			

Par contre, jusqu'à ce jour, très peu d'expériences de **biosurveillance active** ont été réalisées. Ces expériences consistent à transférer, pendant une durée déterminée, des escargots issus d'un élevage dans des microcosmes implantés sur les sites à diagnostiquer. Cette méthode nécessite de connaître

l'origine des individus transférés et les concentrations en éléments métalliques dans les individus avant le transfert, de disposer de lots homogènes (même âge et même poids moyen). A l'heure actuelle, seules deux études ont été réalisées : Scheifler *et al.* (2003) a étudié l'impact d'un amendement de compost sur un sol forestier et nous avons évalué la distance d'impact d'un trafic autoroutier en implantant des microcosmes à différentes distances des voies circulation (Viard *et al.*, 2004a).

III.2.3. Diagnostic de contamination

Pour étudier les contaminations de l'environnement dans le temps et leurs fluctuations, il est nécessaire de contrôler la nourriture des organismes macroconcentrateurs utilisés, appartenant à la faune du sol (Cortet *et al.*, 1999). C'est à partir de cette observation que nous avons adapté le test AFNOR pour l'évaluation *in situ* de la contamination d'un site, les animaux disposant du même type de nourriture sur les sites à diagnostiquer (farine Helixal + trèfle) (Viard *et al.*, 2004b).

Berger et Dallinger (1993) ont défini trois classes de contamination de sites en fonction des concentrations en éléments métalliques mesurées dans les viscères de gastéropodes terrestres (Tableau 23).

Tableau 23 : Classes de contamination des sites (1 : témoin, 2 : ville et trafic, 3 : mine) en fonction des concentrations en éléments métalliques dans les viscères des gastéropodes en mg/kg^{-1} PS (Berger et Dallinger, 1993)

Métal	Classe	Variation	Moyenne
Cuivre	1	40-104	70
	2	45-228	84
	3	30-408	188
Zinc	1	86-212	136
	2	144-548	310
	3	400-1868	873
Cadmium	1	1-9	5
	2	8-24	13
	3	29-139	70
Plomb	1	4-19	9
	2	14-160	41
	3	28-365	141

Pihan (2001) a établi les grilles de contamination pour les viscères d'*Helix aspersa* (Tableau 24) à partir de données concernant les niveaux de bioaccumulation en métaux atteints dans des escargots comestibles (provenant d'élevages ou de la nature), nourris avec de la nourriture contaminée par différentes concentrations en métaux.

Tableau 24 : Grille de contamination pour les viscères d'*Helix aspersa*, en mg.kg⁻¹ de PS (Pihan, 2001).

Classe	I	II	III	IV	V
Cuivre	$\text{Cu} \leq 130$	$130 < \text{Cu} \leq 200$	$200 < \text{Cu} \leq 300$	$\text{Cu} > 300$	
Manganèse	$\text{Mn} \leq 100$	$100 < \text{Mn} \leq 200$	$200 < \text{Mn} \leq 400$	$\text{Mn} > 400$	
Nickel	$\text{Ni} \leq 3$	$3 < \text{Ni} \leq 6$	$6 < \text{Ni} \leq 12$	$\text{Ni} > 12$	
Cadmium	$\text{Cd} \leq 5$	$5 < \text{Cd} \leq 10$	$10 < \text{Cd} \leq 50$	$\text{Cd} > 50$	
Fer	$\text{Fe} \leq 100$	$100 < \text{Fe} \leq 200$	$200 < \text{Fe} \leq 600$	$600 < \text{Fe} \leq 1200$	$\text{Fe} > 1200$
Zinc	$\text{Zn} \leq 150$	$150 < \text{Zn} \leq 300$	$300 < \text{Zn} \leq 600$	$600 < \text{Zn} \leq 1200$	$\text{Zn} > 1200$
Plomb	$\text{Pb} \leq 5$	$5 < \text{Pb} \leq 10$	$10 < \text{Pb} \leq 50$	$50 < \text{Pb} \leq 250$	$\text{Pb} > 250$
Chrome	$\text{Cr} \leq 0.6$	$0.6 < \text{Cr} \leq 1.8$	$1.8 < \text{Cr} \leq 5.4$	$5.4 < \text{Cr} \leq 6.2$	$\text{Cr} > 6.2$

La classe I regroupe les individus non contaminés et ensuite, les classes suivent un degré croissant de contamination jusqu'à la classe V, pour certains métaux.

MATERIELS
ET
METHODES

Chapitre I. Systématique des Gastéropodes étudiés (Kerney and Cameron, 1987)

I.1. Description d'*Helix aspersa aspersa* (Müller, 1774)

Helix aspersa aspersa (H.a.a.), plus connu sous le nom d'escargot des jardins ou Petit-gris, et utilisé au cours de nos expériences, est un mollusque gastéropode pulmoné stylomatophore appartenant à la famille des *Helicidae*. Adulte (Figure 6), sa taille varie entre 25-35 X 25-40 mm, avec une coquille globuleuse brun pâle de 4,5 à 5 tours et un ombilic complètement fermé. Principalement rencontré dans les aires océaniques, H.a.a. a colonisé divers habitats anthropisés tels que les jardins et les parcs mais aussi les dunes, les forêts ou les haies, sur des formations calcaires.



Figure 6 : *Helix aspersa aspersa* adultes et juvéniles dans leur milieu naturel

Tous les escargots transférés sur les sites d'études proviennent des élevages de l'Université de Metz ou de Besançon (Laboratoire d'Ecophysiologie), réalisés selon la méthode dite « hors - sol » décrite par Gomot en 1994.

I.2. Description des Gastéropodes autochtones récoltés sur les sites d'étude

Les escargots autochtones prélevés sur les sites d'études appartiennent tous à la famille des *Helicidae* :

- *Cepaea nemoralis* (Linné, 1758), de la sous famille des *Helicinae*, est présent en Europe de l'Ouest jusqu'à 1200m dans les Alpes et 1800m dans les Pyrénées. De taille inférieure à l'escargot des jardins (12-22 X 18-25 mm), il possède une coquille globuleuse de 5,5 tours avec la bordure du péristome sombre, sans ombilic et de couleur variable. Plusieurs individus ont été récoltés sur le site de CEDILOR en 2001.

- *Cerņuella neglecta* (Draparnaud, 1805), de la sous famille des *Helicellinae*, était principalement rencontré dans le sud de la France jusqu'à ce qu'il soit introduit dans diverses régions au nord de la France et au Benelux. De taille réduite (6-10 X 9-18 mm), il possède une coquille globuleuse sub-conique de 5 à 6 tours, avec un large ombilic et le plus souvent blanche avec des bandes brunes. Plusieurs individus de cette espèce ont été récoltés sur la parcelle du LIMOS, implantée sur le site d'Homécourt.
- *Cerņuella virgata* (da Costa, 1778), de la sous famille des *Helicellinae*, est présent dans toute l'Europe de l'Ouest. De taille semblable à *Cerņuella neglecta* (6-19 X 8-25 mm), il possède une coquille globuleuse de 5 à 7 tours, avec un ombilic resserré en partie obstrué, de couleur variable.
- *Monacha cartusiana* (Müller, 1774), de la sous famille des *Monachinae*, est présent dans l'Ouest de la France. De la même taille que *Cerņuella neglecta*, il possède une coquille globuleuse de 5,5 à 6,5 tours, avec un ombilic réduit partiellement obstrué et de couleur crème translucide par endroits.

Plusieurs individus appartenant aux espèces *Cerņuella virgata* et *Monacha cartusiana* ont été récoltés sur le site de SOTRENOR.

Chapitre II. Expériences de biosurveillance active ; Mise au point du dispositif expérimental à implanter sur les sites à diagnostiquer

Les expériences de biosurveillance active consistent à transférer, sur les sites à diagnostiquer, des organismes sentinelles tel que *Helix aspersa aspersa*, dont les caractéristiques avant transfert sont connues (poids, taille et concentrations initiales en éléments traces métalliques ETM), pendant un laps de temps défini afin de mesurer l'évolution de leur taille (poids et diamètre) et les teneurs en ETM accumulés.

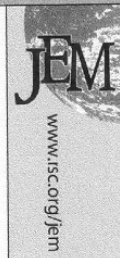
Dans cette optique, un plan expérimental a été élaboré et réalisé afin de déterminer la combinaison de nourriture présentant le meilleur compromis entre la croissance des escargots sur site et l'accumulation d'ETM dans leurs organes, palliant ainsi les problèmes d'interprétation liés à la diversité de la végétation rencontrée sur les sites. Dans le même temps, et afin de s'affranchir des aléas climatiques (pluviosité réduite,) les améliorations techniques apportées aux microcosmes ont été testées.

Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination

B. VIARD, A. MAUL et J.C. PIHAN, *Journal of Environmental Monitoring*, 2004, **6**: 103-107.

RÉSUMÉ

La réhabilitation des sites contaminés est une préoccupation croissante qui nécessite de connaître leur passé avant la réalisation d'une remédiation efficace. Les analyses physicochimiques doivent être réalisées conjointement à l'utilisation d'organismes bioindicateur qui, grâce à leur capacité de bioaccumulation, révèlent la biodisponibilité des métaux dans les sols. Parmi les invertébrés terrestres, les gastéropodes tels que *Helix aspersa aspersa* possèdent un organotropisme important pour les métaux dans leur glande digestive et ils peuvent donc être utilisés en biosurveillance active. Au cours d'expériences *in situ* de biosurveillance, deux paramètres sont testés : la croissance et l'accumulation du Fe, Mn, Zn, Cu, Cd, Ni, Pb et Cr dans les viscères des escargots. Les conditions environnementales, telles que l'humidité ou la nature de la végétation autochtone, peuvent influencer sur la croissance ou la bioaccumulation. Afin de limiter l'impact de ces facteurs, les microcosmes précédemment utilisés ont été améliorés : ils sont maintenant équipés d'une bougie poreuse qui humidifie le sol en continu. En ce qui concerne la végétation, un plan expérimental a été réalisé afin de déterminer la combinaison de nourriture présentant le meilleur compromis entre la croissance et la bioaccumulation : la combinaison trèfle-farine Helixal a été retenue. C'est pourquoi, *in situ*, l'environnement expérimental peut donc être répété sur tous les sites à diagnostiquer, utilisé pour suivre l'évolution des niveaux de contamination de sites et il permet la réalisation de comparaisons inter sites.



Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination

Bénédicte Viard,^{*a} Armand Maul^b and Jean-Claude Pihan^a

^aUniversity of Metz, UFR Sci. F.A., Laboratory BFE, Campus Bridoux, 2 rue du Général Delestraint, 57070 Metz Borny, France. E-mail: nota_bene_fr@yahoo.fr; Fax: 03-87-37-84-23

^bDepartement Statistique et Traitement Informatique des Donnees, Institut Universitaire de Technologie, Ile du Saulcy, 57045 Metz Cedex 01, France. E-mail: maul@iut.univ-metz.fr

Received 30th June 2003, Accepted 9th December 2003
First published as an Advance Article on the web 20th January 2004

The rehabilitation of contaminated sites is becoming a rising preoccupation which requires the knowledge of their past before realization of a suitable remediation. Physicochemical analysis must be realized jointly with the use of bioindicator organisms, which, owing to their bioaccumulation capacities, will reveal the bioavailability of metals in soils. Among terrestrial invertebrates, gastropods like *Helix aspersa aspersa* possess an important organotropism for metals in their digestive gland and they can be used in active biomonitoring. During *in situ* monitoring, two parameters are tested: growth and accumulation of Fe, Mn, Zn, Cu, Cd, Ni, Pb, and Cr in viscera of snails. Environmental conditions, like humidity or autochthonous vegetation, are able to modify growth or bioaccumulation. In order to remove the variation of these factors, microcosms previously used must be improved: they were equipped with porous candles, which continually humidify soil. Concerning vegetation, an experimental plan was realized to determine the combination of food with the best compromise between growth and bioaccumulation: the combination clover–snail feed was chosen. Thus, *in situ*, the experimental environment will be repeated in all investigated sites and used to allow follow up of their contamination levels and intercomparison between different sites.

Introduction

Considering environmental risk, rehabilitation of contaminated sites becomes a rising preoccupation which requires the knowledge of pollutants present in soil before remediation (Chen *et al.*¹). In order to specify a contamination, physicochemical analyses are realized jointly with the use of biological indicators which inform us about ecological characteristics of their habitat. These organisms occupy a preponderant place in biomonitoring of contaminated sites (Cortet *et al.*²). Among terrestrial invertebrates, land snails such as *Helix aspersa aspersa* (Gastropoda, Pulmonata, Helicidae) satisfy all the conditions of a good biological indicator (Laskowski and Hopkin³): they are widespread, abundant, easy to gather, present in polluted areas and possess a high tolerance to environmental variations; easy to breed and to transfer, they are sedentary organisms which are easy to identify; their life is long enough to sample and their size is sufficient for analysis *in toto* or of their organs. Moreover, they present the particularity to accumulate metallic elements within them, with an important organotropism for the digestive gland (Brooks and White,⁴ Coeurdassier *et al.*,⁵ Pihan⁶). Several laboratories have developed a standardized test dealing with the impact of pollutants on growing juvenile *Helix aspersa* by oral or dermal contamination.^{7,8} Many experiments were carried out in laboratories: dose-dependant relations between concentrations of metals in food and snail growth and accumulation of metallic elements in the viscera (Coeurdassier *et al.*,⁵ Gomot de Vauffeury,⁹ Swaileh and Ezzughayyar¹⁰) were highlighted. These laboratory studies are important to evaluate pollutant transfer in the food web, *in situ*.

The aim of the present study is to transpose these laboratory tests in field studies: indeed, the land snail *Helix aspersa aspersa*, due to its life characteristics, is in contact with pollutants of soil (*via* contact and absorption), of plants (absorption or deposits of pollutants), of meteoric water (*via*

dry deposits on the plants) and of the atmosphere *via* pulmonary breathing. In order to integrate all the potential sources of contamination, a microcosm was developed for field studies a few years ago (Pihan and de Vauffeury¹¹) but it is necessary to make improvements to this device in order to remove environmental parameters like plant diversity or drought. An experimental plan allows us to determine the combination of food with the best compromise between growth and bioaccumulation of metallic elements and this combination will be applied during further experiments of active biomonitoring.

Materials and methods

Animals

Juvenile garden snails were of subspecies *Helix aspersa aspersa*, aged one month (mean weight 1 ± 0.2 g) and came from our laboratory, bred under controlled conditions, described precisely by Gomot:¹² temperature 20 ± 2 °C, photoperiod 18 h L/6 h O, hygrometry 80 to 90% and fed with flour food Helixal[®] (composition in Table 1) in Petri boxes.

Experimental design

In order to determinate the food combination offering the best compromise between growth and metal bioaccumulation ability, the experimental plan used was a 2³ factorial plan with 3 replicates, owing to the testing of 8 combinations (Table 2). Plants tested in combinations 1 to 7 were clover (*Trifolium repens*) and/or lettuce (*Lactuca sativa* L.), known to be appreciated by snails, with or without snail feed Helixal[®], which is used in laboratory tests. Twenty-four microcosms were installed (three replicates for each combination tested) on a weeded plot of land (which belongs to the university), seeded two months before the experiment with clover and lettuce.

Table 1 Composition of the snail feed Helixal[®] (C: calcium; P: protein; PA: primary ashes; PC: primary cellulose; PF: primary fats)

Feed component/g per 100 g					Vitamins/UI kg ⁻¹		
C	P	PA	PC	PF	A	D3	E
10,3	15,7	31	1,8	7,38	20050	3900	39
Metallic elements/mg kg ⁻¹							
Fe	Mn	Zn	Cu	Cr	Pb	Ni	Cd
994	241	137	30	9.3	0.94	0.12	0.16

Table 2 Experimental plan associated with the different combinations of aliment (+1: presence, -1: absence)

Combination	Helixal [®] flour	Lettuce	Clover
1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	+1
6	-1	+1	-1
7	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1

Snail feed, clover and lettuce were provided *ad libitum*. Combination 8 offers only soil. Control snails were those growing up in the laboratory under controlled conditions, during the experiment.

Protocol

Ten snails were transferred into each microcosm for 4 weeks. A microcosm consisted of a bottomless PVC cylinder (diameter 25 cm, height 25 cm), covered with a PVC latticework, in order to allow snails to be kept in contact with soil, plants, atmosphere and rainfall, pushed into the surface. A porous candle, connected to a reservoir of drinking water, moistens the interior of the device. Temperature and percentage humidity were continually recorded by means of an HOBO recorder (HOBO RH/TEMP PRO 64 k).

Each snail was weighed on a weekly basis in order to follow its weight evolution. At the end of the experiment, five snails from each microcosm were fasted for 48 h, to empty their digestive tracts, and were then frozen at -20 °C, pending analysis for trace metals. Samples of parcel soil, clover and lettuce were simultaneously gathered in order to determine the concentrations of metals in all the compartments of the microcosm.

Metal analysis

Once defrosted, snails were washed with ultrapur water; their soft body was removed from the shell and then, foot and viscera were

separated above the edge of the mantle. Foot and viscera (including mantle, heart, kidney, digestive gland, stomach, intestines and genitals) were dried at 60 °C until reaching constant weight. Then, 300 mg of each sample were mineralized with 4.5 ml of 50% HNO₃, under pressure in a steam room at 60 °C, for 48 h. After mineralization, tubes were filled up with 14.5 ml of ultrapur water. In snail bioaccumulation studies, only the viscera results are taking into account: accumulation is higher in the viscera than in the foot and more significant.

Samples of plants were mineralized following the same protocol as the one used for snail viscera and samples of soil were submitted to *aqua regia* digestion.¹³ Heavy metal concentrations were estimated with the help of a flame and oven atomic absorption spectrophotometer (Perkin Elmer 2380 and Varian SpectrAA 300/400). Reliability of the spectrophotometer was tested with certified reference materials (TORT 2, lobster hepatopancreas from Promochem).

Concentrations of metals were expressed in mg kg⁻¹ of dry weight (DW) and, concerning snails, the classification of analytical results comes from the grid of metals contamination (Table 3), defined by Pihan.⁶ The summation of the contamination classes gives the polymetallic contamination global index (PCGI).

Expression of results and statistical analysis

Growth rates of snails, for each combination, at T₀ and then at 1, 2, 3 and 4 weeks were calculated using the following formula:

$$G = (W_{Ti}/W_{T0}) \times 100$$

where *G* is the growth rate of snails, and *W* is the mean weight of snails calculated at *T_i* (*i* = 0, 1, 2, 3, 4).

Regression analysis was performed to describe the relation between mean weight of snails (*i.e.* the explained variable) and the different combinations of food tested (*i.e.* the explanatory variables: flour, lettuce, clover), by using a linear multiple regression model.

Bioaccumulation factors (BAF: ratio between concentration of metal in the viscera of snails and concentration of metal in the food, including or not plants, flour, soil and water) were determined and used to classify the snails as macroconcentrators (BAF > 2), microconcentrators (1 < BAF < 2) and deconcentrators (BAF < 1) as proposed by Bohac and Pospisil.¹⁴ Differences in metal concentrations in the various groups were tested using the non-parametric Mann-Whitney test.¹⁵

Results

Mortality

No mortality was observed for controls or for snails submitted to combinations of food 1 and 5; a very low mortality rate was observed in microcosms with combinations 2, 3, 6 or 7 (percentage of mortality between 3% and 7%). The highest mortality rate was observed in microcosms with combination 4

Table 3 Contamination grid of the viscera for the metals, in mg kg⁻¹ DW (Pihan, 2001)⁶

	Pb	Zn	Fe	Cr
I	Pb ≤ 5	Zn ≤ 150	Fe ≤ 100	Cr ≤ 0.6
II	5 < Pb ≤ 10	150 < Zn ≤ 300	100 < Fe ≤ 200	0.6 < Cr ≤ 1.8
III	10 < Pb ≤ 50	300 < Zn ≤ 600	200 < Fe ≤ 600	1.8 < Cr ≤ 5.4
IV	50 < Pb ≤ 250	600 < Zn ≤ 1200	600 < Fe ≤ 1200	5.4 < Cr ≤ 6.2
V	Pb > 250	Zn > 1200	Fe > 1200	Cr > 6.2
	Cu	Cd	Mn	Ni
I	Cu ≤ 130	Cd ≤ 5	Mn ≤ 100	Ni ≤ 3
II	130 < Cu ≤ 200	5 < Cd ≤ 10	100 < Mn ≤ 200	3 < Ni ≤ 6
III	200 < Cu ≤ 300	10 < Cd ≤ 50	200 < Mn ≤ 400	6 < Ni ≤ 12
IV	Cu > 300	Cd > 50	Mn > 400	Ni > 12

(27%), where a problem of predation occurred in one of the microcosms, while in microcosms with combination 8, 80% of snails died during the experiment: these snails had no food, but soil, in their environment.

Effect of combination of food on snail growth rate

At the end of the experiment, mean weight of snails (Fig. 1) submitted to combinations with flour (combinations 1-2-3-4) was significantly higher ($p < 0.05$) than mean weight of snails fed only with plants (combinations 5, 6 and 7) or those put on uncovered soil (combination 8). During the four weeks, the weight of the snails submitted to combination 7 did not change (no significant difference between T_0 and T_4) while snails submitted to the combination 8 lost weight (significant difference between T_0 and T_4 , $p < 0.05$). In opposition, snails submitted to other combinations put on weight during the first three weeks, before they stabilized (combinations 1 and 2) or they lost weight (combinations 3, 4, 5 and 6). Snails fed with flour plus lettuce and clover or flour with lettuce or clover (combinations 1, 2 and 3) multiplied their weight, respectively, by 6.91, 6.92 and 6.41. Combinations 4, 5 and 6 allowed snails to multiply their weight by 5.25, 2.1 and 1.26, respectively.

Influence of temperature and relative humidity on snail growth

During the experiment, the average temperature was 20.4 °C and the relative humidity varied in a range of 84%–100%. These values correspond to the optimum conditions of growth, which are commonly used in the laboratory for breeding and growing tests.^{7,8}

At the end of the experiment, temperatures and relative humidity fell: in the same time, snails ceased to put on weight.

Regression analysis

The complete model, including all explanatory variables (*i.e.* F : flour, L : lettuce, C : clover), explains about 88% ($r^2 = 0.878$) of total variation of the mean weight of the snails; the remaining 12% (*i.e.* the residual variance) depends on unknown and/or uncontrolled factors. The regression equation corresponding to the full model is the following:

$$W_{T_4} = 2.78 + 1.9F + 0.22FL - 0.27FLC - 0.004FC + 0.52L - 0.16LC + 0.19C$$

where W_{T_4} is the mean weight of the snails by the end of the experiment, which is at T_4 .

Then, we tried to find out a reduced model by eliminating all

the factors that did not have a significant effect ($p > 0.05$). The following expressions were obtained:

$$(1): W_{T_4} = 2.79286 + 1.9472F + 0.512889L$$

$$(2): W_{T_4} = 2.85812 + 1.91039F + 0.121615C$$

Models (1) and (2) explain 83.9% and 78.6% of the variance of the snails' weight, respectively.

Metal concentrations in samples

Table 4 indicates mean and standard error in concentrations of metals in samples of soil, plants (lettuce and clover), flour and in the viscera of snails. Regarding concentrations of heavy metals in soil, while all the combinations tested showed homogenous concentrations in metals in the plot of land, combination 7 presented significantly lower ($p < 0.05$) concentrations in Mn, Fe, Ni and Cr and combinations 3 and 5 significantly lower ($p < 0.05$) concentrations in Cr. According to standards defined by Godin¹⁶ or reference values used in France¹⁷ and in the Netherlands,¹⁸ this soil can be considered as not contaminated.

Levels of metals measured in clover or in lettuce are normal levels for aerial parts of plants (Schwartz¹⁹).

With regard to accumulation of metals in snails and according to the grids defined by Pihan for the viscera, classes of contamination can be attributed for each metal, for all the combinations tested (Table 5). In comparison to controls, snails fed with combinations of food combinations 1 and 2 showed a slight accumulation of metals in their viscera: concentrations of Cd, Mn, Cu and Cr were significantly higher in snails fed with combination 1 and concentrations of Mn, Ni, Cu, Pb and Cr were significantly higher in snails fed with combination 2 ($p < 0.05$). Concentrations of Zn accumulated were, in contrast, lower than the controls. These data confirmed the fact that the parcel of soil is not highly contaminated with heavy metals.

Snails submitted to combinations 3, 4 or 5 present higher accumulation of metals in their viscera than previous snails (combinations 1 and 2) or the controls: in the three combinations, concentrations of Mn, Fe, Cu, Ni, Cr and Pb were significantly higher ($p < 0.05$) in their viscera than in control snails. Moreover, the concentration of Cd was also significantly higher ($p < 0.05$) for snails fed with combination 3 and the concentration of Zn was also significantly higher for snails fed with combination 5.

Snails submitted to combinations 7 or 8 presented the most

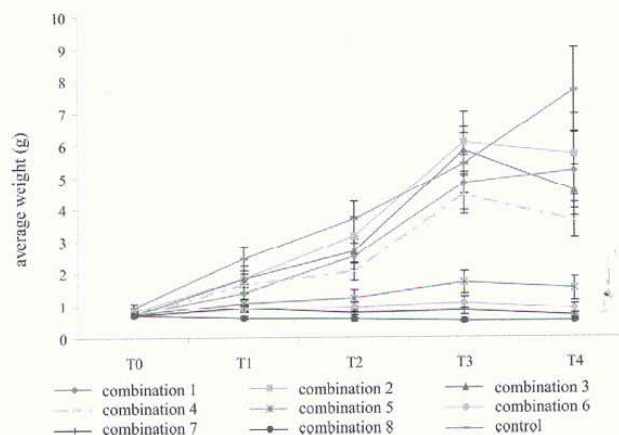


Fig. 1 Evolution of the snail's weight during the experiment, with the standard deviation.

Table 4 Average concentrations of heavy metals (with standard deviation SD), in mg kg⁻¹ of DW, in the different compartments of the microcosm, for each combination tested

	Combination	[Zn]	[Mn]	[Fe]	[Cu]	[Ni]	[Pb]	[Cr]	[Cd]
Soil	1	219.58	2480.71	49455.98	25.72	144.41	33.63	108.80	1.15
	2	235.48	2706.05	61464.78	23.95	163.64	31.93	99.78	1.20
	3	229.39	2307.69	49040.93	23.73	124.58	33.62	79.10	0.95
	4	231.63	2869.41	63498.40	21.96	163.74	31.95	115.81	0.98
	5	207.88	2950.23	47971.22	23.99	117.74	31.98	75.95	1.14
	6	223.60	2485.53	56298.66	23.96	141.74	33.94	109.80	1.04
	7	213.82	1704.61	45535.54	23.76	81.17	33.66	73.25	0.99
	8	229.13	2689.78	55788.01	25.90	149.43	33.87	109.58	1.16
	average	223.81	2524.25	53631.69	24.12	135.81	33.07	96.51	1.08
SD	9.47	393.36	6617.85	1.24	27.48	0.93	17.52	0.10	
Plants	Clover	33.76	132.26	1515.28	7.27	3.33	0.79	2.57	0.78
	SD	0.39	11.55	592.74	2.87	0.62	0.19	0.52	0.14
	Lettuce	35.16	64.35	2183.79	6.54	2.69	2.30	3.42	0.52
Helixal [®] flour	SD	5.36	43.35	869.24	1.00	0.36	0.58	1.10	0.07
		137.00	241.00	994.00	30.00	0.12	0.94	9.30	0.16
Snail viscera	1	139.25 ^a	180.03 ^c	356.35 ^b	97.85 ^c	2.57 ^c	0.42 ^b	1.60 ^c	54.22 ^c
	SD	45.35	47.34	238.39	36.08	2.08	0.39	1.37	36.88
	2	130.42 ^a	319.06 ^c	341.16 ^b	103.61 ^c	4.84 ^c	0.75 ^c	1.41 ^c	1.15 ^b
	SD	33.84	113.73	268.35	33.69	6.44	0.87	0.99	0.64
	3	183.19 ^a	480.36 ^c	450.54 ^c	134.75 ^c	5.28 ^c	1.06 ^c	1.70 ^c	6.08 ^c
	SD	46.61	105.23	231.23	33.69	2.33	0.81	1.37	4.83
	4	267.74 ^b	464.18 ^c	651.49 ^c	156.43 ^c	4.42 ^c	1.33 ^c	3.13 ^c	1.17 ^b
	SD	27.23	40.64	303.49	17.63	3.21	0.68	2.07	0.55
	5	353.01 ^c	848.36 ^c	1320.27 ^c	166.12 ^c	10.14 ^c	3.92 ^c	3.38 ^c	3.68 ^c
	SD	49.48	206.16	1070.09	36.44	7.41	2.69	2.89	2.20
	6	442.12 ^c	885.47 ^c	860.31 ^c	184.28 ^c	0.00 ^a	6.42 ^c	2.53 ^c	5.94 ^c
	SD	160.13	245.79	561.14	57.13	0.00	1.49	2.36	1.76
	7	518.54 ^c	1636.51 ^c	1208.43 ^c	246.36 ^c	0.28 ^a	0.29 ^b	2.57 ^c	6.31 ^c
	SD	102.47	625.27	951.31	42.29	1.09	1.12	2.82	4.13
	8	608.19 ^c	2124.98 ^c	810.72 ^c	232.34 ^c	0.00 ^a	6.02 ^c	2.19 ^c	3.56 ^c
	SD	130.88	702.06	303.92	53.97	0.00	1.05	0.77	0.68
Control snails		239.25	64.00	194.50	40.23	0.94	0.00	0.85	0.89
SD		29.36	26.67	95.14	19.70	0.72	0.00	0.16	0.47

^a Concentrations in the snail viscera significantly lower than in the controls (Mann-Whitney test, $p < 0.05$). ^b Concentrations in the snail viscera not significantly different from the controls (Mann-Whitney test, $p < 0.05$). ^c Concentrations in the snail viscera significantly higher than in the controls (Mann-Whitney test, $p < 0.05$).

important accumulation of Zn, Mn, Fe and Cu, a significant accumulation of Cr and a lower accumulation of Ni and Cd: they present pathological conditions.

Discussion

During this experiment, relative humidity and temperature were not limiting factors, regarding the growth of snails. Indeed, several authors like Gomot¹² or Jess and Marks²⁰ showed that temperatures higher than 15 °C stimulate snail growth, with an optimum at 23 °C. So, food seems to play a major role in the growth of transferred snails.

Taking into account mortality, growing and bioaccumulation results, it is possible to define the food combination giving the best compromise. The weight decrease observed for the snails submitted to combinations 7 and 8, associated with elevated mortality (80% for snails of the combination 8) and

accumulation of metals, reveals a pathological state and does not allow us to retain these combinations for the test *in situ*.

From the determined polymetallic contamination global index (PCGI, table 5), different combinations can be set according to the increasing concentrations of metals accumulated in the viscera:

Controls < C2 < C1 < C3, C6 < C4 < C7, C8 < C5

The snails fed with combination 5 presented a low growing coefficient ($G = 2.1$), so this combination is not retained for further field experiments. Snails fed with combinations 1 and 2 presented an important growing rate ($G = 6.9$) but they accumulated low quantities of metals in their viscera, relative to snails fed with the remaining combinations (3, 4 and 6).

Snails fed with combinations 4 and 6 presented a growth rate lower than snails fed with combination 3, so this combination is retained for further experiments. Combination 3 provides an important growth rate ($G = 6.4$), a low mortality during the experiment and a significant accumulation of heavy metals in the snail viscera. Moreover, this combination (soil + Helixal[®] flour + clover) integrates all the contamination sources of the snails: the bioaccumulation observed integrates the entire environment of the snails.

From the correlation established by Pihan between the concentrations of some metals (Cu, Zn, Mn, Pb) in the viscera of snails, coming from breeding or gathered on sites (autochthonous snails), and the average concentrations of those metals in the food, we are able to determine the concentrations of these metals in the food consumed by the snails subjected to combination 3 during the experiment (taking into account soil flour and clover, with various percentages). Thus, taking into account the bioaccumulation factors (Cu: 5.07, Pb: 2.79, Zn: 1.64 and Mn: 0.98), *Helix*

Table 5 Classes of contamination for each metal, according to Pihan (2001), and determination of the polymetallic contamination global index (PCGI = Σ)

	Zn	Mn	Fe	Cu	Ni	Pb	Cr	Cd	Σ
Controls	II	I	II	I	I	I	II	I	11
C1	I	II	III	I	I	I	II	IV	15
C2	I	III	III	I	II	I	II	I	14
C3	II	IV	III	II	II	I	II	II	18
C4	II	IV	IV	II	II	I	III	I	19
C5	III	IV	IV	II	III	I	III	I	21
C6	III	IV	IV	II	I	I	II	I	18
C7	III	IV	IV	III	I	I	III	I	20
C8	IV	IV	IV	III	I	I	II	I	20

aspersa is a macroconcentrator of Cu and Pb, a microconcentrator of Zn and a deconcentrator of Mn and all the remaining metals; these results are in accordance with the bibliographic data.¹²

For Zn and Mn, it is also possible to determine the contribution of each compartment (soil, clover and flour) in the bioaccumulation of these metals in the viscera of snails: 50% of Zn and 55% of Mn bioaccumulated are coming from the Helixal[®] flour; the soil contributes to the accumulation of 30% for Zn and 15% for Mn; the percentages remaining (20% for Zn and 30% for Mn) correspond to the contribution of the clover in the accumulation of these metals.

During this *in situ* study, the number of interfering factors was important and we only studied the effects of the food on growth and bioaccumulation. Clover or lettuce cultivation might modify the chemistry of the soil and alter the bioavailability of metals: this aspect must be studied in further experiments taking into account these results in order to assess *in situ* the impact of metal speciation.

Nowadays, no biological test exists to assess, *in situ*, the contamination level of a site, and compared with other laboratory bioassays used to assess soil toxicity, "the snail test" has the advantage of using terrestrial organisms to assess soil contamination. Indeed, most toxicity tests are based on leaching soil solution and use non-appropriate organisms. For bioassays, it would be preferable to use aquatic organisms to assess water quality and terrestrial organisms to assess soil and atmospheric quality, at different levels of the food web.

Conclusion

Food plays a dominating role in the growth of the transferred snails (desire and energetic value) and that is the reason why it is necessary to find the ideal combination for use *in situ*. A flour supply, in combination with the vegetation, seems to be necessary but we must check that the snails go on feeding with the vegetation, like clover. Indeed, the digestive route is the most important for contamination. After analysis of the growth and bioaccumulation data, combination 3 (soil-Helixal[®] flour-clover) seems to be the most adapted combination for active monitoring. Clover allows us to take into account an additional link in the food web, where the garden snail lives, and thus this point will be remembered during further active biomonitoring studies. But in this study, only the presence of metallic elements was assessed: PAHs or other

pollutants could be present in this soil too and could have an impact on the endpoints studied.

Acknowledgements

This work has received the financial support of GISFI (Scientific Interest Grouping on the Industrial Wasteland) and CREED (Research Center for the Environment, the Energy and the Waste).

References

- 1 H. M. Chen, C. R. Zheng, C. Tu and Z. G. Shen, *Chemosphere*, 2000, **41**, 229.
- 2 J. Cortet, A. Gomot de Vaufléury, N. Poinot Balaguer, L. Gomot, C. Texier and D. Cluzeau, *Eur. J. Soil Biol.*, 1999, **3**, 115.
- 3 R. Laskowski and S. P. Hopkin, *Environ. Pollut.*, 1996, **91**, 289.
- 4 A. W. Brooks and K. N. White, *Tissue Cell*, 1996, **27**, 61.
- 5 M. Coeurdassier, A. Gomot de Vaufléury and P. M. Badot, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2000, **19**, 2571.
- 6 F. Pihan, PhD Thesis, University of Metz, France, 2001.
- 7 AFNOR, *Qualité des sols – Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (Helix aspersa) Partie 1 : Détermination des effets sur la croissance par la contamination alimentaire*, NF X31-255-1, Paris, 2001.
- 8 AFNOR, *Qualité des sols – Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (Helix aspersa) Partie 2 : Détermination des effets sur la croissance par la contamination par le sol*, NF X31-255-2, Paris, 2001.
- 9 A. Gomot de Vaufléury, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2000, **46**, 41.
- 10 K. M. Swaileh and A. Ezzughayyar, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2001, **50**, 9.
- 11 F. Pihan and A. de Vaufléury, *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2000, **46**, 137.
- 12 A. Gomot, PhD Thesis, University of Franche-Comté, France, 1994.
- 13 AFNOR, *Qualité des sols – Sols, sédiments – Mise en solution totale par attaque acide*, NF X31-147, Paris, 1996.
- 14 J. Bohac and J. Pospisil, in *Heavy metals in the environments*, ed J. P. Vernet, CEP Consultants Ltd., Edinburgh, 1989, Vol 1.
- 15 *The case of two independent samples in nonparametric statistics*, ed. International Student, McGraw-Hill, Auckland, 1956.
- 16 P. Godin, *Soil Sci.*, 1983, **2**, 73.
- 17 AFNOR, *Matières fertilisantes – Boues des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines – Dénominations et spécifications*, NF U44-041, Paris, 1985.
- 18 *Intervention values and target values – soil quality standards*, VROM Ministry, La Haye, Circular 9 May, 1994.
- 19 C. Schwartz, PhD Thesis, ENSAIA, France, 1993.
- 20 S. Jess and R. J. Marks, *J. Agric. Sci. Cambridge*, 1998, **130**, 367.

EN RESUME

- Les escargots (n=10 par microcosme) sont désormais transférés dans des cylindres en PVC sans fond, fermés sur le dessus par un grillage en plastique (Figure 7a.) et implantés sur des parcelles préalablement semées de trèfle, pendant quatre semaines.
- Une bougie poreuse, reliée par un capillaire à une réserve d'eau (Figure 7b.), maintient une humidification continue du sol du microcosme.
- Températures et hygrométrie sont enregistrées en continu pendant toute la durée de l'expérience (Figure 7c.)
- Les escargots disposent, comme nourriture, de trèfle et de farine Helixal® (Figure 7d.)



a)



b)



c)



d)

Figure 7 : Microcosme implanté sur les sites :

- cylindre sans fond et grillage en PVC, à côté du réservoir d'eau
- bougie poreuse avec son capillaire relié au réservoir d'eau
- enregistreur HOBO de température et d'hygrométrie
- trèfle et farine Helixal comme nourriture

Chapitre III. Les différents sites d'étude retenus

Pour notre étude, plusieurs sites présentant des caractéristiques différentes ont été retenus en Lorraine tout d'abord (Metz, Malancourt la Montagne et Hargarten aux Mines en Moselle, Homécourt en Meurthe et Moselle) puis dans le Nord Pas de Calais à Courrières.

III.1. Site 1 : périphérie du centre de Metz

Lors de la réhabilitation d'anciennes casernes en laboratoires universitaires, des espaces verts ont été créés dans l'enceinte des bâtiments (Figure 8). Considérant ce lieu « exempt » de toute contamination industrielle, nous y avons réalisé les expériences nécessaires à l'établissement du protocole expérimental de transfert des microcosmes *in situ* (plan expérimental présenté dans Matériels et Méthodes, Chapitre II). Les résultats obtenus sur ce site seront considérés par la suite comme les témoins terrain des expériences de biosurveillance active.



Figure 8 : Implantation des microcosmes sur les espaces verts, dans l'enceinte de l'Université

III.2. Site 2 : Ancienne cokerie à Homécourt (54)

Dans le cadre de la participation au Groupement d'Intérêt Scientifique sur les Friches Industrielles (GISFI), nos expériences ont pu être menées sur le Site-Observatoire du GISFI : l'ancienne cokerie d'Homécourt, exploitée de 1922 à 1980 (Figure 9). Sur les trente hectares du site (BASOL), neuf montrent une pollution par des métaux, des cyanures et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs). Le projet du GISFI est d'implanter une station expérimentale *in situ*, composée de dispositifs lysimétriques, afin de valider les travaux de laboratoire sur les sols pollués et de modéliser les flux de polluants dans les sols contaminés, dans l'optique d'un traitement adapté de dépollution. Le plan de l'ancienne cokerie et les teneurs en métaux et HAP, mesurées pour chacun des points de prélèvements réalisés par le LECES, en vue de choisir le futur emplacement de la station lysimétrique, sont présentés en Annexes 3 et 4.

Plusieurs laboratoires lorrains sont partenaires de ce projet. A ce titre, nous avons pu réaliser une expérience de biosurveillance sur ce site, en partenariat avec le LIMOS (Laboratoire d'Interactions Microorganismes-Minéraux-Matière Organique dans les Sols, C.N.R.S. FRE 2440, Vandoeuvre les Nancy 54).

Trois microcosmes ont été installés sur la parcelle du LIMOS du 23 juillet 2002 au 20 août 2002, sur des plants de luzerne, et non de trèfle, par souci d'homogénéité dans les expériences menées au sein du GISFI. La luzerne est, comme le trèfle, une plante fourragère qui appartient à la famille des Légumineuses et présentant une floraison au printemps et en été.



Figure 9 : Vue aérienne du site de l'ancienne cokerie d'Homécourt (54), avec encadrée en rouge, la future zone d'implantation des dispositifs lysimétriques, et la localisation des microcosmes installés sur la parcelle du LIMOS

III.3. Site 3 : SOTRENOR à Courrières (62)

III.3.1. Présentation de l'activité industrielle

Cette société, implantée dans le Nord à Courrières, assure le traitement des déchets industriels spéciaux (DIS) et des sites pollués. Grâce à l'incinérateur à hautes températures (destiné aux résidus solides, liquides ou pâteux, chlorés ou non, dans une certaine limite) et l'évapo-incinérateur® (destiné aux mélanges eaux-hydrocarbures), ce centre traite un large éventail de déchets, tels que les huiles solubles, les boues de décantation, les résidus de filtration, les boues de peinture, les sols pollués, les déchets ménagers spéciaux ou les résidus chimiques. SOTRENOR est une installation classée et l'ensemble de ses rejets (rejets atmosphériques et résidus de traitements) fait l'objet de contrôles permanents de la part de la DRIRE. Cette usine fait partie du groupe SARP Industries Onyx qui dispose de quinze sites de retraitement des déchets en France (dont CEDILOR, voir § III.5) et d'une dizaine à l'étranger.

III.3.2 Localisation des microcosmes

Le site de SOTRENOR n'a jamais auparavant accueilli d'expériences de biosurveillance active. Donc, comme pour CEDILOR lors de précédentes études, des microcosmes ont été implantés aux quatre points cardinaux du 25 avril 2003 au 22 mai 2005 (Figure 10c) sur des parcelles de terre désherbées manuellement et semées de trèfle blanc préalablement.

Sur chaque station choisie (numérotée de 1 à 4), trois microcosmes ont été installés contenant chacun dix H.a.a.. Au niveau de la station 2, des escargots autochtones de type *Helix aspersa aspersa* ont été récoltés sur des chardons ; à proximité des stations 3 et 4, des escargots appartenant à deux familles différentes ont été prélevés, *Cerneuella virgata* C.v. (Figure 10a) et *Monacha cartusiana* M.c. (Figure 10b).



Figure 10a : Coquille de *Cerneuella virgata*



Figure 10b : Coquille de *Monacha cartusiana*

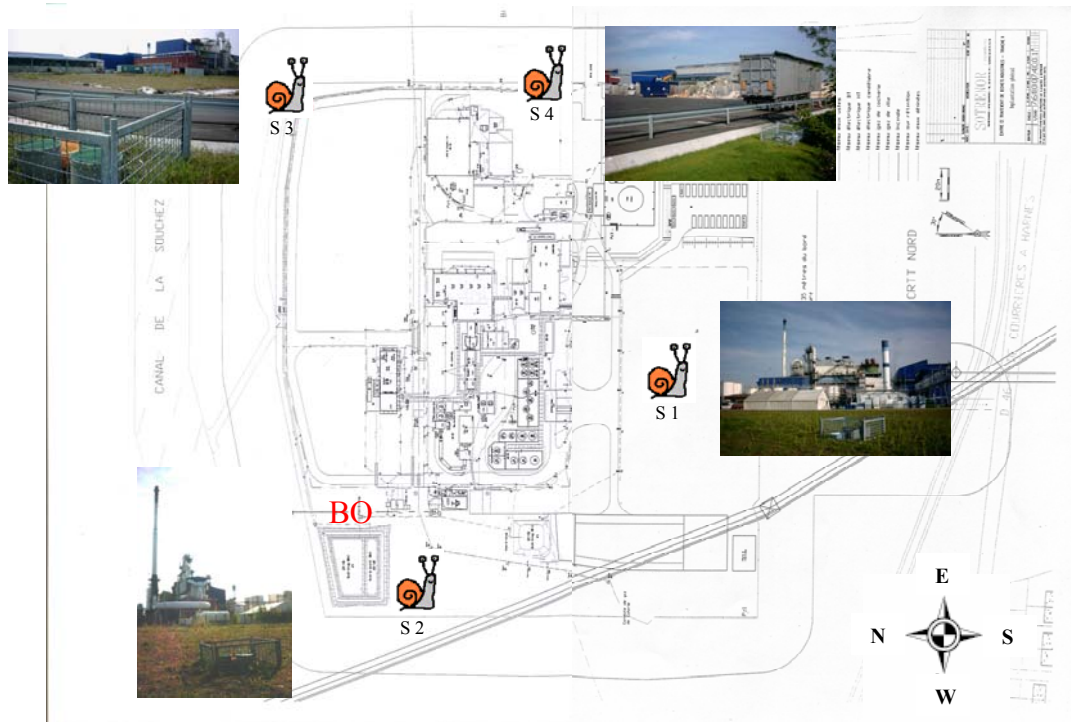


Figure 10c : Schéma de l'implantation de l'usine SOTRENOR avec la localisation des microcosmes en 2003 au niveau des quatre stations retenues (photo des stations S1-S2-S3-S4, BO : bassin d'orages)

Les microcosmes de la station 1 sont installés sur une vaste étendue en friche, située devant les bâtiments administratifs. Dans le cas de la station 2, les microcosmes sont installés à proximité du bassin d'orages du site, sur un sol industriel non remanié, ne permettant que l'installation d'espèces pionnières. Les microcosmes des stations 3 et 4 sont situés en bordure d'une voie de circulation, respectivement sur un remblai de terres industrielles du site et sur une bande de terre arable engazonnée.

III.4. Site 4 : Hargarten aux Mines (57)

La partie du département qui s'étend entre St Avold et Merten renferme des gisements de plomb et de cuivre qui ont été exploités, à des périodes différentes, sur une assez grande échelle. A Hargarten, des accidents géologiques ont une influence directe sur la formation plombifère. Les minerais sont, pour le plomb, la galène (ou sulfure naturel de plomb PbS) et le carbonate. Leur gisement est disséminé sous forme de mouches, de nodules, de veinules dans le grès, associés à la dolomite. Deux mines furent exploitées sur le ban de Hargarten dont le percement des premières galeries date probablement de la fin du Moyen Age. Jusqu'en 1788, les mines furent exploitées par

différents particuliers avant leur fermeture définitive, le minerai comportant de trop faibles teneurs en métal pur (environ 7%).

Suite à l'apparition des nombreux cas de saturnisme au sein d'un troupeau de bovins paissant dans des pâturages en lisière de forêt d'Hargarten aux Mines et nourris par ensilage réalisé à même le sol fortement contaminé, les autorités sanitaires ont été alertées et les analyses réalisées par le BRGM ont révélé d'importantes teneurs en plomb et arsenic dans la nourriture des bovins et dans le sol (Service Géologique Régional de Lorraine, Vandoeuvre Lès Nancy ; Annexe 5).

Des microcosmes (Figure 11) ont été implantés à l'automne 2003, du 9 octobre au 10 novembre, afin d'étudier cette contamination naturelle en métaux, sur des plans de trèfle autochtones présents.

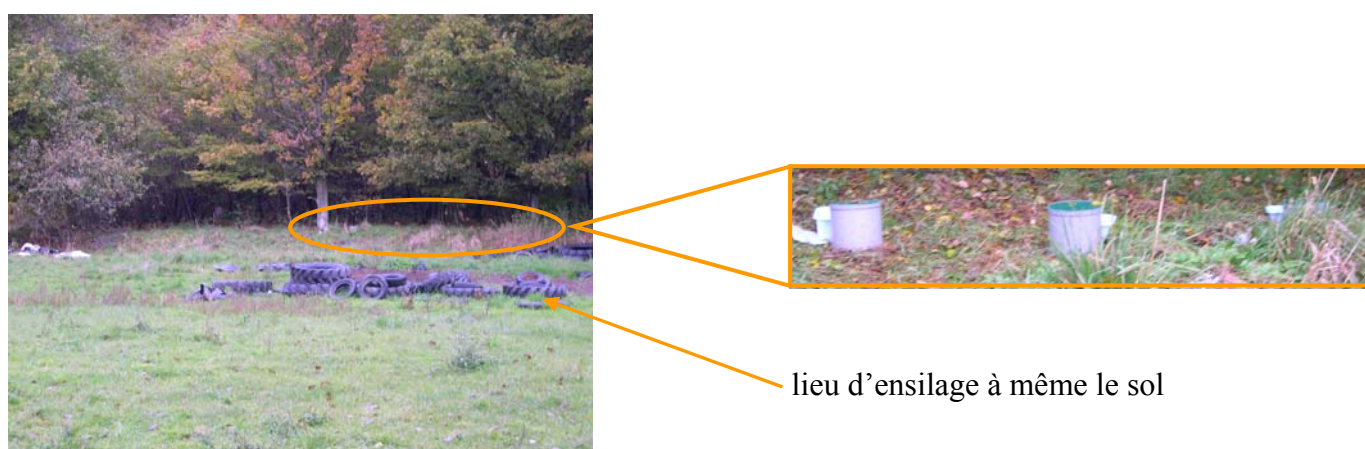


Figure 11 : Zone d'implantation des microcosmes à Hargarten aux Mines, en lisière de forêt

III.5. Site 5 : CEDILOR à Malancourt la Montagne (54)

III.5.1. Présentation de l'activité industrielle

Cette société a quitté Jouy-aux-Arches pour s'installer à Malancourt-la-Montagne en 1997. CEDILOR (soit le Centre de **D**épollution Industrielle **LOR**rain) est une plate-forme de retraitement des déchets industriels dangereux (DID) et des déchets ménagers spéciaux (DMS), parmi lesquels se trouvent les DTQD (ou déchets toxiques en quantités dispersées) : 70 % des déchets traités viennent de Lorraine, 30% des régions limitrophes. Ses installations (Figure 12) font partie des plus performantes de France, particulièrement pour la protection des sous-sols grâce à un système de membranes et de drains qui rendent les six hectares du site parfaitement étanches. L'efficacité des traitements et la qualité des rejets font l'objet de contrôles permanents par des laboratoires extérieurs mandatés par la DRIRE. Les différents procédés mis en œuvre sont :

- la valorisation des hydrocarbures par séparation thermiques et mécaniques des phases (centrifugation),

- évapo-incinération avec récupération d'énergie et valorisation thermique du concentrat,
- épuration d'eau avec charge organique associant technique physico-chimique et biologique,
- et traitement physico-chimique des produits minéraux (acides ou bases).

III.5.2 Localisation des microcosmes

Lors de précédentes expériences, menées au cours d'une précédente thèse, des microcosmes ont été implantés aux quatre points cardinaux du site. Après analyse des résultats obtenus, il s'est avéré que les escargots placés au sud du site présentaient la plus forte accumulation d'éléments traces métalliques dans leurs viscères.

En juin 2001, une parcelle de 1 m² a été semée de trèfle blanc, après désherbage manuel de la surface. Lors de notre étude, les escargots ont donc été transférés dans trois microcosmes M1-M2-M3, à trois périodes différentes :

- Automne 2001, du 23/10/2001 au 20/11/2001
- Eté automne 2002, du 11/09/2002 au 09/10/2002
- Printemps 2003, du 10/06/2003 au 08/07/2003.



Figure 12 : Schéma de l'implantation de l'usine CEDILOR et localisation des microcosmes en 2001, 2002 et 2003 à proximité de l'unité de tri des DTQD (1) et de l'évapo-incinérateur (2)

Au cours de ces expériences, trois microcosmes ont été installés à proximité de l'unité de tri et de traitement par broyage des DTQD (Figure 13a) et sous les vents dominants, pouvant transportés des particules depuis la cheminée de l'évapo-incinérateur®. De plus, des escargots autochtones *Cepaea nemoralis* C.n. ont été récoltés à proximité du lieu d'implantation des microcosmes, en lisière de forêt (Figure 13b).



Figure 13a : Vue générale du site de CEDILOR avec la cheminée de l'évapo-incinérateur au milieu

La ligne de l'évapo-incinérateur est équipée d'un traitement des poussières et de l'acidité, avec enregistrement en continu des paramètres.



clôture du site

microcosmes

Figure 13b : Vue de l'emplacement des microcosmes et lieu de récolte des escargots autochtones C.n. (photographie à gauche)

La croissance et la bioaccumulation des escargots transférés sur les sites seront comparés à des témoins labo, placés en conditions contrôlées de laboratoire pendant le même temps, et/ou à des témoins terrain, placés sur une parcelle non contaminée, semée de trèfle, dans les mêmes conditions expérimentales.

Chapitre IV. Étude de la supplémentation en éléments métalliques de la nourriture fournie aux escargots dans les élevages français

IV.1. Origine des prélèvements

Les prélèvements ont été réalisés dans trois unités hélicicoles élevant essentiellement du Gros Gris (*Helix aspersa maxima*) et définis comme suit :

élevage 1 (E1) situé dans le Maine et Loire,

élevage 2 (E2) situé en Savoie,

élevage 3 (E3) situé dans le Doubs.

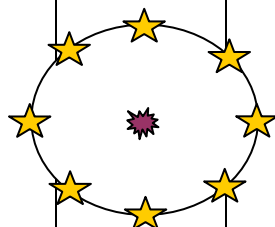
IV.2. Nature et rythme des prélèvements



Dans chaque élevage, deux séries de prélèvements ont été effectuées : une série destinée aux analyses bactériologiques a concerné uniquement les escargots. La deuxième série destinée aux analyses des métaux (Cu, Zn, Pb et Cd) a concerné les œufs, les escargots, leur nourriture (farine + végétaux + eau), le sol des parcs, l'eau d'arrosage. Les prélèvements ont été effectués par les éleveurs selon un protocole établi (Tableau 25) sauf pour l'élevage E3 pour le quel, en ce qui concerne les escargots, seuls ceux âgés de 5 et 9 mois ont été disponibles. Les échantillons ont ensuite été acheminés par colis postal de type « colissimo », d'une part au laboratoire de microbiologie de l' Ecole Vétérinaire de Lyon pour l'étude bactériologique et, d'autre part au laboratoire EBSE- UFR Sci F. A. de l'université de Metz pour l'étude des métaux.

Une enquête préalable par questionnaire (résultats non encore publiés, travaux spécifiques à Marie-Bernadette KIEBRE-TOE, Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon) a permis de recueillir les informations concernant la conduite des élevages et leur situation sanitaire.

Tableau 25 : Protocole de prélèvement des échantillons dans les élevages hélicoles (PF : poids frais).

Prélèvements	Nature	Date	Nombre		Transport
			Bactériologie	Métaux lourds	
OE	Oeufs	Dès la ponte		1 ponte (± 100 oeufs)	Envoi dans une boîte humide type boîte de Pétri sans terre.
P1	Naissains	8 jours	100	25	Animaux vivants envoyés à sec, dans un pot type « pot de ponte » pour la bactériologie ou type « boîte à camembert » pour les métaux lourds.
P2	Escargots	3 mois	5	10	
P3	Escargots	5 mois	5	10	
P4	Escargots	9 mois	5	10	
AL0 AL1	Aliment	Démarrage Engraissement ou finition		100 g PF 100 g PF	Envoi dans sachets plastiques hermétiquement fermés.
VG	Végétation des parcs	3 mois		250 g PF	Envoi dans sachets plastiques hermétiquement fermés.
S0	Sol	T0 Av. semis		9 éch. de 10 g	Envoi dans sachets plastiques hermétiquement fermés (PF).
S1	(Cf. schéma)	1 mois		9 éch. de 10 g	
S2		3 mois		9 éch. de 10 g	
S3		5 mois		9 éch. de 10 g	
EU		Eau de conduite ou de puits	3 mois		100 ml



 Prélèvement au niveau mangeoire (m)
 + 8 sur un cercle à 1m de m

Dès leur arrivée au laboratoire, les escargots sont mis à jeûner 48 heures afin de vider leur tractus digestif des résidus de nourriture non absorbée et congelés, en attendant la détermination des

concentrations en métaux lourds. Les échantillons d'eau sont acidifiés, ceux du sol, des végétaux et des aliments sont mis à sécher à 60°C afin de permettre leur conservation jusqu'à analyse des métaux.

IV.3. Identification bactérienne et analyse des métaux

Les escargots sont décongelés avant chaque manipulation. Les individus composant le prélèvement P1 sont sommairement décontaminés en surface à l'alcool à 70° avant broyage. Pour les autres prélèvements (P2, P3, P4), la coquille est enlevée et chaque escargot rincé à l'alcool à 70°. Il est ensuite repris au dixième en eau physiologique (poids/volume) puis broyé. Sur chaque broyat, une série de dilutions successives de raison dix est effectuée et 0,1 millilitres de chacune est ensemencé en double sur gélose trypticase soja, et sur milieu de Rambach. Les incubations sont effectuées à 30° C et à 37° C en aérobiose pendant 24h.

Après dénombrement, sur chaque colonie différente, des tests culturels et biochimiques sont réalisés : coloration de Gram, recherche de la mobilité, recherche de cytochrome oxydase, recherche du type respiratoire en gélose viande-foie en tube, réduction des nitrates, étude du métabolisme du glucose. Les systèmes API-Bio-Mérieux, API 20E, API 20 NE, API 50 CHE, ID 32E (Bio-Mérieux, Marcy l'Etoile, France) sont utilisés pour compléter ces tests. L'identification au genre et/ou à l'espèce a été réalisée selon les profils proposés par les systèmes API, en accord avec les critères d'espèce ou de genre définis par le Bergey's Manual of Determinative Bacteriology et le Bergey's Manual of systematic Bacteriology.

Les teneurs en éléments métalliques dans le sol, les végétaux et les escargots sont déterminées conformément aux techniques décrites ultérieurement, dans le Chapitre V.

Chapitre V. Caractérisation des échantillons et méthodes d'analyses des éléments traces métalliques, dans les différents compartiments des microcosmes, et des HAP

Tous les prélèvements de sol, de végétaux et d'escargots réalisés sur les différents sites d'études subissent les traitements appropriés afin de déterminer leurs teneurs en ETM.

V.1. Compartiment 1 : le sol

Lors de l'analyse de sols contaminés, il est nécessaire de réaliser une caractérisation physico-chimique complète des échantillons prélevés. Dans ce but, différents paramètres sont mesurés (Figure 14) :

- la granulométrie (NF X 31-107),
- le pH (NF ISO 10 390),
- la capacité d'échange cationique CEC (NF X 31-130),
- le carbone organique (NF ISO 10 694),
- l'azote total (NF ISO 13 878),
- la teneur totale en éléments traces métalliques (digestion à l'eau régale),
- la fraction métallique biodisponible (NF X 31-120).

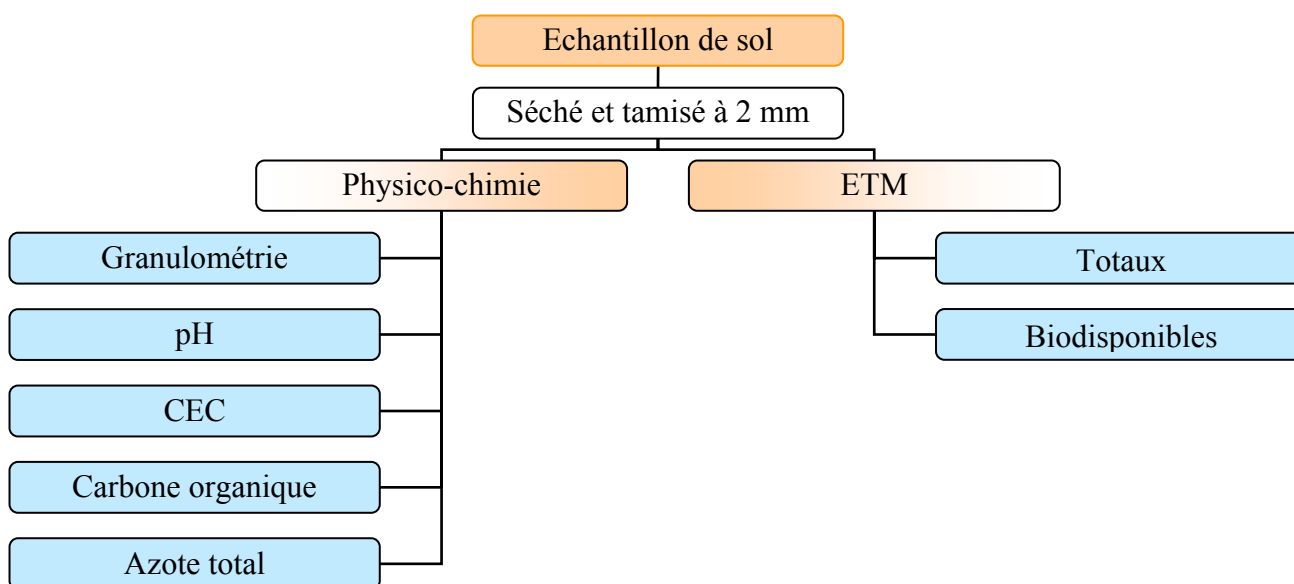


Figure 14 : Récapitulatif des différentes analyses réalisées sur un même échantillon de sol

Dès leur arrivée au laboratoire, les échantillons de sol sont séchés puis tamisés à 2 mm. La fraction non utilisée est conservée dans des sacs en plastique en chambre froide (4°C).

La détermination de la **granulométrie** repose sur le principe de mise en suspension des particules minérales d'un échantillon de terre : les différentes classes de particules sont séparées par sédimentation, par gravité pour les fractions fines ($< 50\mu\text{m}$) et par tamisage pour les fractions supérieures. Dans chaque suspension obtenue, un petit prélèvement est effectué dont le résidu solide après évaporation du liquide sera pesé. Les différentes particules rencontrées dans un sol peuvent donc être classées en fonction de leur diamètre, comme le montre le Tableau 26.

Tableau 26 : Classes granulométriques utilisées en pédologie

Taille des particules	Fraction granulométrique
$< 2 \mu\text{m}$	Argile
$2 \mu\text{m}$ à $20 \mu\text{m}$	Limons fins
$20 \mu\text{m}$ à $50 \mu\text{m}$	Limons grossiers
$50 \mu\text{m}$ à $200 \mu\text{m}$	Sables fins
$200 \mu\text{m}$ à 2 mm	Sables grossiers
2 mm à 20 mm	Graviers
$> 20 \text{ mm}$	Cailloux

La texture d'un sol se caractérise alors par l'abondance relative des différentes fractions. Une infinité de textures différentes existent : elles sont reportées dans le triangle des textures des sols (Figure 15).

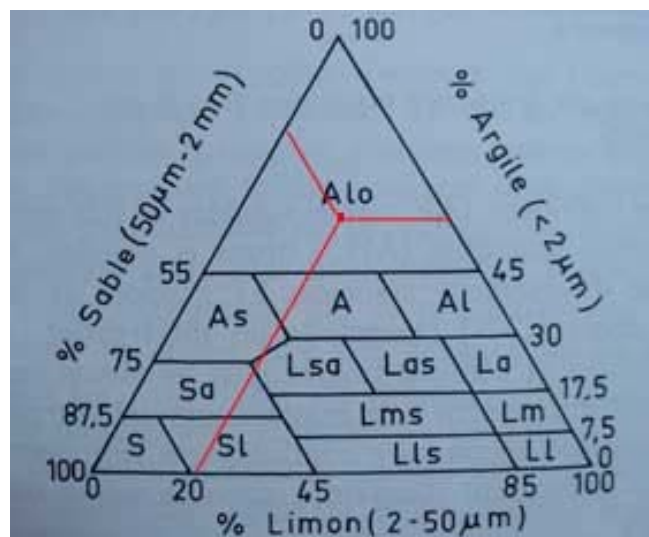


Figure 15 : Diagramme triangulaire de classification des sols en fonction de leur texture (Jamagne, 1967) (S : sable, Sl : sable limoneux, Sa : sable argileux, Lls : limon léger sableux, Lms : limon moyen sableux, Las : limon argilo-sableux, Ll : limon léger, Lm : limon moyen, La : limon argileux, As : argile sableux, A : argile, Al : argile limoneuse, Alo : argile lourde).

La mesure du **pH** s'effectue grâce à une électrode en verre plongée dans une suspension de sol dans de l'eau ultrapure avec un rapport 1:5, après agitation pendant 24 heures.

La **CEC** caractérise la quantité de cations qu'un sol peut échanger en fonction du pH et s'exprime en cmol.kg^{-1} . Elle est déterminée selon la méthode de Metson, après saturation à l'acétate d'ammonium du complexe de sorption du sol. La CEC est liée à la teneur en argiles du sol ainsi qu'à sa richesse en matière organique. Pour le dosage du **carbone organique**, il faut, dans un premier temps, éliminer les carbonates présents dans le sol par ajout d'acide chlorhydrique. Ensuite, le carbone présent dans le sol est oxydé en dioxyde de carbone (CO_2) par chauffage à une température d'au moins 900°C ; la quantité de gaz carbonique dégagée est enfin mesurée.

Le dosage de **l'azote total** se fait par la méthode de combustion sèche.

V.1.1. Teneur totale en éléments traces métalliques (Promeyrat, 2001 ; Pihan, 2001)

Pour déterminer les teneurs totales en ETM dans les échantillons de sols prélevés, ces derniers sont minéralisés selon la méthode à l'eau régale (NF X 31-147). Les éléments traces métalliques sont mis en solution dans un mélange d'acides chlorhydrique et nitrique concentrés, par ébullition sous réfrigérant à reflux. 500 mg +/- 0,5 de sol séché et tamisé à 2 mm, sont placés dans des tubes en verre à minéralisation (matras) avec 2,5 ml d'acide nitrique, 7,5 ml d'acide chlorhydrique et 3 ml d'eau nanopure. Un réfrigérant à reflux est installé sur chacun des tubes ; ils sont placés sur un bloc chauffant afin de permettre l'ébullition du mélange sol acide pendant 2h. Une fois les tubes refroidis, les réfrigérants sont rincés avec 30 ml d'eau nanopure, la solution est transvasée dans une fiole jaugée et est complétée à 100ml avec de l'eau nanopure. Les minéralisats obtenus sont conservés dans des tubes en polystyrène cristal jusqu'à analyse en S.A.A.

V.1.2. Fraction métallique biodisponible (NF X 31-120, 2003)

Les quantités de métaux susceptibles d'être prélevés par les végétaux sont extraites des échantillons de sol par l'acétate d'ammonium en présence d'EDTA.

50ml de la solution d'extraction est mélangé à 5 g +/- 0.01 g de sol, pendant 2h, sous agitation magnétique à température ambiante. La préparation de la solution d'extraction s'obtient suivant le protocole suivant :

- mélange de 3.723 g d'EDTA (soit $(\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_4\text{NNa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) + 77 g d'acétate d'ammonium ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) dans une fiole de 1000 ml,
- ajout de 400 ml d'eau nanopure puis agitation jusqu'à dissolution totale à froid,
- ajout de 450 ml d'eau nanopure puis ajustement du pH 7,00 +/- 0,05 avec de l'ammoniaque ou de l'acide acétique,
- complément de la fiole à 1000 ml avec de l'eau nanopure.

Après agitation pendant 2 heures, la solution obtenue est centrifugée à 3000 tours par minute (tpm) pendant 10 min de manière à récupérer le surnageant et à le transvaser dans un récipient hermétique. La fraction métallique estimée comme biodisponible présente dans chaque échantillon de sol sera dosée par S.A.A. dans les surnageants obtenus.

V.2. Compartiment 2 : la végétation

Le trèfle blanc (*Trifolium repens*) semé sur les parcelles appartient à la famille des Légumineuses : présent dans les régions tempérées jusqu'à 2300m, il fleurit de mai à octobre sur tous types de terrain (prés, jardins, chemins) même pauvres, qu'ils soient ensoleillés ou ombragés. C'est une plante vivace, principalement utilisée comme herbage en agriculture biologique. Les échantillons de végétaux prélevés sur les sites subissent la même minéralisation acide que les escargots (voir § V.3.) : 300 mg de végétaux, rincés à l'eau nanopure puis séchés, sont minéralisés par 4,5 ml d'acide nitrique HNO₃ ½. Les tubes sont complétés à 20 ml par de l'eau nanopure.

V.3. Compartiment 3 : les organismes vivants

Les concentrations en éléments traces métalliques dans le pied et les viscères des escargots sont analysées, par lots de cinq individus, selon le protocole suivant :

- Une fois ramenés au laboratoire, les escargots sont mis à jeûner pendant deux jours afin d'éliminer la nourriture non absorbée et les fèces de leur tractus digestif.
- La dissection des escargots décongelés permet de séparer le pied des viscères, au niveau du bord du manteau (Figure 16).

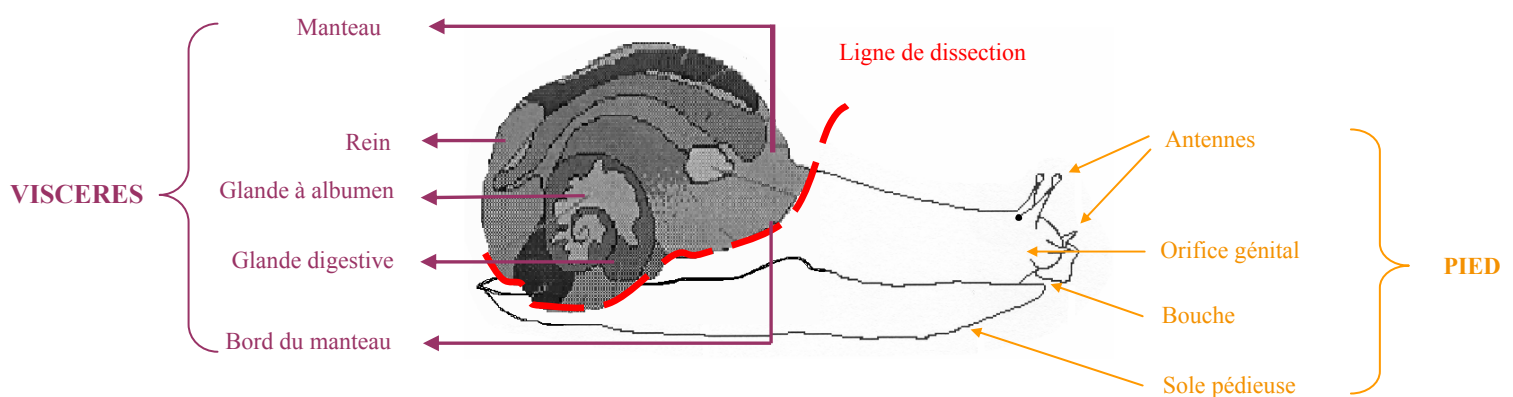


Figure 16 : Anatomie d'*Helix aspersa aspersa* sorti de sa coquille, avec représentation de la ligne de dissection séparant le pied des viscères et des principaux organes internes

La partie « pied » contient la tête avec le complexe nerveux, les glandes salivaires, le bulbe buccal, l'œsophage, une partie de l'estomac, la partie terminale des conduits génitaux ainsi que les muscles, téguments et conjonctifs de la sole pédieuse. La partie « viscères » regroupe le bord du manteau appelé aussi bourrelet palléal, le manteau, le cœur, le rein, la glande digestive (autrefois appelée hépatopancréas), l'estomac, l'intestin, la gonade, la glande à albumen et une partie des conduits génitaux.

- Une fois le pied et les viscères séparés, les organes sont placés dans des tubes de 20 ml en polystyrène cristal à usage unique (SAVAG LES, TCR 20, Réf 268) et mis à l'étuve à 60°C jusqu'à poids constant.

- La dessiccation achevée, les échantillons subissent une minéralisation par l'acide nitrique à chaud : les tubes contenant 300 mg +/- 10 mg d'échantillon et 4,5 ml d' HNO_3 ½ sont placés à l'étuve à 60°C pendant 48h, dans des portoirs spéciaux permettant de bloquer les bouchons. Quand le poids des pieds ou des viscères est supérieur à 300 mg, il est alors nécessaire de les broyer finement à l'aide d'un mortier.

- L'attaque acide terminée, les tubes sont complétés à 20 ml par de l'eau nanopure, dans l'attente des analyses en Spectroscopie d'Absorption Atomique.

V.4. Dosage des métaux

Les méthodes spectroscopiques sont les plus utilisées pour élucider la structure des molécules ou pour l'analyse quantitative et qualitative des composés organiques et inorganiques. La spectrophotométrie d'absorption atomique S.A.A. utilise le fait qu'un atome peut absorber une radiation qu'il est susceptible d'émettre. La technique consiste donc à éclairer la vapeur monoatomique de l'élément à doser par une radiation d'intensité déterminée et de longueur d'onde λ caractéristique de l'élément. Pour obtenir l'élément à l'état de vapeur monoatomique, le minéralisat est vaporisé soit par nébulisation dans une flamme, soit par injection dans un four graphite où se déroule la dessiccation, la minéralisation de la solution analysée et l'atomisation de l'élément. En fonction de leurs teneurs, les ETM sont dosés en four ou en flamme : le plus souvent, le cuivre, le manganèse, le fer et le zinc sont dosés en flamme (Perkin-Elmer 2380) alors que le cadmium, le chrome, le nickel et le plomb sont dosés en four (Varian SpectrAA 300/400). Les limites de détection de ces appareils sont reportées dans le Tableau 27.

Tableau 27 : Limites de détection des métaux en Spectroscopie d’Absorption Atomique à flamme et en four ($\mu\text{g.l}^{-1}$)

	Cu	Fe	Zn	Mn	Ni	Cd	Pb	Cr
Flamme	10	20	10	15	20	10	30	20
Four	0,5	0,3	0,1	1,5	1,2	0,1	1,5	0,4

Des échantillons certifiés permettent de contrôler la fiabilité des résultats obtenus : de l’hépatopancréas de homard TORT-2 pour les échantillons d’escargots, du sol contaminé LGC 6144 ainsi que des échantillons de plantes IAEA-V-10 (PROMOCHEM). Les concentrations en EM sont exprimées en mg.kg^{-1} de poids sec (PS), après multiplication de la valeur mesurée (en mg.l^{-1}) par le volume dans les tubes de minéralisation, puis division de ce résultat par la masse en poids sec de l’échantillon minéralisé.

V.5. Dosage des HAPs dans les escargots

Des escargots transférés sur le site d’Homécourt ($n=2$ par microcosme), présentant une contamination importante en HAP, ont été confiés à l’IRH (Nancy) afin de déterminer les concentrations en HAPs présentes dans leur organisme. Les échantillons ont tout d’abord subi une extraction ASE (hexane/dichlorométhane), ils ont ensuite été évaporés sous flux d’air avant d’être repris dans de l’acétonitrile. Le dosage a été réalisé grâce à une analyse en HPLC (WATERS), avec détection fluorimétrique et à barrette diode (pour la quantification de deux des HAP sur les 16 de liste EPA).

Chapitre VI. Localisation intracellulaire des éléments traces métalliques dans les escargots

Pour rendre visible ce que l’on veut observer (structures, tissus), il est nécessaire de mettre en œuvre diverses techniques microscopiques appliquées à l’échantillon étudié (organisme entier, tissu, organe ou cellule). Que les coupes soient destinées à l’observation en microscopie optique (MO) ou électronique (ME), leurs préparations suivent le même protocole : fixation, inclusion, coupe, coloration et montage.

VI.1. Protocole d'intoxication des escargots

En laboratoire, 10 escargots *Helix aspersa aspersa*, âgés de 1 mois, ont été nourris avec de la farine contaminée par 5 % de poudre de cuivre, pendant une semaine. Les particules de cuivre mesurent entre 0.7 et 1 μm . A la fin de l'expérience, les escargots sont sacrifiés et le pied et les viscères sont séparés. Pour notre étude de localisation intracellulaire du cuivre, le pied et les viscères subissent alors le protocole de fixation, inclusion, coupe, coloration et montage décrit ci-dessous pour analyses en microscopie optique et électronique.

VI.2. Microscopie optique

VI.2.1. Fixation

La fixation permet la conservation des structures et le durcissement des pièces. Elle doit impérativement être réalisée après la dissection de l'escargot (séparation du pied et des viscères quand les escargots sont encore vivants), par immersion de l'échantillon dans un grand volume de liquide fixateur, dans notre cas le liquide de Bouin ; compte tenu de leur taille, les échantillons séjournent trois jours dans ce fixateur.

VI.2.2. Inclusion

Cette étape a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Les échantillons sortis du liquide de Bouin sont rincés plusieurs fois à l'eau déminéralisée. Le milieu d'inclusion utilisé est la paraffine : de part son caractère hydrophobe, les échantillons doivent donc subir, dans un premier temps, une déshydratation par immersion successives dans des bains d'alcool à degré croissant (30 minutes dans un bain d'alcool à 70°, deux bains successifs de 15 minutes dans de l'alcool à 95° puis trois bains de 30 minutes dans de l'alcool à 100°). Ensuite, l'alcool est remplacé par du toluène (trois bains de 15 minutes chacun) afin d'imprégner les échantillons par le solvant de la paraffine.

Dans un deuxième temps, les échantillons sont placés à l'étuve dans un bain de paraffine liquide (étuve à 56-58°C) afin qu'elle imprègne totalement l'échantillon. Après une nuit, les échantillons sont inclus dans la paraffine à l'aide de moules (barres de Leuckart) : après refroidissement, on se trouve donc en présence de blocs de paraffine durs, à l'intérieur desquels se trouvent les échantillons inclus et orientés selon le plan de coupe choisi.

VI.2.3. Coupe

Les coupes des blocs de paraffine, de 7 μ d'épaisseur, sont réalisées par un microtome Leitz et sont collées sur des lames de verre grâce à de l'eau albumineuse.

VI.2.4. Colorations (Martoja et Martoja-Pierson, 1967 ; Gabe, 1968)

Comme les colorants sont en solution aqueuse, les lames doivent être déparaffinées avant de pouvoir être réhydratées. Le déparaffinage consiste à chauffer les lames, jusqu'à fusion de la paraffine, avant de les immerger dans trois bains successifs de toluène. Ensuite, les lames sont plongées dans des bains d'alcool à degré décroissant (un bain d'alcool à 100°, deux bains d'alcool à 95° puis un bain d'alcool à 70°).

Deux colorations complémentaires sont réalisées en parallèle, afin, d'une part, de mettre en évidence la structure des tissus par des colorants nucléaires et cytoplasmiques, et d'autre part, de révéler la présence de cuivre dans les tissus.

VI.2.4.1. Coloration au bleu alcian associé à des colorants de fond

Le bleu alcian est un colorant basique appartenant à la famille des Phtalocyanines et permettant la coloration des mucopolysaccharides acides en bleu. Dans notre étude, il est associé à un colorant nucléaire, l'hématoxyline de Groat (coloration bleu violette des noyaux et de la chromatine) et à un colorant cytoplasmique, l'orangé G molybdique (coloration jaune observée).

Les lames sont tout d'abord immergées 20 minutes dans un bain de bleu alcian puis lavées à l'eau courante. Ensuite, elles sont placées 3 minutes dans un bain d'hématoxyline de Groat avant d'être rincées à l'eau courante puis à l'eau déminéralisée. Enfin, elles sont placées 5 min dans un bain d'orangé G molybdique, avant un dernier rinçage à l'eau courante.

VI.2.4.2. Coloration à l'acide rubéanhydrique

La coloration à l'acide rubéanhydrique permet la détection histochimique du cuivre dans les tissus. Les coupes sont exposées à des vapeurs d'acide chlorhydrique, dans un cristalliseur, pendant 15 minutes afin de démasquer le cuivre, puis lavées à l'eau courante. Ensuite, les lames sont immergées 10 minutes dans une solution à 0,1% de dithioamide dans de l'alcool à 70°C, puis 200mg/l d'acétate de sodium pur sont ajoutés : après mélange, la réaction s'opère pendant 48 heures. Enfin, les lames sont placées 60 minutes dans un bain d'alcool à 70°.

La présence de cuivre se traduit par une teinte variant du rouge-rose au bleu-vert, observée au niveau des particules de cuivre assimilées.

VI.2.5. Montage

Après avoir subi une nouvelle déshydratation (deux bains d'alcool à 95°C puis à 100°, trois bains de toluène), les lames colorées sont montées entre lames et lamelles avec une résine synthétique, l'Eukitt. Les lames sont alors prêtes pour être observées au microscope optique.

VI.3. Microscopie électronique

A la fin de l'expérience, les escargots sont anesthésiés par ingestion de succinyl choline (1mg.ml⁻¹) pour effectuer la dissection des organes sur des individus vivants. Les organes prélevés sont fixés par de la glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate (1 vol/1 vol) pendant deux heures au réfrigérateur, avant d'être rincés dans un tampon cacodylate. Ensuite, ils subissent une post-fixation dans du tétroxyde d'osmium, à température ambiante puis une déshydratation afin d'obtenir un bloc homogène et solide. Les échantillons subissent alors une phase d'imprégnation progressive par la résine (mélange Epon-Araldite) lors de quatre bains successifs : 1/3 résine + 2/3 oxyde de propylène, 1/2 résine + 1/2 oxyde de propylène, 2/3 résine + 1/3 oxyde de propylène et enfin une nuit dans la résine pure. L'inclusion s'effectue dans un moule en plastique à température ambiante avant la polymérisation (ou durcissement de la résine) des blocs à l'étuve.

Grâce à un ultramicrotome (LKB 2088 Ultratome V), des coupes semi-fines des blocs sont réalisées et colorées au bleu de Toluidine afin de reconnaître les structures cellulaires concernées par la coupe. En parallèle, des coupes fines sont recueillies sur des grilles en nickel et contrastées par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb (Reynolds, 1963). L'examen de ces coupes de fait sur un microscope électronique à transmission (MET) JEOL CX 100.

VI.4. MET associée à l'analyse en rayons X (EDX)

Les échantillons destinés à l'analyse X ne sont pas contrastés par l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb afin de ne pas interférer avec la recherche d'éléments métalliques dans les échantillons. Les coupes fines, réalisées sur microtome, sont recueillies sur des grilles en nickel, puisque l'on désire mettre en évidence le cuivre.

Cette technique se base sur l'exploitation de signaux X émis lors du bombardement d'un échantillon par un faisceau d'électrons (Figure 17). Lors de ce bombardement, un électron incident du faisceau

peut transférer une partie plus ou moins importante de son énergie. Dans le cas des transferts d'énergie les plus importants, différents types de signaux X sont émis (photons X, électrons Auger ou ralentissement d'électrons) : chaque spectre de signaux X obtenu est caractéristique d'un élément chimique. Grâce à cette méthode, le cuivre pourra donc être mis en évidence.

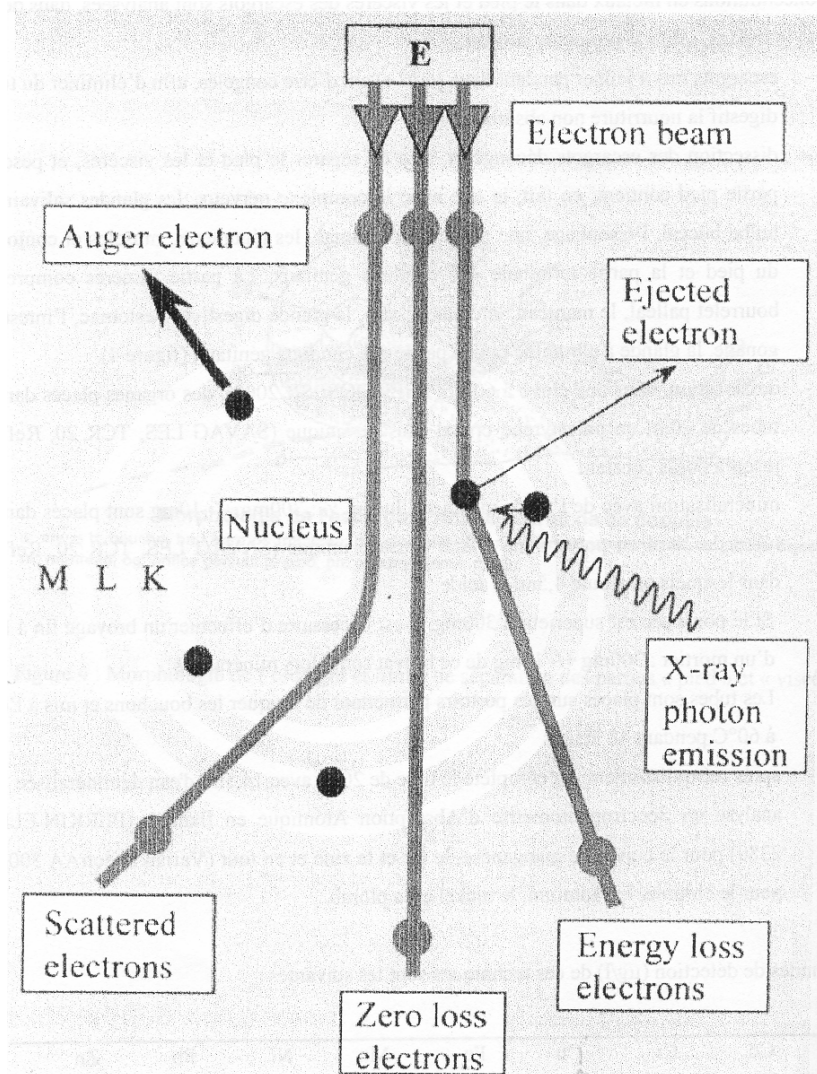


Figure 17 : Principe de l'interaction électron-matière

Chapitre VII. Traitement statistique des données

Les différences significatives entre les lots d'escargots ont été déterminées grâce au test non paramétrique U de *Mann-Whitney* (Seigel, 1956). Afin de rechercher l'existence ou non de relation linéaire entre les concentrations en micropolluants dans le sol et celles mesurées dans les viscères des escargots transférés, le *coefficient de corrélation linéaire* R^2 a été déterminé à partir des droites de régressions linéaires ou multiples déterminées sous Statistica. Dans le cadre du plan expérimental en préambule à cette étude, une *régression multiple* a été réalisée afin de déterminer la combinaison de nourriture appropriée aux études de biosurveillance de sites.

L'étude de l'influence des facteurs externes sur la croissance des escargots a été réalisée en collaboration avec un étudiant en statistique, Nicolas Himbert, au cours d'un stage de 3 mois réalisé au laboratoire au printemps 2004. Pour ce faire, des régressions multiples (ascendantes) ont été réalisées afin de déterminer les équations des modèles obtenus.

RESULTATS

Première Partie

Etude Méthodologique

CHAPITRE I ETUDE INTEGREE DE LA CONTAMINATION EN METAUX LOURDS (Pb, Zn, Cd) EN MILIEU AUTOROUTIER : ACCUMULATION DANS LE SOL, LES GRAMINÉES ET LES ESCARGOTS TERRESTRES.

Dans le domaine de la surveillance de sites par des organismes bioindicateurs (en milieu industriel ou en environnement autoroutier), l'intégration des différentes sources de contamination potentielles s'avère primordiale. Dans le cadre de la contamination engendrée par une autoroute, tous les compartiments doivent être pris en compte, le sol, la végétation autochtone et les organismes indicateurs transférés, afin d'évaluer l'impact global du trafic autoroutier sur l'environnement proche. Une étude menée en Lorraine, à proximité de l'autoroute A31, a fait l'objet d'une publication dans *Chemosphere*.

Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: bioaccumulation in soil, Graminaceae and landsnails.

B. VIARD, F. PIHAN, S. PROMEYRAT et J.C. PIHAN, *Chemosphere*, 2004, **55**: 1349-1359.

RÉSUMÉ

Pour évaluer la contamination induite par le trafic à proximité d'une autoroute (A31, France), plusieurs études complémentaires ont été menées sur deux sites, avec des profils et un trafic différents. Les concentrations en zinc, plomb et cadmium ont été déterminées par spectroscopie d'absorption atomique dans les dépôts, le sol et les plantes autochtones (Graminées) récoltés à proximité de l'autoroute, et dans les viscères des escargots *Helix aspersa*, transférés sur les sites comme organisme sentinelle. D'après les résultats obtenus pour les différents compartiments, l'autoroute exerce une influence sur son environnement jusqu'à 320m, avec une contamination maximale observée entre 5 et 20m : les concentrations dans les plantes, à proximité de l'autoroute, étaient de 2.1 mg Pb.kg⁻¹ PS, 0.06 mg Cd.kg⁻¹ PS et 62 mg Zn.kg⁻¹ PS et les concentrations mesurées dans les escargots étaient de 21.3 mg Pb.kg⁻¹ PS, 5.7 mg Cd.kg⁻¹ PS et 510.8 mg Zn.kg⁻¹ PS. En s'éloignant de l'autoroute, les niveaux mesurés diminuent. A partir des résultats obtenus pour les trois métaux, il semble que le plomb soit le meilleur métal pour évaluer la contamination induite par le transport autoroutier.



ELSEVIER

Chemosphere 55 (2004) 1349–1359

www.elsevier.com/locate/chemosphere

CHEMOSPHERE

Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: bioaccumulation in soil, Graminaceae and land snails

Bénédicte Viard ^{*}, François Pihan, Sandrine Promeprat, Jean-Claude Pihan

Laboratoire BFE—Equipe PEE, Université de Metz, Campus Bridoux, 2 rue du général Delestraint, 57070 Metz, France

Received 3 April 2003; received in revised form 12 December 2003; accepted 6 January 2004

Abstract

To assess the contamination induced by traffic at the vicinity of a highway (A31, France), several complementary studies were carried out on two sites, with different profiles and traffic intensity. Concentrations of zinc, lead and cadmium were measured by atomic absorption spectrophotometry in deposits, roadside soil and autochthonous plants (Graminaceae) gathered at the vicinity of the highway (1–320 m), and in the viscera of snails *Helix aspersa*, transferred as sentinel in the sites. According to the results obtained for different compartments, the highway induces a contamination on the surrounding environment, up to 320 m, but with the maximum contamination observed between 5 and 20 m: the concentrations measured in plants at the vicinity of the highway were 2.1 mg Pb kg⁻¹ DW, 0.06 mg Cd kg⁻¹ DW, 62 mg Zn kg⁻¹ DW and the concentrations measured in snails were 21.3 mg Pb kg⁻¹ DW, 5.7 mg Cd kg⁻¹ DW, 510.8 mg Zn kg⁻¹ DW. The levels measured decreased with increasing distance from the highway. Results of the three metals studied indicated that lead seems to be the best metal to evaluate road transport contamination.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Traffic; Metallic contamination; Global deposits; Soil; Plants; *Helix aspersa*

1. Introduction

The contribution of cars and road transports to the global emission of atmospheric pollutants is regularly increasing. These pollutants have an impact on the environment: road transports contaminate the atmosphere, water and soil near the highway via atmospheric fallout. Traffic pollutants include potentially toxic metals for health like lead, cadmium and zinc (ATSDR, 1994, 1999a,b; Caussy et al., 2003). Many studies have shown contamination by these elements, at the vicinity of highways (Zhang et al., 1999; Turer and Maynard,

2003). In 1994, 28 390 tons of lead were emitted in the atmosphere, with a road transport contribution of 70% (Gromov and Emelina, 1994). In 2010, Von Storch et al. (2003) estimate that the total emissions will decrease until 12 600 tons, with a road transport contribution of 60%.

The dispersion of contaminants is influenced by meteorological conditions, like wind (Piron-Frenet et al., 1994), rainfall, profiles (Bennouma, 1988) or traffic intensity (Garcia and Millan, 1998). The concentrations of metals in the roadside soil are influenced by the same factors (Garcia et al., 1996; Othman et al., 1997; Garcia and Millan, 1998) and by soil parameters. In order to assess the contamination by metals at the vicinity of a highway, several studies have been carried out dealing with the different compartments: study of the global deposits, the roadside soil and autochthonous plants

^{*} Corresponding author. Tel.: +33-03-87-38-84-00; fax: +33-03-87-37-84-23.

E-mail address: nota_bene_fr@yahoo.fr (B. Viard).

(Graminaceae) contamination and bioaccumulation of metals in the viscera of the garden snail *Helix aspersa aspersa*. Indeed, snails are considered as suitable organisms for the diagnostic of sites contaminated with heavy metals (Laskowski and Hopkin, 1995; Pihan and de Vauffeury, 2000; Swaileh et al., 2001). They are able to accumulate bioavailable metals in their organs and they present an important organotropism for the digestive gland and the kidney (Brooks et al., 1992; Berger and Dallinger, 1993; Pihan, 2001).

2. Materials and methods

2.1. Study area

The present study investigated the emission of pollutants (namely Pb, Zn and Cd) from the highway A31 between the city of Nancy (France) and the border with Luxembourg, during summer 1997. The rainfall was 68 mm and the average temperature 24 °C.

Two sites, with different profile and traffic intensity were selected. Road transport pollution was studied on both sides of the highway along transects with sampling pointed at 1–5–20–40–80–160 and 320 m (Fig. 1). In the results and in discussion sections, the distances will be indicated as follows: Ex or Wx (E: east side, W: west side, x: distance from the road in m). Site 1 is characterized by an excavation profile and a traffic level of 40 000 vehicles per day, whereas site 2 is of the same road level with a traffic of 60 000 vehicles per day. For the data analysis, east side and west side, as well as the windward, will be distinguished; the west wind was dominant.

2.2. Atmospheric deposits

In order to evaluate the deposit flow, suitable experimental devices (Fig. 2), adapted from literature (Harrison and Johnston, 1985; Hewitt and Rashed, 1991; Sloof, 1995), were used to collect liquid and solid fallout, in suspension or in solution.

The device consists of a polypropylene bottle and a funnel with a diameter of 22 cm, located at 1.80 m height to avoid telluric interferences, and covered with PVC laminated net to prevent the entrance of any undesired bodies (insects, leaves...). The devices were renewed monthly. Before any utilisation on the site, the components of the devices were washed with acidified solution (nitric acid 10%) in order to prevent previous contamination. For each distances on transect, the deposits inside the bottle correspond to one sample.

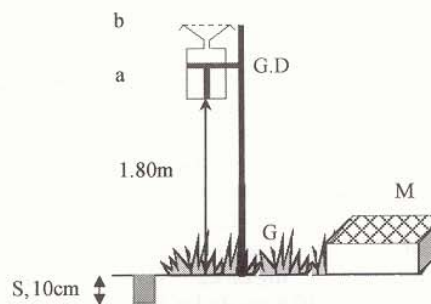


Fig. 2. Schematic representation of the experimental device used to collect atmospheric deposits (G.D) and microcosm (M) for snails (a: polypropylene bottle, b: funnel, G: Graminaceae sample, S: soil sample).

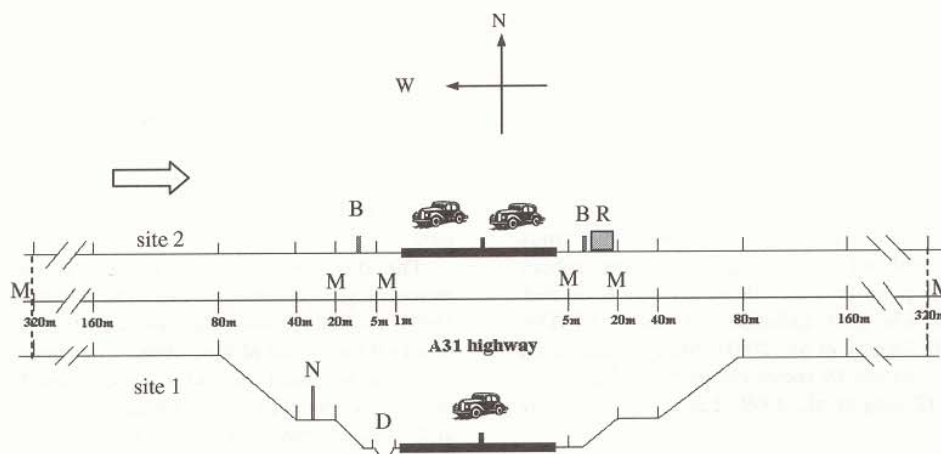


Fig. 1. Schematic representation of the studied transects on the highway A31 between Nancy (northern France) and the Luxembourg frontier (B: crash barrier, D: draining ditch, M: microcosm, N: wire netting, R: electric railway line, site 1: 40 000 vehicles/day, site 2: 60 000 vehicles/day, ⇒ wind dominant).

Before analysis, the devices were rinsed with acidified water (10% HNO₃) and weighted. Then, they were acidified with nitric acid (Suprapur 69%) until pH < 2 in order to dissolve the metals.

2.3. Soil

In parallel, a spatial follow-up of the soil metal contents was performed. Soil samples ($n = 5$) were collected, on a monthly basis, from the upper 10 cm of soil, at different distances perpendicular to the highway and stored into plastic bags for the transport. On site 1, the samples were collected from an agricultural soil, which is constituted of "silt of plateau". On site 2, the samples were taken from the flood plain of the Moselle; on the west side, the soil was of the alluvial type with sand, while on the east side, it was clayey alluvial. For both sides, soil properties were determined: the granulometry was determined according to NF P94-056, soil pH (H₂O) was determined in a 1:2.5 soil/water suspension and the cation exchange capacity (CEC) at pH 7.0 was calculated with NF x31-130. Soil carbon (C) was also determined.

Soil samples were dried (60 °C) in flasks until constant weight was reached, crushed and then screened to pass a sieve of 2 mm mesh size. About 0.5 g of each sample were treated with HCl (38%) and HNO₃ (65%) according to the *aqua regia* digestion (NF X31-147, 1996).

2.4. Plants

Samples of autochthonous Graminaceae (*Festuca arundinacea*, *Phalaris* sp., *Dactylis glomerata*) were collected at the same distances from the highway as the soil samples. Monthly, plant samples ($n = 3$) were cut off at 3 or 4 cm height above the soil and stored into plastic bags. All plant tissues were taken into account (leaves and stems), dried at 60 °C until constant weight was reached and then crushed by a mortar in a porcelain pestle. Hundred milligrams of dried powder of plants were put in polyethylene tube of 10 ml (three replicates for each sample) and digested with 2 ml of HNO₃ 50% (Normapur), under pressure in a steam room at 60 °C for 24 h. Then, the tubes were filled up with 8 ml of distilled water and centrifuged (2000 rpm for 15 min) in order to obtain a transparent supernatant for spectrophotometry analysis.

2.5. Snails

Juveniles *Helix aspersa aspersa* snails, aged two months (4.6 ± 0.5 g), came from the Metz laboratory, reared under controlled conditions (temperature 20 ± 2 °C, photoperiod 18 h L/6 h D, hygrometry 80–90% and flour food Helixal[®] from Ets Lépine, Clairveaux-les-

Lacs, 39130, France). Ten juveniles were transferred in each microcosm as previously described by Gomot de Vaufleury and Pihan (2002), settled at distances of 1 m (only on the west side of site 1), 5–20–320 m, from the highway, for one week. In parallel, 10 snails were let in laboratory conditions for one week, the reference snails. The metal bioaccumulation analysis was realized on five snails per microcosm: they were starved for 48 h before being frozen at –20 °C, until the analysis. After defrosting, the snails were washed with ultrapure water and the foot and viscera were separated. The viscera (including mantle, heart, kidney, digestive gland, stomach, intestines and the genitals) were dried at 60 °C until reaching constant weight. Then, 300 mg of each sample were mineralized with 4.5 ml of HNO₃ 50%, under pressure in a steam room at 60 °C, for 48 h. After mineralization, the tubes were filled up with 14.5 ml of ultrapure water.

The classification of the analytical results depends on the grid of metal contamination defined by Pihan (2001). Moreover, the bioaccumulation factors (BAFs) in snails were calculated using the formula:

$$BAF = C_s / C_f$$

where C_s is the concentration of the metal in snails and C_f the concentration of the metal in the food.

The BAFs were used to classify the snails as macro-concentrators (BAF > 2), microconcentrators (1 < BAF < 2) or deconcentrators (BAF < 1), as proposed by Dallinger (1993), taking into account percentages of metals from soil and from plants.

2.6. Chemical analysis

The concentrations of total metals in the samples were determined by atomic absorption spectrophotometry (AAS) with an air–acetylene flame for zinc (Perkin–Elmer 2380) and with a graphite furnace for lead and cadmium (Varian SpectrAA 300/400). The reliability of the measurements was controlled using certified reference materials: TORT-2 lobster hepatopancreas for snails, LGC 6144 gas work contaminated soil and IAEA-V-10 Hay for plants, from PROMOCHEM.

The detection limits for the flame AAS were 10 µg Zn l⁻¹, 30 µg Pb l⁻¹, 10 µg Cd l⁻¹ and for the graphite furnace 0.1 µg Zn l⁻¹, 1.5 µg Pb l⁻¹, 0.1 µg Cd l⁻¹. The results concerning the flow of heavy metals in deposits are expressed in µg m⁻² d⁻¹ (d: day); the concentrations of heavy metals in soil, plants and snails are expressed in mg kg⁻¹ of dry weight (DW).

2.7. Statistical analysis

Differences in metal concentrations were tested using an ANOVA test ($p < 0.05$) (Siegel, 1956). Concerning

deposit results, statistical analysis is impossible because there is no replicate.

The Wilcoxon test ($p < 0.05$) was used to calculate the highway impact distance.

3. Results

3.1. Deposit analysis

The concentrations of metals in the global deposits, for both sites, are shown in Fig. 3(a)–(c). The metal levels of deposition flow fluctuate, according to the metal, in the following order:

$$[\text{Zn}] > [\text{Pb}] > [\text{Cd}] \text{ in } \mu\text{g m}^{-2} \text{ d}^{-1}$$

Moreover, for both sites, the deposition of metals decreased with increasing distances from the highway except on the east side of site 1 for zinc and cadmium, with an increase in the concentrations between 40 and 160 m.

At the vicinity of the highway (5 m), the levels of deposits were higher in the East than in the West.

The levels of metals were higher in site 2 than in site 1, in a belt of 20 m on both sides of the highway (Fig. 3): for site 1, the highest values were $330 \mu\text{g Zn m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (E5), $58.3 \mu\text{g Pb m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (E5), $0.62 \mu\text{g Cd m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (E40) in comparison with $500 \mu\text{g Zn m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (E5), $104 \mu\text{g Pb m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (E5), $0.86 \mu\text{g Cd m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ (E5) for site 2. The Wilcoxon test allows us to calculate the distance at

which the highway affects the environment by evaluating the significant differences between the deposits for all the distances. For zinc and cadmium, the highway impact can be observed up to 160 m from it and for lead, the impact extends to 320 m, at the most.

3.2. Concentrations of metals in the roadside soil

Both sites presented different soil properties (Table 1): pH was lower in site 2 than site 1; texture, CEC and carbon differed between east and west side.

The concentrations of metals measured in the surface soil, for both sites, are shown in Fig. 4(a)–(c). The total contents of metals fluctuate, according to the metal, in the following order:

$$[\text{Zn}] > [\text{Pb}] > [\text{Cd}] \text{ in } \text{mg kg}^{-1} \text{ DW}$$

For all metals, the metal concentrations in soil decreased with increasing distances from the highway and, at the vicinity of the highway, were higher on the east side than on the west side: on both sites, Pb levels were significantly higher at E1 and E5 than W1 and W5 while Cd levels were only higher at E1 than W1 for site 1 (ANOVA, $p < 0.05$). For Zn, levels were significantly higher (ANOVA, $p < 0.05$) in site 1 than in site 2, except at 5 m. For Cd and Pb, there were no significant difference between site 1 and site 2 except at E20 and E320. In all cases, the pedogeochemical background levels of heavy metals, evaluated by Boudot et al. (1998) for the

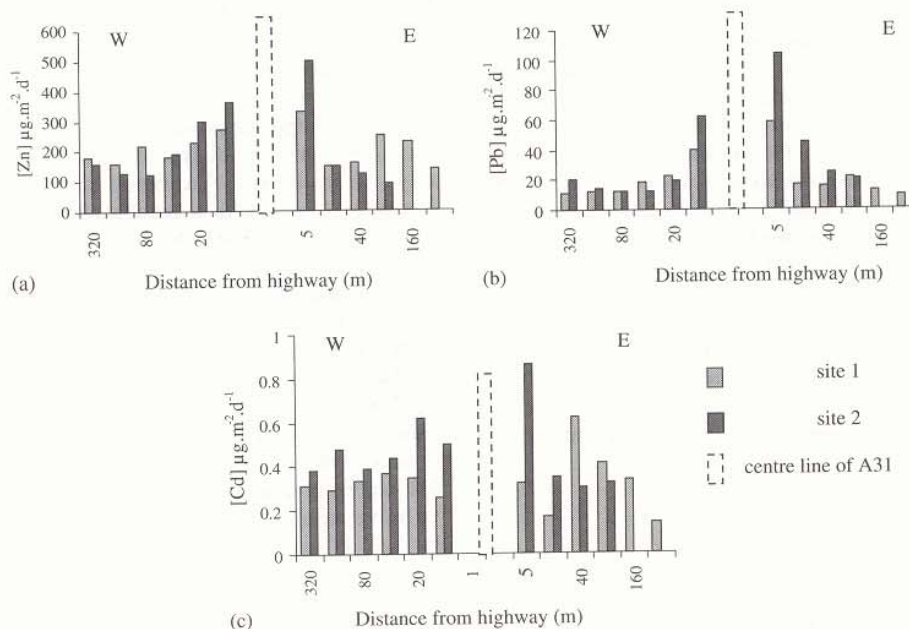


Fig. 3. Deposit flows of Zn (a), Pb (b) and Cd (c) in the atmospheric deposits at different distances from the highway A31 between northern France and Luxembourg (E: east side, W: west side).

Table 1
Soil main characteristics, for both sides (CEC: cation exchange capacity; C: organic carbon)

	Site 1		Site 2	
	West	East	West	East
Depth (cm)	0–10	0–10	0–10	0–10
pH (H ₂ O)	5.6–7.5	5.2–7.4	4.7–6.7	5.2–6.4
CEC meq/100 g	23–36	7–31	6–16	35–45
C %		1–3.5	1–2	3.7–5.5
Clay (<0.002 mm)%	28–45	18–24	7–17	32–51
Silt (0.002–0.06 mm)%	42–58	58–66	20–25	14–36
Sand (0.06–2 mm)%	10–14	12–20	59–69	3–23

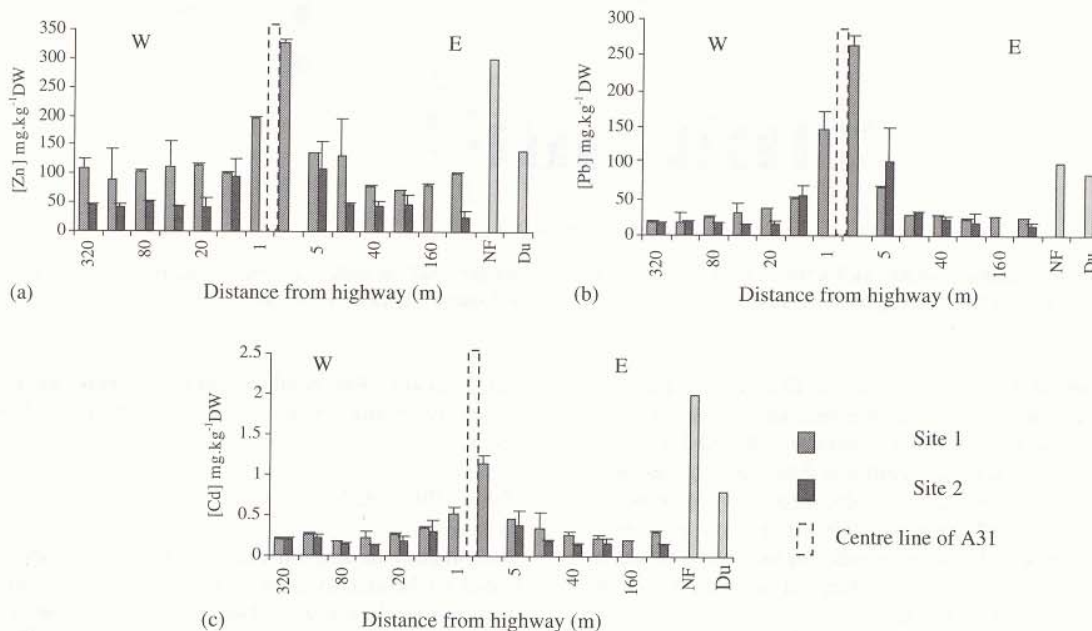


Fig. 4. Concentrations of Zn (a), Pb (b) and Cd (c) in the surface soil of both sites, with standard deviation ($n = 3$), at different distances from the highway A31 between northern France and Luxembourg (Du: Dutch guidelines, E: east side, NF: standards in France, W: west side).

two sites (Table 2), have also to be taken into account. They have been established according to the background levels of each identified constitutive material.

3.3. Bioaccumulation in plants

The concentrations of metals measured in the Graminaceae, for both sites, are shown in Fig. 5(a)–(c). The total contents of metals varied, according to the metal and had the following order:

$$[Zn] > [Pb] > [Cd] \text{ in } \text{mgkg}^{-1} \text{ DW}$$

Metal concentrations at different distances differed according to the site and the metal. With regard to site 1,

Table 2
Mean pedogeochemical backgrounds, mgkg^{-1} DW for both sites (Boudot et al., 1998)

	Site 1	Site 2	
	East	West	East
Pb	43.5	21.5	54
Zn	78.5	38	98.5
Cd	7	3.5	12

the level of lead was the highest at E5 and decreased with increasing distances from the highway, on the east side, while there was no significant difference on the west side (ANOVA, $p < 0.05$). On the east side, the profile of

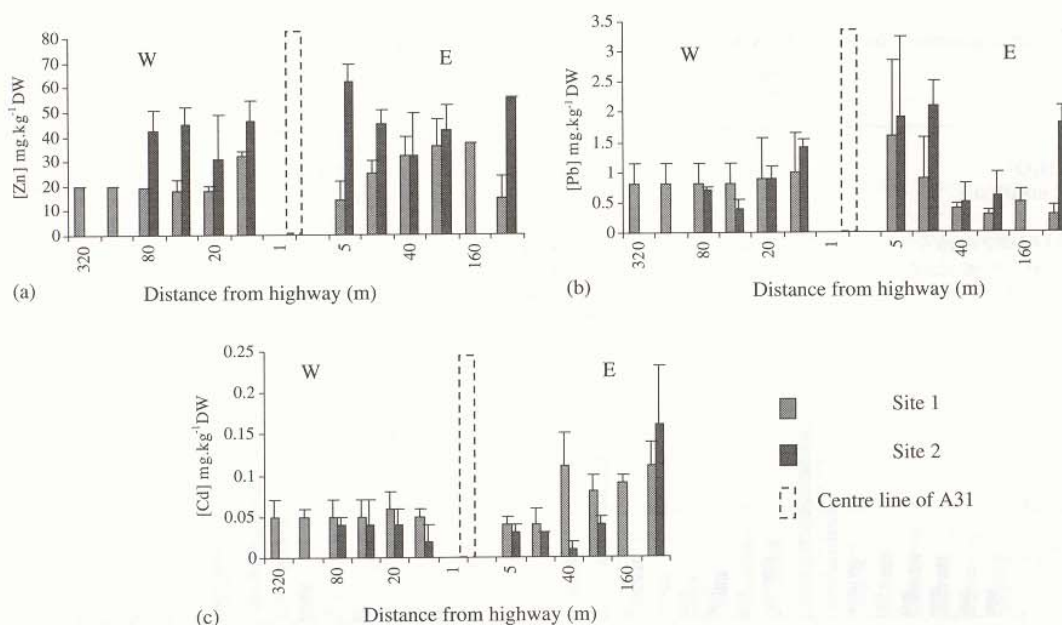


Fig. 5. Concentrations of Zn (a), Pb (b) and Cd (c) in the Graminaceae gathered on both sites, with standard deviation ($n = 3$), at different distances from the highway A31 between northern France and Luxembourg (W: west side, E: east side).

cadmium showed two levels: the first one, rather low, between 5 and 20 m and the second one, significantly higher (ANOVA, $p < 0.05$), between 40 and 320 m. As for lead, there was no significant difference on west side. For zinc, the concentration obtained at W5 was significantly higher (ANOVA, $p < 0.05$) than those relating to other distances. On the east side, an increasing tendency in zinc concentrations was observed between 5 and 160 m, before a fall at 320 m.

With regard to site 2, the levels of metals were, in general, higher on the east side than on the west side (ANOVA, $p < 0.05$). For lead on the east side, levels decreased with increasing distances from the highway up to 160 m. Indeed, at 320 m, Pb level obtained was significantly higher (ANOVA, $p < 0.05$) than those measured at 40 and 80 m and reached that measured at 5 m. On the west side, there was also a decrease between 5 and 80 m. For cadmium, there was no significant difference (ANOVA, $p < 0.05$) between levels of metals at different distances on both sides, except at E320, where the maximum value was observed ($0.15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$). For zinc, levels decreased (ANOVA, $p < 0.05$) on the east side with increasing distances from the highway, up to 160 m, while they were no significantly different on west side.

3.4. Levels of metals in the viscera of snails

The concentrations of metals measured in the viscera of the snail *Helix aspersa*, for both sites, are shown in

Fig. 6(a)–(c). The total content of metals in viscera varied according to the metal and had the following order:

$$[\text{Zn}] > [\text{Pb}] > [\text{Cd}]$$

With regard to Zn, Pb and Cd, reference snails were found to belong to class I of the contamination grid defined by Pihan (2001). For all the transferred snails, the concentrations of Zn, Pb and Cd were significantly higher (ANOVA, $p < 0.05$) than the reference snails. Snails transferred in cages placed at 1 m distance (site 1) and 5 m distance (site 2), from the highway, were the most contaminated by metals, with a significant difference (ANOVA, $p < 0.05$) in comparison to the reference snails.

For site 2, Zn levels (Fig. 6(a)) decreased with increasing distances from the highway. There was no significant difference (ANOVA, $p < 0.05$) between the concentrations on both sides of the highway: the concentrations in the snails transferred at 5 m were $501.26 \pm 113.74 \text{ mg Zn kg}^{-1} \text{ DW}$ at W5 and $510.8 \pm 107.2 \text{ mg Zn kg}^{-1} \text{ DW}$ at E5 (contamination class III) and those in the snails transferred at 20 to 320 m ranged between 200.1 and $283.4 \text{ mg Zn kg}^{-1} \text{ DW}$ (class II). In site 1, the concentration of Zn was higher on W1 than on E5 ($418 \text{ mg Zn kg}^{-1} \text{ DW}$ at W1, $306.6 \text{ mg Zn kg}^{-1} \text{ DW}$ at E5) while there was no significant difference (ANOVA, $p < 0.05$) between the concentrations of metals in snails

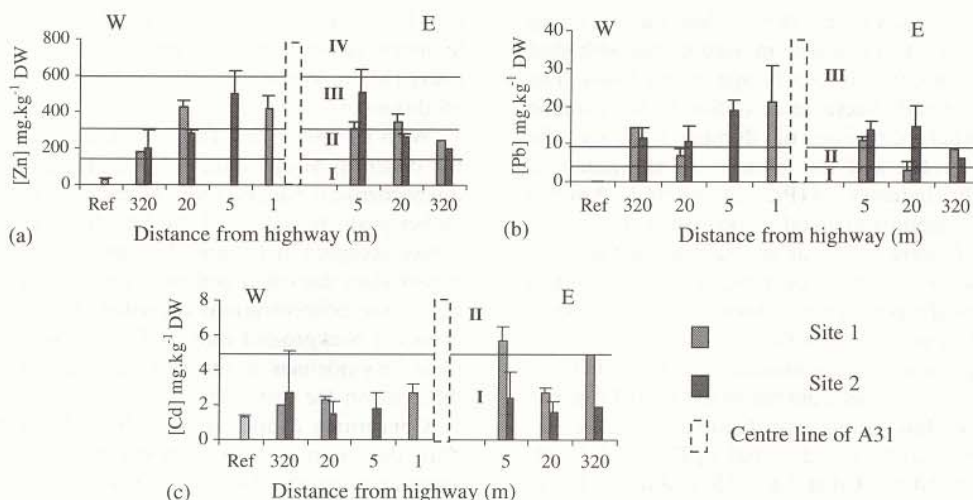


Fig. 6. Concentrations of Zn (a), Pb (b) and Cd (c) in the viscera of the snails *Helix aspersa aspersa*, with standard deviation ($n = 8$), at different distances from the highway A31 between northern France and Luxembourg (Ref: amounts of metals in the reference snails, breed in laboratory; I, II, III, IV: contamination classes according to Pihan (2001)).

placed at 20 m (346 mg Zn kg⁻¹ DW at E20, 429.1 mg Zn kg⁻¹ DW at W20; contamination class III). At 320 m, the concentration in the snails transferred on the east side (246.6 mg Zn kg⁻¹ DW) was significantly higher than the snails transferred on the west side (180.7 mg Zn kg⁻¹ DW).

With regard to lead (Fig. 6(b)), the concentrations decreased with increasing distances from the highway. On site 1, the highest concentration was at 1 m from the highway (21.3 mg Pb kg⁻¹ DW, class III) and thereafter, the levels decreased with increasing distances. Nevertheless, on both sides of site 1, the concentrations reached at 320 m were higher than the concentrations measured in the snails transferred at 20 m. For site 2, the traffic induced contamination up to 20 m: the snails transferred at 5 and 20 m, on both sides, belonged to class III. The snails transferred at 320 m showed concentrations higher on the west side (class III) than on the east side (class II). Up to 20 m, the concentrations were higher in the snails transferred at site 2, compared to those at site 1.

An evolution pattern was not observed for cadmium (Fig. 6(c)), between the two sites, on the west side; transferred and reference snails belonged to the contamination class I. On the other hand, for site 1, there was a significant difference between concentrations on the west side (class I) and concentrations on the east side (class II) at 5 m. On site 2, the levels of cadmium were not significantly different for all the different distances, on two sides.

Owing to recent studies (Scheifler, 2002), bioaccumulation factors (BAF) can be calculated taking into account relative contributions of plants and soil, in

bioaccumulation of metals in the snail viscera. For eight weeks, juvenile snails *Helix aspersa* were fed with lettuce in laboratory conditions, according to two parallel experiments. This author suggests that soil contributes to 40% in the total Cd bioaccumulation, 30% in the total Zn bioaccumulation and 80% in the total Pb bioaccumulation in snail tissues. Taking into account these percentages, the formula used to calculate BAF, for cadmium, is

$$BAF_{Cd} = [Cd] \text{ snails} / (40\% [Cd] \text{ soil} + 60\% [Cd] \text{ plants})$$

It was therefore possible to determinate the mean BAF for each metal, for both sites. The mean BAF ranges between 0.4 and 0.6 for lead (deconcentrator), 6.4 and 8 for zinc (macroconcentrator) and 14.6 and 19.4 for cadmium (macroconcentrator).

4. Discussion

Previous studies (Granier, 1991; Pagotto, 1999) on highway pollution found also that the levels of atmospheric deposits fluctuated according to the metal, with the following order [Zn] > [Pb] > [Cd].

For lead and cadmium, the maximal values measured in our study are 110 µg Pb m⁻² d⁻¹ and 0.9 µg Cd m⁻² d⁻¹, values lower than the previous ones: Hewitt and Rashed (1991) found levels of deposition about 248 µg Pb m⁻² d⁻¹ and 5 µg Cd m⁻² d⁻¹, with a similar device and for a highway with an equivalent traffic. Those differences may be explained, for lead, by the increase in the utilisation of unleaded petrol. The

impact of the highway on the deposit flow was shown up to 320 m (for lead) a distance in accordance with that found in the literature (Piron-Frenet et al., 1994). The deposition of metals fluctuate according to the climatic factors (rainfall, direction of dominant wind), the topographic profile and the intensity of the pollution sources (traffic, industry...) (Promeyrat, 2001). For the two sites, the amounts of metals deposited at the vicinity of the highway were higher on the east side defined like the windside. Excavation profiles, unlike embanked profiles, allow the pollutants to form a deposit close to the highway (Bennouma, 1988).

The comparison with guidelines is very difficult. There are only indicative values from the Swiss OPAIR (Martin et al., 1994) or limit levels from Germany (Dietl et al., 1996) namely $2 \mu\text{g Cd m}^{-2} \text{d}^{-1}$, $100 \mu\text{g Pb m}^{-2} \text{d}^{-1}$, $400 \mu\text{g Zn m}^{-2} \text{d}^{-1}$ and $5 \mu\text{g Cd m}^{-2} \text{d}^{-1}$, $250 \mu\text{g Pb m}^{-2} \text{d}^{-1}$. In the present study, all the Cd values were lower than the indicative values from the Swiss OPAIR or the limit levels defined by Germany. For lead and zinc, the maximal values, reached at 5 m distance, were higher than the limits defined by the Swiss OPAIR or the German ones.

In accordance with many authors (Dierkes and Geiger, 1999; Pagotto, 1999), this study has demonstrated that levels of metals in roadside soils decreased with increasing distances from the highway. Levels of Zn and Pb on the roadside soil may be linked to the traffic intensity, which is in accordance with previous studies (Garcia and Millan, 1998; Ho and Tai, 1988).

Because the variability in sampling and analytical protocols or in the study season, the comparison with literature data concerning the contamination levels of metals in roadside soils is difficult. Levels of lead and cadmium were lower than those observed in earlier studies (Lagerwerff and Specht, 1970; Ho and Tai, 1988) although they were comparable to those recently observed by Garcia and Millan (1998), Pagotto (1999) and Panayotova (2000). Concerning zinc, the levels were comparable to those of previous studies (Ho and Tai, 1988; Narin et al., 1997; Norrström and Jacks, 1998).

The concentrations measured on the surface soil can be compared to the Dutch guidelines (VROM Ministry, 1994): $140 \text{ mg Zn kg}^{-1} \text{ DW}$, $85 \text{ mg Pb kg}^{-1} \text{ DW}$ and $0.8 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ DW}$ and the maximal values authorized in France, concerning the metallic contamination of the soil (Baize, 1997): $300 \text{ mg Zn kg}^{-1} \text{ DW}$, $100 \text{ mg Pb kg}^{-1} \text{ DW}$ and $2 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ DW}$.

For zinc (Fig. 4(a)), the levels measured in the site 1 were higher than the mean pedogeochemical background for all distances on both sides, excepted for E80. On the west side of site 2, the levels were higher than the mean pedogeochemical background for all the distances whereas, on the east side, Zn at 5 m distance exceeded the background value. On site 1, the maximal values authorized in France were exceeded only at E1, whereas

the Dutch guidelines were exceeded on both sides of the highway. In site 2, the concentrations were significantly lower (Mann-Whitney, $p < 0.05$) than the guidelines for all distances.

With regard to lead (Fig. 4(b)), at 1 m (both sides), the observed levels were, not only higher than the pedogeochemical background ($44 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$), but also higher than the values of the Dutch guidelines and the values accepted in France. At 5 m, the levels were also higher than the mean pedogeochemical background. In site 2, the concentrations exceeded the mean pedogeochemical background only at E5 and W5, being lower than the guidelines on the west side and not significantly different on the east side.

Concerning cadmium (Fig. 4(c)), levels were lower than the mean pedogeochemical background on both sides and for the two sites. The highest value ($1.15 \text{ mg kg}^{-1} \text{ DW}$) was observed at 1 m from the highway on the east side of site 1. On one hand, according to the Dutch guidelines, this value was higher than the usual value ($0.8 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ DW}$) observed in the soil. However, Cd values measured on both sides of the two sites were below the maximum values accepted in France ($2 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ DW}$).

The impact of the highway was clearly shown up to 320 m (for lead), a distance in accordance with those found by Piron-Frenet et al. (1994).

The comparison with literature data concerning the contamination levels of metals in plants near highways is also very difficult. The ranges of cadmium and lead, extracted from the Gramineae, were lower than those observed by Rodriguez-Florez and Rodriguez-Castellon (1982) or Ho and Tai (1988) who studied *Chenchrus echinatus*, *Sorghum halopense*, *Paspalum paniculatum* or *Stipa ichu*. Nevertheless, they are similar to the values achieved in recent studies on tobacco leafs (Malbreil, 1997) or herbs, leafs and vegetables (Othman et al., 1997). Concerning zinc, the levels were similar to those of previous studies (Lagerwerff and Specht, 1970; Malbreil, 1997). In comparison to the values owing to subchronical toxicity for cattle, through forages ($0.5 \text{ mg Cd kg}^{-1} \text{ DW}$, $30 \text{ mg Pb kg}^{-1} \text{ DW}$, $100 \text{ mg Zn kg}^{-1} \text{ DW}$, Garcia and Millan, 1998), the concentrations for all metals were less.

For lead, these results were in accordance with previous studies: the levels in Gramineae decreased with increasing distances from the highway; for the two sites and on both sides (Ratcliffe and Beeby, 1984; Othman et al., 1997; Panayotova, 2000). Nevertheless, on site 2, concentrations of Pb, Zn and Cd were similar at the vicinity of the highway and at E320. This was probably due to the impact of a near coal power station. However, the atmospheric deposits do not emphasize an increase in metal deposition on the east side.

For other metals, no evolution pattern was observed. Rodriguez-Florez and Rodriguez-Castellon (1982) ex-

Table 3

Summary of all the results obtained for each compartment tested: comparison between the sites (S2: site 2; S1: site 1), comparison between the sides east and west (E–W)

	Pb	Zn	Cd
Deposits	S2 > S1	S2 > S1	S2 > S1
[Zn] > [Pb] > [Cd]	[E] > [W]	[E] > [W]	[E] > [W]
Soils	S1 > S2	S1 > S2	S1 = S2
[Zn] > [Pb] > [Cd]	[E] = [W] ex 1 m	[E] > [W]	[E] = [W] ex 1 m
Plants	S2 > S1	S2 > S1	S1 > S2
[Zn] > [Pb] > [Cd]	[E] > [W]	[E] > [W]	[W] = [E]
Snails	S2 > S1	S2 > S1	S1 ≥ S2
[Zn] > [Pb] > [Cd]	[W] > [E]	[E] = [W]	[E] > [W]

> Concentration higher; = concentrations equivalent.

plain this as the influence of pH on the bioavailability of metals for plants. For lead deposition, the road impact on the soil was detected only up to 20 m, on both sides of site 1, and up to 40 m, on both sides of site 2. For zinc, no impact distance of the highway could be defined by statistical tests (Wilcoxon, $p < 0.05$). For cadmium, an impact distance was defined only for site 1 up to 20 m on both sides of the highway. These distances are comparable to those observed in previous studies (Ward et al., 1977; Rodriguez-Florez and Rodriguez-Castellon, 1982).

Concerning the concentrations of metals in snails, lead seems to be the best trace element to describe the traffic impact; the levels reached in site 2 (60 000 vehicles per day) were higher than the levels obtained for site 1 (40 000 vehicles per day), with maximal concentration near the highway (19 mg Pb kg⁻¹ at W5: class III). In a recent study, Gomot de Vaufleury and Pihan (2000) placed snails in an urban site, near a very busy crossroad for four weeks and found higher levels of lead than in our study (74 mg kg⁻¹ DW: class IV). The concentrations of zinc were higher in snails transferred in site 2 (concentrations between 200 and 510.8 mg Zn kg⁻¹ DW: classes II to III) than in snails transferred in site 1 (concentrations between 180.7 and 418 mg Zn kg⁻¹ DW: classes II to III). For cadmium, the concentrations were higher in snails transferred in site 1 (concentrations between 2 and 5.7 mg Cd kg⁻¹ DW: classes I to II) than in snails transferred in site 2 (concentrations between 1.5 and 2.7 mg Cd kg⁻¹ DW: class I).

The contamination table established by Berger and Dallinger (1993) classifies the snails transferred at 1 or 5 m from the highway in class 1 for cadmium, in class 2 for lead and in class 3 (at maximum) for zinc. According to these authors, class 1 corresponds to the “controls”, class 2 corresponds to “traffic and cities” and the last class corresponds to “smelters and mines”. So it is confirmed that lead describes the traffic impact.

According to the classification proposed by Dallinger (1993), *Helix aspersa* is a deconcentrator of lead

(BAF < 1) and a macroconcentrator of zinc and cadmium (BAF > 2). The mean BAF calculated for Cd correspond to those obtained by Gomot de Vaufleury and Pihan (2002) although higher than those for Pb and Zn.

Results for the different compartments, at the vicinity of the highway, are resumed in Table 3. Comparisons between sites and sides of the highway are presented. With regards to lead, results concerning deposits, soils, plants and snails exhibited the same pattern. Indeed, the levels in site 2 were higher, or equivalent, than those in site 1, the values were the highest on the east side of the highway (windside) and, finally, the levels of lead decreased with increasing distances from the highway. Lead seems therefore to be an effective tracer of traffic and highway contamination. Moreover, owing to the ²⁰⁶Pb/²⁰⁷Pb ratio, it would be possible to identify the sources natural (local natural Pb background) or anthropogenic: the Pb added to gasoline could be identified because of its specific ²⁰⁶Pb/²⁰⁷Pb ratios of 1.069–1.094 (Monna et al., 2000). For zinc and cadmium, the behaviours are different according to the compartment used and they are useful to highlight particularities of the highway environment. For example, the concentrations of Zn were higher in the roadside soils and in the viscera of snails for site 1 than those for site 2. Plants have shown concentrations higher on the west side of the highway, side where a wire netting was located. Agricultural practices are highlighted with higher concentrations of Cd, on the east side of site 1 than for site 2.

5. Conclusion

The highway induces a contamination on the nearer environment by a pollutant transfer via the atmospheric fallouts. The deposition of metals, the levels of metals in surface soil, plants and snails decrease with increasing distances from the highway. Nevertheless, while the

impact of the highway was clear up to 320 m, at least (lead), the most important contamination was observed near the road. Lead seems to be the most adapted tracer of highway contamination. The snail and the plant bioaccumulation results enable us to understand the metal bioavailability in the environment.

With the increasing use of unleaded petrol, the lead levels tend to decrease regularly and therefore another tracer should be identified in order to assess the road transport contamination, like platinum of catalytic silencers or some additives in unleaded petrol like MTBE (methyltertobuthylether), ETBE (ethyltertobuthylether), TAME (methyltertioamylether), for example.

Acknowledgements

The authors thank Mr. Boudot (CPB-Nancy), Mr. Carsignol (CETE Est-Metz) for their assistance during the experiment and the SETRA (Paris) for his financial support.

References

- ATSDR, 1994. Toxicological profile for zinc. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- ATSDR, 1999a. Toxicological profile for cadmium. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- ATSDR, 1999b. Toxicological profile for lead. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA.
- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA, Collection Un point sur..., Paris, 408p.
- Bennouma, K., 1988. Etude de l'émission et modélisation des polluants d'origine automobile, Thèse de docteur-ingénieur en chimie de la pollution atmosphérique et physique de l'environnement, Paris VII.
- Berger, B., Dallinger, R., 1993. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environ. Monitor. Assess.* 25, 65–84.
- Boudot, J.P., Rouiller, J., Burtin, G., 1998. Pollution atmosphérique: caractérisation de la contamination des sols et des végétaux par les métaux lourds et les hydrocarbures, rapport du Centre de Pédologie Biologique, Nancy, 13p.
- Brooks, A.W., White, K.N., Bailey, S.E.R., 1992. Accumulation and excretion of aluminium and iron by the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Comp. Biochem. Physiol.* 103C, 577–583.
- Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C., Ruedel, H., 2003. Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability and risk. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 25, 45–51.
- Dallinger, R., 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Dallinger, R., Rainbow, P.S. (Eds.), *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. Lewis Publisher, Boca Raton, FL, pp. 246–332.
- Dierkes, C., Geiger, W.F., 1999. Pollution retention capabilities of roadside soils. *Water Sci. Technol.* 39 (2), 201–208.
- Dietl, C., Waber, M., Peichl, L., Vierle, O., 1996. Monitoring of airborne metals in grass and deposition. *Chemosphere* 33 (11), 2101–2111.
- García, R., Millan, E., 1998. Assessment of Cd, Pb and Zn contamination in roadside soils and grasses from Gipuzkoa (Spain). *Chemosphere* 37 (8), 1615–1625.
- García, R., Maiz, J., Millan, E., 1996. Heavy metal contamination analysis of roadside soils and grasses from Gipuzkoa (Spain). *Environ. Technol.* 17, 763–770.
- Gomot de Vaufléury, A., Pihan, F., 2000. Growing snails used as sentinels for the evaluation of terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere* 40, 275–284.
- Gomot de Vaufléury, A., Pihan, F., 2002. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral and dermal uptake in land snails: metal bioavailability and bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 (4), 820–827.
- Granier, L., 1991. Apport atmosphérique en organochlorés à l'hydrosphère—comparaisons avec les métaux lourds. Thèse doctorat Université, Science et technique pollution, Paris 6.
- Gromov, S., Emelina, E., 1994. Lead emission evaluation over the European part of the former Soviet Union. *Sci. Total Environ.* 158, 135–137.
- Harrison, R.M., Johnston, W.R., 1985. Deposition fluxes of lead, cadmium, copper and polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) on the verges of a major highway. *Sci. Total Environ.* 46, 121–135.
- Hewitt, C.N., Rashed, M.B., 1991. The deposition of selected pollutants adjacent to a major rural highway. *Atmos. Environ.* 25 (5–6), 979–983.
- Ho, Y.B., Tai, K.M., 1988. Elevated levels of lead and other metals in roadside soil and grass and their use to monitor aerial metal depositions in Hong Kong. *Environ. Pollut.* 49, 37–51.
- Lagerwerff, J.V., Specht, A.W., 1970. Contamination of roadside soil and vegetation with cadmium, nickel, lead and zinc. *Environ. Sci. Technol.* 4 (7), 583–586.
- Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1995. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snails (*Helix aspersa aspersa*): implication for predators. *Environ. Pollut.* 91 (3), 289–297.
- Malbreil, N., 1997. La pollution en bordure d'autoroute et son impact sur la végétation, DESS Ressources Naturelles et Environnement, Université de Metz, 56p.
- Martin, M., Robin, D., Haerdi, W., 1994. Les feuilles de chêne, bioindicateur des émissions en métaux lourds—Application au voisinage d'une usine d'incinération d'ordures (2ème partie). *Arch. Sci.—Genève* 47 (1), 51–60.
- Monna, F., Clauer, N., Toulkeridis, T., Lancelot, J.R., 2000. Influence of anthropogenic activity on the lead isotope signature of Thau Lake sediments (southern France): origin and temporal evolution. *Appl. Geochem.* 15 (9), 1291–1305.
- Narin, I., Soylak, M., Dogan, M., 1997. Traffic pollution in Nidge-turkiye: investigation of trace element contents of soils samples. *Fresenius Environ. Bull.* 6, 749–752.
- NF X31-147, 1996. Qualité des sols—sols, sédiments—Mise en solution totale par attaque acide, 12p.

- Norrström, A.C., Jacks, G., 1998. Concentration and fractionation of heavy metals in roadside soils receiving de-icing salts. *Sci. Total Environ.* 218, 161–174.
- Othman, I., Al Oudat, M., Al Masri, M.S., 1997. Lead levels in roadside soils and vegetation of Damascus city. *Sci. Total Environ.* 207, 43–48.
- Pagotto, C., 1999. Etude sur l'émission et le transfert dans les eaux et les sols des éléments traces métalliques et des hydrocarbures dans le domaine routier. Thèse de doctorat de l'Université de Poitiers, Discipline: chimie et microbiologie de l'eau, 316p.
- Panayotova, M., 2000. Assessment of lead pollution caused by vehicles emission in a highly inhabited region of Sofia, Bulgaria. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 35 (9), 1693–1700.
- Pihan, F., 2001. Caractérisation de Mollusques Gastéropodes Terrestres en tant que Bioindicateurs de la Contamination Polymétallique (Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Cu, Cd et Pb), Thèse de doctorat de l'Université de Metz, spécialité Ecotoxicologie, 450p.
- Pihan, F., de Vaufleury, A., 2000. The snail as a target organism for the evaluation of industrial waste dump contamination and the efficiency of its remediation. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 46, 137–147.
- Piron-Frenet, M., Bureau, F., Pineau, R., 1994. Lead accumulation in surface roadside soil: its relationships to traffic density and meteorological parameters. *Sci. Total Environ.* 144, 297–304.
- Promeprat, S., 2001. Contribution à l'étude de la pollution atmosphérique. Caractérisation des flux de déposition et de la contamination métallique de l'environnement de proximité, Thèse de Doctorat de l'Université de Metz, spécialité Ecotoxicologie, 207p.
- Ratcliffe, D., Beeby, A.N., 1984. Monitoring roadside lead deposition by sampling vegetation—some problems of interpretation. *Sci. Total Environ.* 33, 103–112.
- Rodriguez-Florez, M., Rodriguez-Castellon, E., 1982. Lead and cadmium levels in soil and plants near highways and their correlation with traffic density. *Environ. Pollut. (Series B)* 4, 281–290.
- Scheifler, R., 2002. Evaluation de la biodisponibilité et des transferts de polluants métalliques et organiques dans des réseaux trophiques “sols-plantes-invertébrés”, Thèse de doctorat de l'Université de Franche-Comté, spécialité Sciences de la vie, 187p.
- Siegel, S., 1956. The Case of Two Independent Samples in Nonparametric Statistics, International Student Edition. McGraw-Hill, Auckland.
- Sloof, J.F., 1995. Lichens as quantitative biomonitors for atmospheric trace-element deposition, using transplant. *Atmos. Environ.* 29 (1), 333–343.
- Swaleh, K.M., Rabay'a, N., Salim, R., Ezzughayyar, A., Rabbo, A.A., 2001. Concentrations of heavy metals in roadside soils, plants, and landsnails from the West Bank, Palestine. *J. Environ. Sci. Health, Part A: Toxic/Hazard. Subst. Environ. Eng.* 36 (5), 765–778.
- Turer, D.G., Maynard, B.J., 2003. Heavy metal contamination in highway soils. Comparison of Corpus Christi, Texas and Cincinnati, Ohio shows organic matter is key to mobility. *Clean Technol. Environ. Policy* 4 (4), 235–245.
- Von Storch, H., Costa-Cabral, M., Hagner, C., Feser, F., Pacyna, J., Pacyna, E., Kolb, S., 2003. Four decades of gasoline lead emissions and control policies in Europe: a retrospective assessment. *Sci. Total Environ.* 311 (1–3), 151–176.
- VROM Ministry, 1994. Intervention values and target values—soil quality standards. La Haye, Circular, 9 Mai 1994, 19p.
- Ward, N.I., Brooks, R.R., Roberts, E., Boswell, C.R., 1977. Heavy metal pollution from automotive emissions and its effect on roadside soils and pasture species in New Zealand. *Environ. Sci. Technol.* 11 (9), 917–920.
- Zhang, H., Ma, D., Xie, Q., Chen, X., 1999. An approach to studying heavy metal pollution caused by modern city development in Nanjing, China. *Environ. Geol.* 38 (3), 223–228.

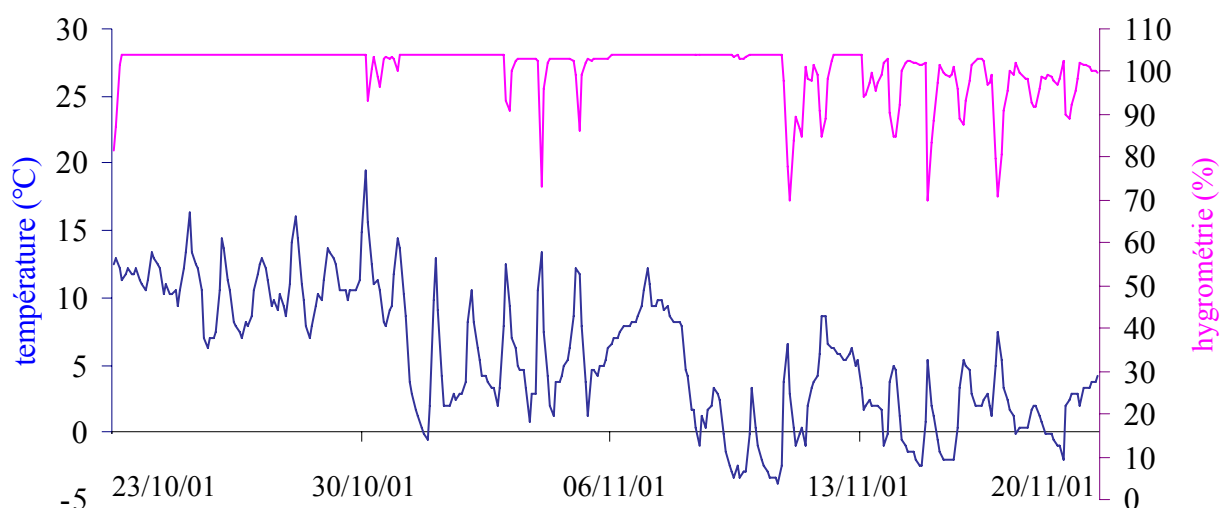
D'après ces résultats, il apparaît évident que, pour mener à bien une expérience de biosurveillance, tous les compartiments doivent être intégrés. Seules les conditions climatiques pourraient alors interférer dans l'analyse des résultats obtenus et elles méritent donc d'être étudiées précisément.

CHAPITRE II DEFINITION DES CONDITIONS D'EMPLOI *IN SITU*, DES MICROCOSMES ELABORES, EN FONCTION DES VARIATIONS SAISONNIERES

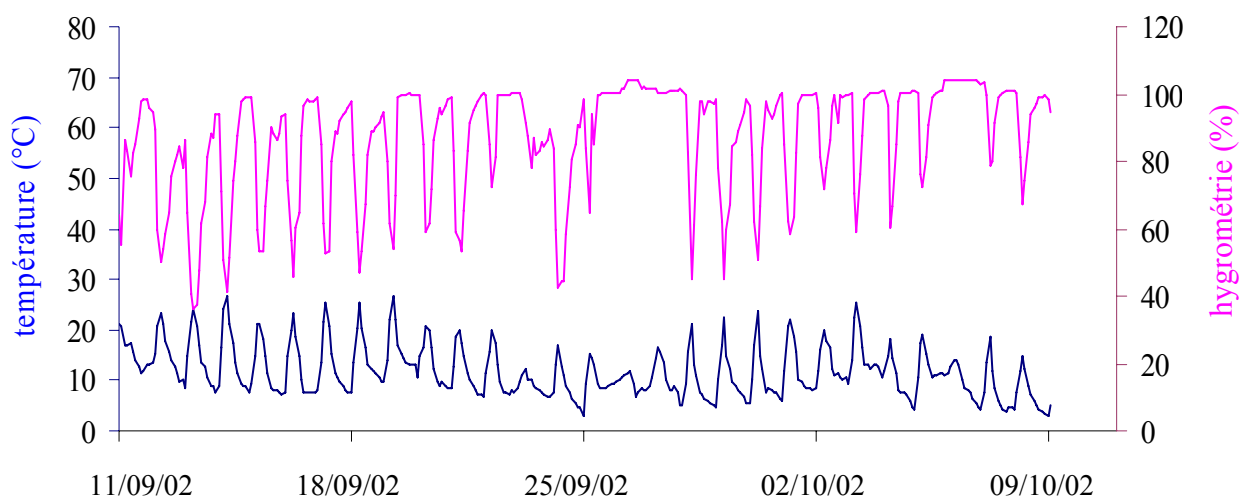
Dès 2001 et suite aux conclusions du plan expérimental réalisé, du trèfle a été semé sur plusieurs sites, dont celui de CEDILOR. Depuis, chaque année des escargots sont transférés sur le site afin, d'une part, d'appréhender l'influence de la température sur la croissance et l'accumulation des métaux dans les escargots et, d'autre part, de suivre l'évolution des niveaux en éléments métalliques dans les sols environnant l'usine.

II.1. Enregistrement de la température et de l'hygrométrie

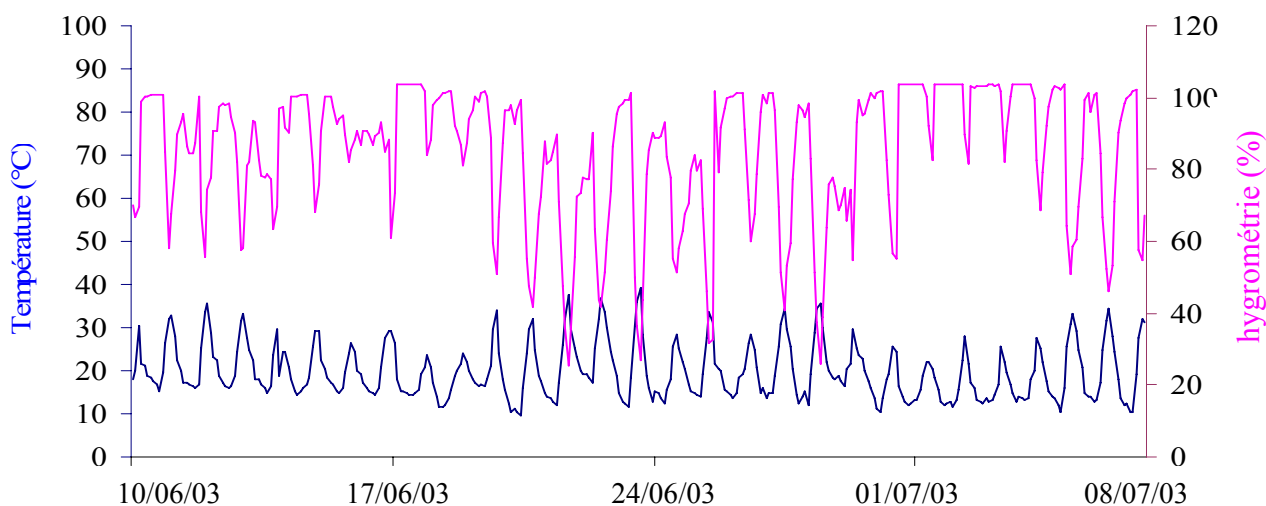
Grâce aux enregistreurs de température ($T^{\circ}\text{C}$) et d'hygrométrie (H %), les données sont enregistrées sur les sites toutes les deux heures. Les évolutions de ces paramètres environnementaux sont présentées sur la Figure 18 a), b) et c).



a) Evolution de la température et de l'hygrométrie en octobre et novembre 2001



b) Evolution de la température et de l'hygrométrie en septembre et octobre 2002



c) Evolution de la température et de l'hygrométrie en juin et juillet 2003

Figure 18 : Evolution de la température et de l'hygrométrie au cours des expériences menées à CEDILOR en 2001, 2002 et 2003 ([température](#) ; [hygrométrie](#))

Les températures enregistrées en 2001 varient de $-3,9$ à $19,4^{\circ}\text{C}$ (avec une moyenne de $5,6^{\circ}\text{C}$), en 2002, de $2,9$ à $26,7^{\circ}\text{C}$ (avec une moyenne de $11,8^{\circ}\text{C}$) et en 2003 de 16 à 36°C (avec une moyenne de $17,5^{\circ}\text{C}$), ce qui représente un gradient de températures variant de $5,6^{\circ}\text{C}$ à $17,5^{\circ}\text{C}$, proche de l'optimum de 20°C (Gomot, 1994). En ce qui concerne l'hygrométrie, la bougie poreuse installée maintient une hygrométrie moyenne entre $73,8$ et 100% , au cours des trois expériences, conforme aux préférences définies par Gomot (1994) pour obtenir une croissance optimale.

En ce qui concerne la photopériode, la croissance optimale est observée sous 18 heures de lumière et 6 heures d'obscurité ($18\text{L}/6\text{O}$). Au cours des expériences réalisées en 2001, 2002 et 2003, les

escargots ont disposé de périodes d’obscurités croissantes, avec les nuits les plus courtes en 2003 et les plus longues en 2001. Dans tous les cas, les nuits sont plus longues que les 6 heures d’obscurité préconisées en laboratoire. Cette photopériode différente peut influencer les cycles d’activité et de repos des escargots.

II.2. Evolution de la croissance pondérale et du diamètre (Annexe 6)

Chaque semaine, les escargots sont pesés et mesurés individuellement. L’évolution du poids moyen des escargots placés dans chaque microcosme est représentée sur les Figures 19 a (2001), b (2002) et c (2003), juxtaposées à l’évolution des diamètres moyens sur la même période, représentée sur les Figures 19 d (2001), e (2002) et f (2003).

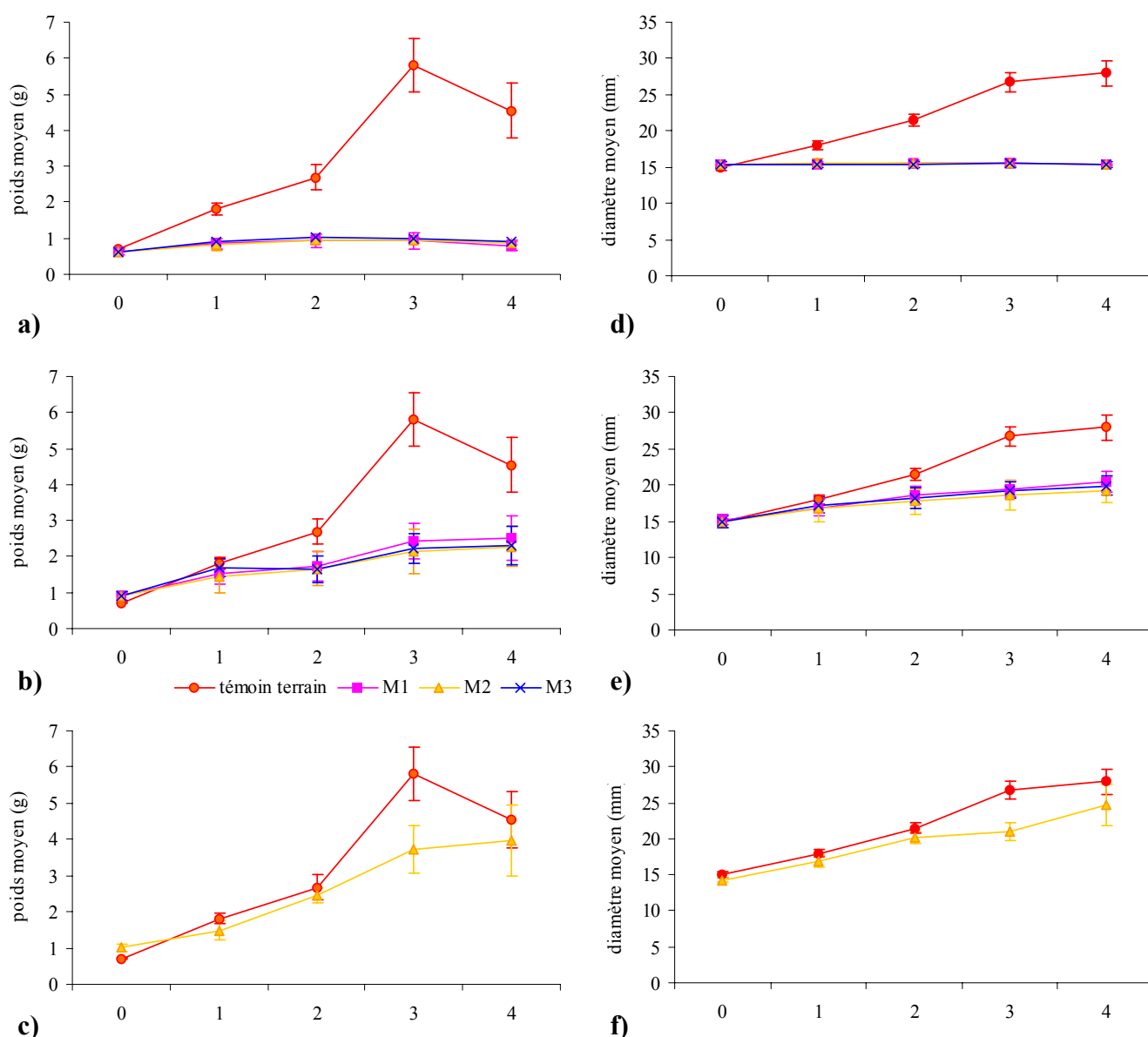


Figure 19 : Evolution du poids moyen des escargots transférés dans les microcosmes en 2001 (a), 2002 (b) et 2003 (c) et de leur diamètre moyen en 2001 (d), 2002 (e) et 2003 (f).

Les poids et les diamètres moyens ne présentent aucune différence significative entre les trois microcosmes que cela soit pour 2001 ou 2002. En 2003, les fortes chaleurs ont favorisé le développement de fourmilières à proximité du lieu d'implantation des microcosmes et occasionné ainsi une prédation des escargots par les fourmis. Seuls les escargots transférés dans le microcosme 2 ont survécu, les escargots des microcosmes 1 et 3 ayant été décimés durant les deux premières semaines. C'est pourquoi, seuls le poids et le diamètre moyens des escargots transférés dans M2 sont indiqués sur la figure 19 c et f.

Au début de l'expérience, les lots d'escargots transférés en 2001 présentent un poids moyen de 0,62 +/- 0,04g, significativement inférieur au poids moyen des escargots transférés en 2002 et 2003, qui pèsent 0,90 +/- 0,11 et 0,99 +/- 0,10 g respectivement. Après quatre semaines, le poids moyen des escargots transférés en 2001 est multiplié par 1,38, en 2002 par 2,63 et en 2003 par 4,02.

Le diamètre moyen des escargots transférés en 2001 n'évolue pas de manière significative pendant l'expérience : après quatre semaines, les escargots présentent un diamètre moyen de 15,31 mm, identique à celui de départ. Par contre, en 2002 et en 2003, les escargots transférés multiplient leur diamètre moyen par 1,32 et 1,76 respectivement.

Par comparaison, les escargots témoins pèsent 0,71 +/- 0,02 g, pour un diamètre moyen de 14,96 mm ; en quatre semaines, ils multiplient leur poids moyen par 6,4 et leur diamètre moyen par 1,87. Lors de leur transfert sur le site témoin, la température moyenne enregistrée était de 20.9°C et l'hygrométrie moyenne de 82.3%, toutes deux conformes aux préférences de températures définies par Gomot (1994). C'est pourquoi, les escargots témoin terrain présentent une croissance importante.

II.3. Accumulation en métaux lourds dans les escargots

Au bout de quatre semaines d'exposition, cinq escargots de chaque microcosme sont mis à jeûner et congelés avant leur analyse en SAA. Seules les concentrations mesurées dans les viscères sont présentées dans cette partie, les concentrations présentes dans le pied des escargots étant toujours inférieures à celles des viscères. Toutefois, les concentrations dans le pied des escargots ainsi que les données concernant chacun des microcosmes sont regroupées en Annexe 6.

II.3.1 En 2001

Les concentrations en cuivre, fer, zinc, manganèse, nickel, cadmium, chrome et plomb, mesurées dans les viscères des escargots transférés en 2001 et des témoins labos et terrain, sont présentées sur la Figure 20, par rapport aux seuils des grilles de contamination définies par Pihan (2001).

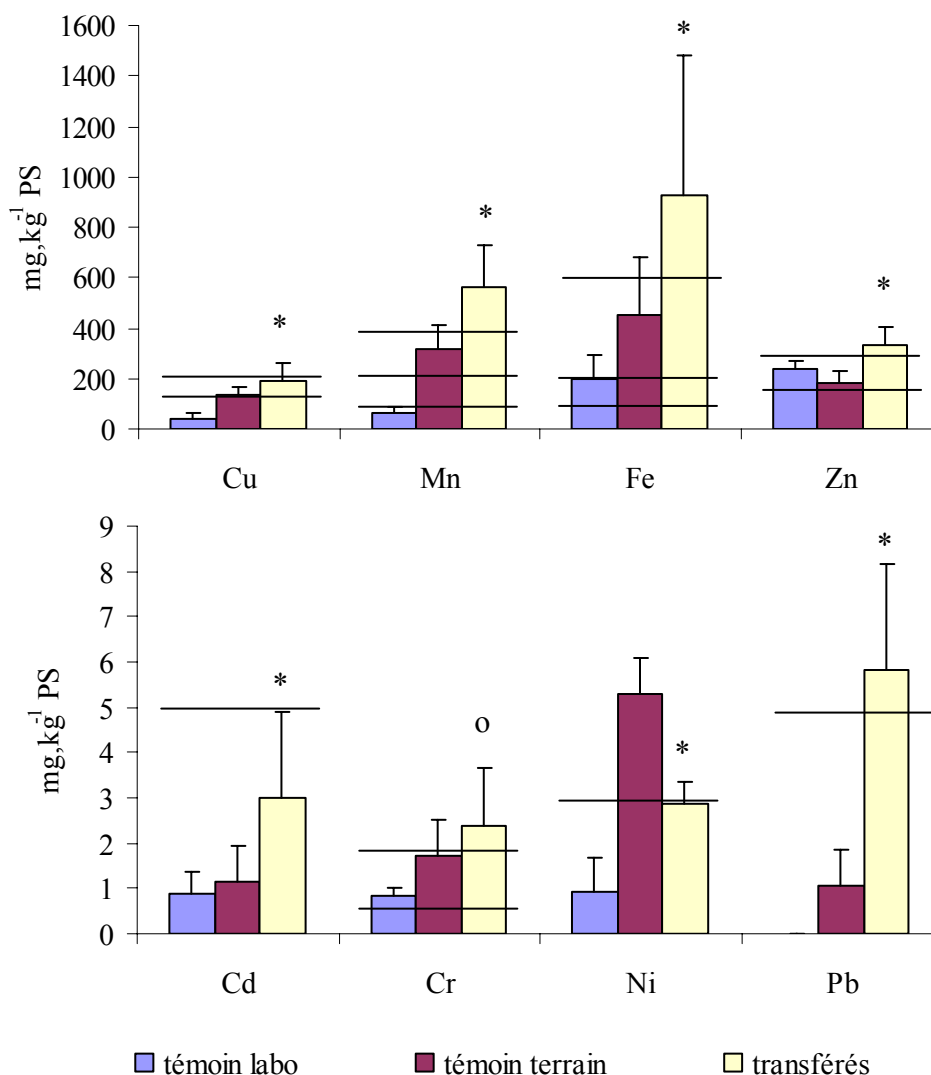


Figure 20 : Concentrations en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés en 2001 et des escargots témoins placés en laboratoire (témoin labo) ou sur un site de contrôle (témoin terrain), exprimées en mg.kg⁻¹ de poids sec, positionnées par rapport aux limites des classes de contamination établies par Pihan (2001). * : concentrations des transférés significativement différentes des concentrations des témoins labo *et* terrain ; o : concentrations des transférés significativement différentes des concentrations des témoins labo (Mann Whitney, $p < 0.05$)

Malgré les températures basses et leur faible taux de croissance, les escargots transférés ont accumulé des éléments métalliques dans leur organisme ce qui traduit leur présence dans l'environnement. En effet, par rapport aux concentrations mesurées dans les viscères des témoins labo et terrain, les concentrations en Cu, Mn, Fe, Zn, Cd et Pb sont significativement supérieures ($p < 0.05$) dans les escargots transférés sur le site de CEDILOR. Dans le cas du nickel, les concentrations mesurées dans les viscères des escargots transférés sont significativement inférieures à celles des témoins terrain et significativement supérieures à celles des témoins labo ($p < 0.05$). Les concentrations en chrome dans les escargots transférés sont significativement supérieures à celles

des témoins labo mais non significativement différentes des concentrations dans les témoins terrain ($p < 0.05$).

Les grilles de contamination des viscères définies par Pihan (2001) permettent d'établir l'indice global de contamination polymétallique IGCPM du site en 2001, par sommation des classes de contamination obtenues pour chacun des éléments métalliques (Tableau 28).

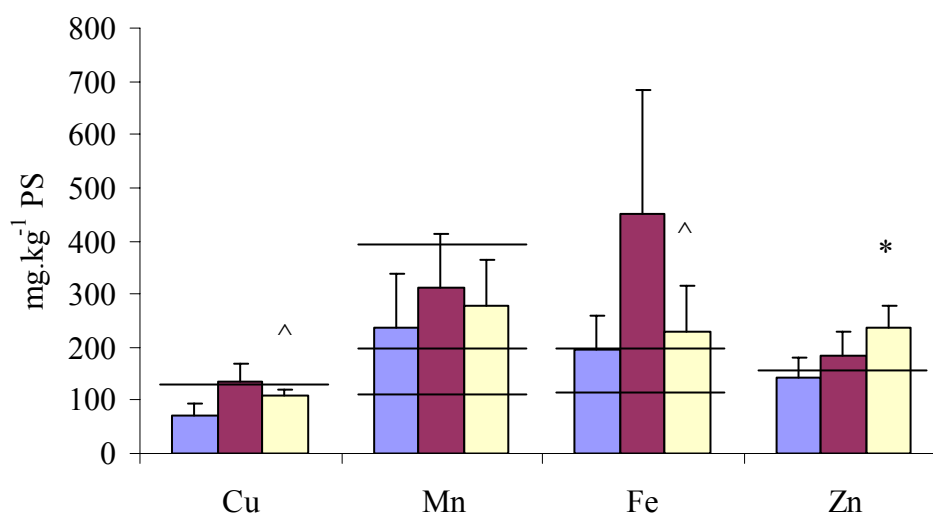
Tableau 28 : IGCPM du site de CEDILOR en 2001

	Cu	Mn	Fe	Zn	Ni	Cd	Pb	Cr	IGCPM
témoin labo	I	I	II	II	I	I	I	II	11
témoin terrain	II	III	III	II	II	I	I	II	16
transférés	II	IV	IV	III	I	I	II	III	20

Les escargots transférés présentent un niveau d'accumulation des éléments métalliques supérieur à celui des témoins.

II.3.2. En 2002

Les concentrations en cuivre, fer, zinc, manganèse, nickel, cadmium, chrome et plomb, mesurées dans les viscères des escargots transférés en 2002 et des témoins labo et terrains, sont présentées sur la Figure 21, par rapport aux seuils des grilles de contamination définis par Pihan (2001).



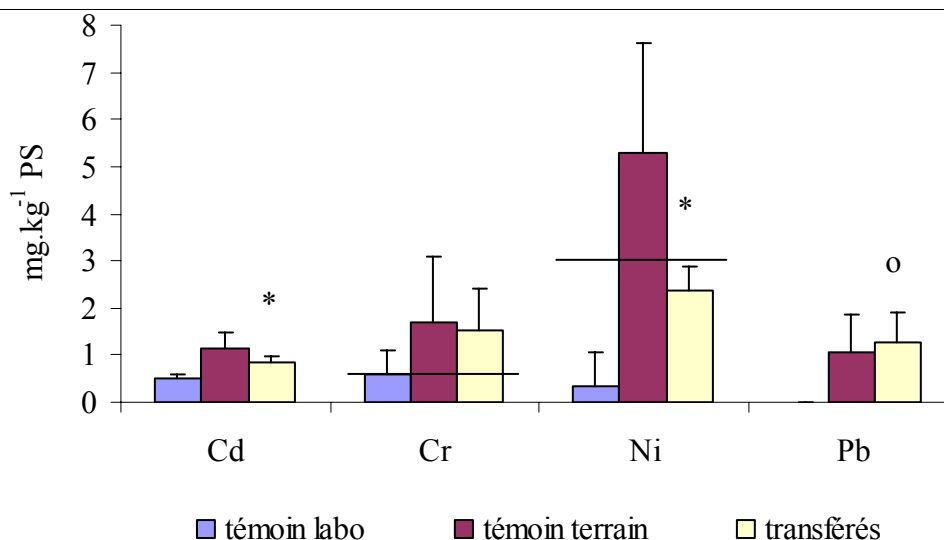


Figure 21 : Concentrations en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés en 2002 et des escargots témoins placés en laboratoire (témoin labo) ou sur un site de contrôle (témoin terrain), exprimées en mg.kg^{-1} de poids sec, positionnées par rapport aux limites des classes de contamination établies par Pihan (2001). * : concentrations des transférés significativement différentes des concentrations des témoins labo et terrain ; o : concentrations des transférés significativement différentes des concentrations des témoins labo ; ^ : concentrations des transférés significativement différentes des concentrations des témoins terrain (Mann Whitney, $p < 0.05$)

Les concentrations en zinc dans les viscères des escargots transférés sont significativement supérieures ($p < 0.05$) à celles mesurées dans les témoins terrain et labo. En ce qui concerne le manganèse et le chrome, aucune différence significative n'existe entre les concentrations dans les escargots transférés, les témoins labo et terrain. Les concentrations en cuivre et en fer dans les escargots transférés sont significativement inférieures ($p < 0.05$) à celles des témoins terrain, tout en étant non significativement différentes des concentrations retrouvées dans les témoins labo. L'inverse se produit pour le plomb pour lequel les concentrations mesurées dans les viscères des escargots transférés ne sont pas significativement différentes des concentrations dans les témoins terrain mais elles sont significativement supérieures ($p < 0.05$) à celles des témoins labo. Les concentrations en nickel et en cadmium dans les viscères des escargots transférés sont significativement supérieures à celles mesurées dans les viscères des témoins labo et significativement inférieures à celles retrouvées dans les témoins terrain ($p < 0.05$).

Les grilles de contamination des viscères définies par Pihan (2001) permettent d'établir l'indice global de contamination polymétallique IGCPM du site en 2002 (Tableau 29).

Tableau 29 : IGCPM du site de CEDILOR en 2002

	Cu	Mn	Fe	Zn	Ni	Cd	Pb	Cr	IGCPM
témoin labo	I	III	II	I	I	I	I	I	11
témoin terrain	II	III	III	II	II	I	I	II	16
transférés	I	III	III	II	I	I	I	II	14

Les escargots transférés présentent un indice global de contamination supérieur à celui des témoins restés en laboratoire, mais inférieur à celui des escargots placés sur le site contrôle. L'indice global de contamination des témoins labo de cette expérience est identique à celui des témoins labo 2001. Toutefois, pour cette expérience, les témoins labo appartiennent à la classe III de contamination pour le manganèse alors qu'en 2002, les témoins labo appartiennent à la classe I. En ce qui concerne le zinc et le chrome, en 2001 les témoins labo appartiennent à la classe II et en 2002, ils appartiennent à la classe I.

II.3.3. En 2003

Les concentrations en cuivre, fer, zinc, manganèse, nickel, cadmium, chrome et plomb, mesurées dans les viscères des escargots transférés en 2003 et des témoins, sont présentées sur la Figure 22, par rapport aux seuils des grilles de contamination définis par Pihan (2001).

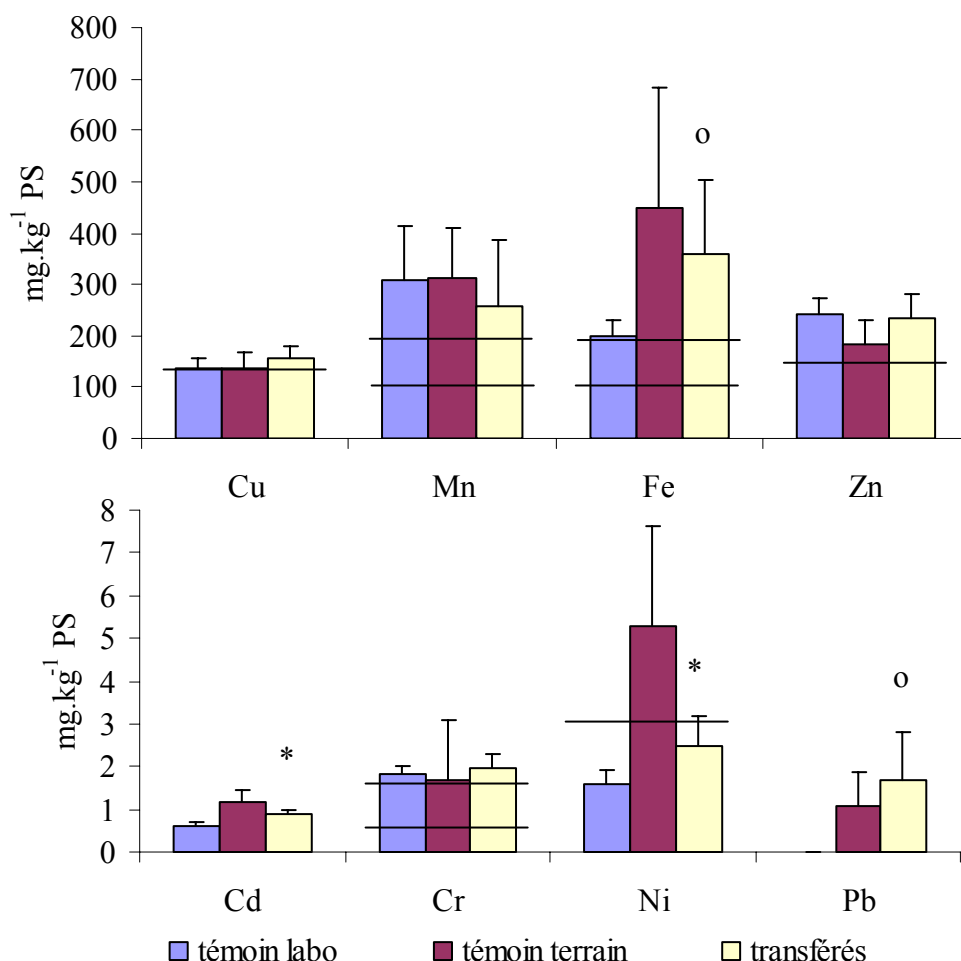


Figure 22 : Concentrations en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés en 2003 et des escargots témoins placés en laboratoire (témoin labo) ou sur un site de contrôle (témoin terrain), exprimées en mg.kg⁻¹ de poids sec, positionnées par rapport aux limites de classes de contamination élaborées par Pihan (2001). * : concentrations des transférés significativement différentes des concentrations des témoins labo et terrain ; o : concentrations des transférés significativement différentes des concentrations des témoins labo (Mann Whitney, $p < 0.05$)

Les concentrations en Cu, Mn, Zn et Cr dans les viscères des escargots transférés ne sont pas significativement différentes des concentrations mesurées dans les témoins labo et terrain. Dans le cas du fer et du plomb, les concentrations retrouvées dans les viscères des escargots transférés sont d'une part, significativement supérieures ($p < 0.05$) à celles mesurées dans les témoins labo et d'autre part, non significativement différentes de celles des témoins terrain. Quant aux concentrations en cadmium et en nickel, elles sont significativement supérieures ($p < 0.05$) aux concentrations retrouvées dans les témoins labo mais elles sont significativement inférieures ($p < 0.05$) à celles mesurées dans les témoins terrain.

Les grilles de contamination des viscères définies par Pihan (2001) permettent d'établir l'indice global de contamination polymétallique IGCPM du site en 2003 (Tableau 30).

Tableau 30 : IGCPM du site de CEDILOR en 2003

	Cu	Mn	Fe	Zn	Ni	Cd	Pb	Cr	IGCPM
témoin labo	II	III	II	II	I	I	I	III	15
témoin terrain	II	III	III	II	II	I	I	II	16
transférés	II	III	III	II	I	I	I	III	16

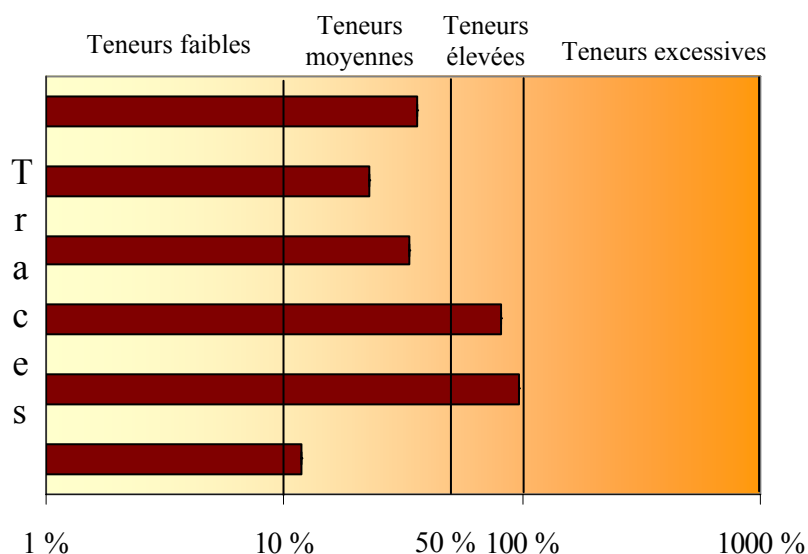
L'indice global de contamination des escargots transférés n'est pas différent de celui des témoins labo ou terrain. Les témoins labo, obtenus au cours de cette expérience, présentent un indice global de contamination supérieur à celui des témoins labo de 2001 et 2002.

II.4. Teneurs en métaux lourds dans les différents compartiments des microcosmes

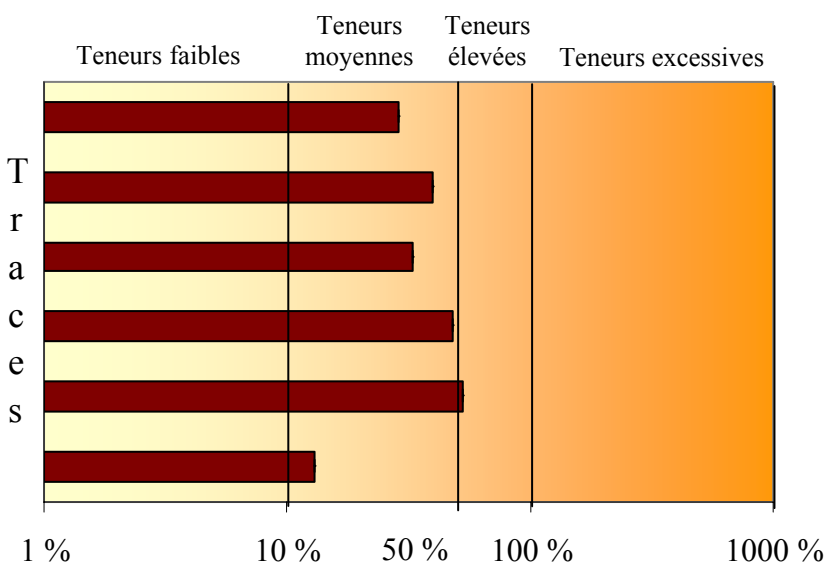
II.4.1. Le sol

Les concentrations en éléments métalliques ont été déterminées dans le sol présent à l'intérieur des microcosmes. Deux méthodes distinctes ont été utilisées afin, d'une part, de déterminer les teneurs totales en EM présentes dans le sol grâce à une extraction à l'eau régale, et d'autre part, d'estimer la quantité d'éléments métalliques dite disponible pour les organismes par une extraction à l'EDTA. Les figures suivantes présentent les concentrations totales en métaux, mesurées dans le sol de CEDILOR en 2001, 2002 et 2003, par rapport aux seuils à ne pas dépasser, fixés par la norme AFNOR NF U 44-041 pour les sols agricoles (Figure 23).

2001	Cc dans le sol mg.kg ⁻¹ PS	Seuil AFNOR mg/kg ⁻¹ PS
Cr	54,46	150
Cd	0,46	2
Pb	33,81	100
Ni	40,52	50
Zn	292,39	300
Cu	11,91	100



2002	Cc dans le sol mg.kg ⁻¹ PS	Seuil AFNOR mg/kg ⁻¹ PS
Cr	43,34	150
Cd	0,8	2
Pb	33,13	100
Ni	23,85	50
Zn	159,72	300
Cu	12,92	100



2003	Cc dans le sol mg.kg ⁻¹ PS	Seuil AFNOR mg/kg ⁻¹ PS
Cr	37,84	150
Cd	0,83	2
Pb	29,62	100
Ni	29,23	50
Zn	121,24	300
Cu	22,11	100

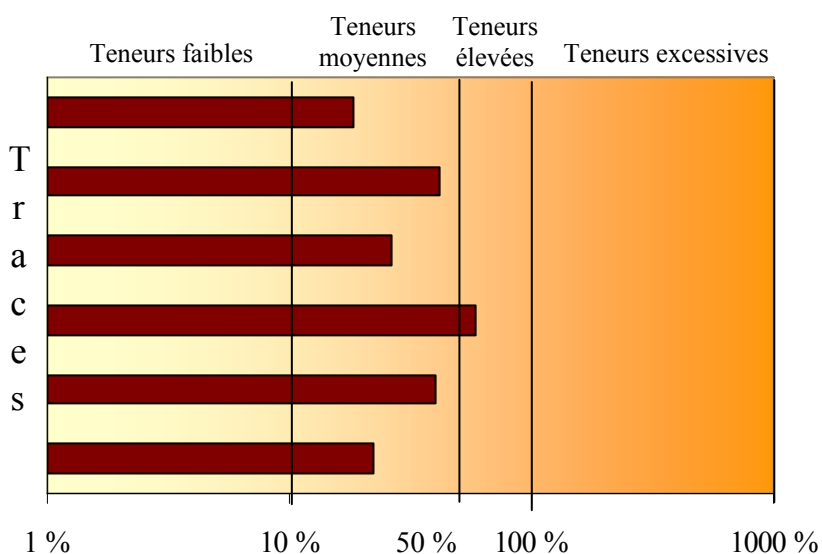


Figure 23 : Teneurs en éléments métalliques, dans le sol du site de CEDILOR, évaluées par rapport au seuil fixé par la norme AFNOR NF U 44-041 (100 % = seuil AFNOR), en 2001, 2002 et 2003

Sur les graphiques de la Figure 23, les concentrations en éléments métalliques mesurées dans le sol sont converties en pourcentages par rapport aux seuils définis par la norme AFNOR NF U 44-041. Ainsi, les EM présents en des quantités inférieures à 1 % du seuil de norme sont dites à l'état de traces ; entre 1 et 10 %, les teneurs en EM sont considérées comme faibles, entre 10 et 50 % comme moyennes et entre 50 et 100 % comme élevées. Une fois le seuil de la norme dépassé, les concentrations rencontrées dans le sol sont alors considérées comme excessives (© AGRO-système). En 2001, le sol de CEDILOR présente des teneurs moyennes en cuivre, cadmium, plomb et chrome, et des teneurs élevées en nickel et zinc, avec une concentration en zinc proche du seuil de la norme AFNOR (292 mg/kg⁻¹ PS). En 2002 et 2003, tous les métaux sont présents à des teneurs moyennes dans le sol, excepté le zinc en 2002 rencontré à des teneurs élevées (159,72 mg/kg⁻¹ PS) et le nickel en 2003 rencontré à des teneurs élevées (29,23 mg.kg⁻¹ PS).

Les concentrations dans le sol du site peuvent aussi être comparées aux seuils en vigueur aux Pays Bas (VROM Ministry, 1997). En 2001, les concentrations en Cr, Cd, Pb et Cu sont inférieures aux seuils d'alerte A alors que les concentrations en Ni et Zn sont comprises entre le seuil d'alerte A et le seuil d'intervention. En 2002, Cr, Pb, Ni et Cu sont présents à des concentrations inférieures au seuil d'alerte A ou équivalente dans le cas du cadmium ; seul le zinc présente une concentration supérieure à ce seuil. En 2003, toutes les concentrations en éléments métalliques sont inférieures au seuil A. Les seuils d'alerte en vigueur aux Pays Bas sont plus exigeants que ceux en vigueur en France : ils laissent apparaître une légère contamination en Ni et Zn en 2001 et en Zn en 2002, alors que, par rapport à la norme NF U 44-041, les seuils d'alerte ne sont jamais dépassés même si le zinc s'en rapproche en 2001 et 2002.

Par rapport aux valeurs de constat d'impact pour les sols à usage non sensible VCIuns (Annexe 7, BRGM, 2002), les concentrations en éléments métalliques dans le sol de CEDILOR sont inférieures aux VCIuns, pour les trois années d'étude.

En ce qui concerne les éléments majeurs, fer et manganèse, aucune réglementation n'existe. Les concentrations en fer et manganèse peuvent atteindre, respectivement, 54600 et 20400 mg.kg⁻¹ PS sur les sols pollués (Van Straalen *et al.*, 2001). Sur le site de CEDILOR, les concentrations en fer sont comprises entre 37834,21 et 51505,84 mg.kg⁻¹ PS et celles en manganèse entre 1055,93 et 1167,95 mg.kg⁻¹ PS : ces valeurs sont donc inférieures aux concentrations rencontrées sur les sites les plus contaminés.

II.4.2. La végétation : le trèfle

Les concentrations en éléments métalliques ont été déterminées dans les plants de trèfle ayant poussé à l'intérieur des microcosmes. Les moyennes des trois microcosmes par année sont représentées sur la Figure 24.

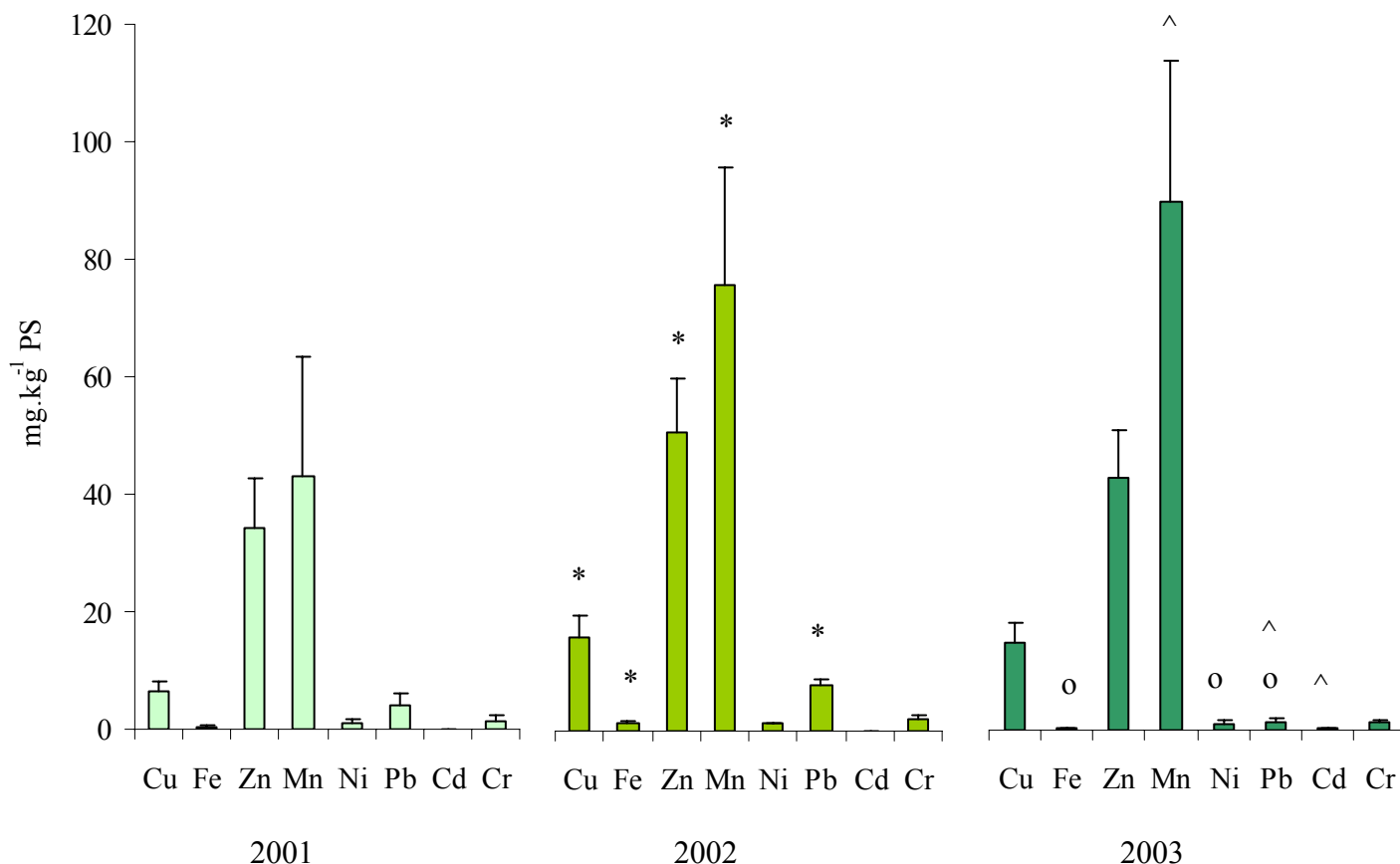


Figure 24 : Concentrations moyennes en éléments métalliques dans le trèfle ayant poussé à l'intérieur des trois microcosmes en 2001, 2002 et 2003 en mg.kg^{-1} PS, sauf pour le fer exprimé en g.kg^{-1} PS. * : concentrations significativement différentes entre 2001 et 2002, o : concentrations significativement différentes entre 2002 et 2003, ^ : concentrations significativement différentes entre 2001 et 2003, pour le métal considéré (Mann Whitney, $p < 0.05$).

Entre 2001 et 2002, les concentrations en Cu, Fe, Zn, Mn et Pb augmentent significativement ($p < 0.05$) dans le trèfle prélevé. Dans le cas du Cd, Ni et Cr, les concentrations n'évoluent pas de manière significative entre 2001 et 2002. Entre 2002 et 2003, les concentrations en Cu, Zn, Mn, Ni et Cr restent stables ; celles de Fe et de Pb diminuent significativement alors que celles de Cd présentent une hausse significative ($p < 0.05$). Ainsi, entre 2001 et 2003, les teneurs en Fe, Ni, Zn et Cr n'évoluent pas de manière significative, les concentrations en Mn et Cd augmentent alors que celles de Pb diminuent significativement ($p < 0.05$).

Les concentrations en éléments métalliques retrouvées dans le trèfle correspondent aux teneurs normales dans les parties aériennes des plantes d'après Kabata-Pendias et Pendias (1986), excepté pour le chrome dont les concentrations pourraient s'avérer critiques pour des plantes sensibles.

II.5. Discussion et Conclusions

II.5.1. Relation entre les paramètres environnementaux et la croissance

En laboratoire, Gomot (1994) a déterminé les conditions optimales pour la croissance et la reproduction d'*Helix aspersa* : la température moyenne doit être proche de 20°C, avec une photopériode de 18L-6O. De même, Jess et Marks (1998), lors d'une expérience menée sur 10 mois, ont montré que la croissance des escargots *Helix aspersa* est plus importante à 20°C qu'à 15°C : au bout de 19 semaines, les escargots atteignent 7,3g au cours des expériences menées à 15°C contre 17,2g pour 20°C.

Lors d'expériences sur le terrain, la température et l'humidité sont les facteurs principaux contrôlant l'activité des escargots et l'occurrence de leurs périodes de dormance (Iglesias *et al.*, 1996) et, par conséquent, leur croissance. Quand l'humidité devient trop faible, les escargots s'enferment dans leur coquille et sécrètent un épiphragme qui ferme hermétiquement la coquille. Ainsi, pendant les périodes d'estivation, les escargots diminuent leur métabolisme de base de 15% (Stuart *et al.*, 1998). De même, lorsque les températures et la photopériode diminuent, les escargots hibernent : l'épiphragme protège les organismes du froid, ils deviennent alors résistants à la formation des cristaux de glace dans leurs tissus (Ansart *et al.*, 2002). La durée de l'hibernation d'*Helix aspersa* suit un gradient décroissant nord-sud en Europe, en relation avec les climats rencontrés : hibernation supérieure à sept mois en Ecosse, cinq mois et demi en Grande Bretagne et quatre mois en Espagne (Iglesias *et al.*, 1996). Iglesias *et al.* (1996) ont rapporté les températures pour lesquelles des escargots ont été récoltés en activité, en hibernation ou en estivation en Espagne : les températures moyennes sont comprises entre 16,3 - 16,7°C, 6,4 - 8,6°C et 24,6°C, respectivement. Pour des températures négatives et jusqu'à 10°C, les escargots se trouvent en hibernation, enfouis dans le sol ; quand les températures s'élèvent, les escargots entrent en période d'activité jusqu'à 23-24°C ; pour des températures supérieures, les escargots peuvent entrer en estivation une partie de la journée.

La croissance réduite des escargots transférés en 2001 provient probablement des faibles températures observées les deux dernières semaines de l'expérience (températures négatives avec un maximum de +8°C) ainsi que d'une photopériode avec une part importante d'obscurité (mois d'octobre et de novembre), pouvant limiter l'activité des escargots. Par contre, en 2002 et surtout en

2003, les optimums de température et d'hygrométrie étant atteints, la part de l'obscurité dans la photopériode diminue : la croissance des escargots est régulière et continue au cours de l'expérience.

Au cours des expériences menées sur le site de CEDILOR, il existe une relation linéaire significative importante ($R^2 = 0.997$, $p < 0.05$) entre le taux de croissance des escargots transférés (valeur par laquelle les escargots ont multiplié leur poids initial) et la température moyenne observée (Figure 25).

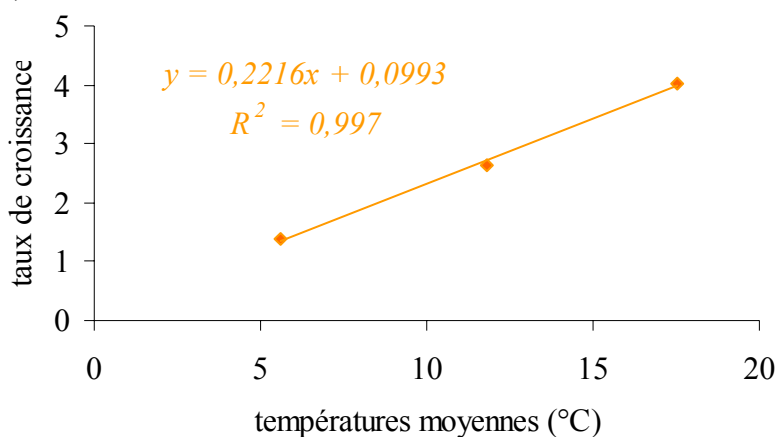


Figure 25 : Relation entre les températures moyennes mesurées en 2001, 2002, 2003 et les taux de croissance des escargots lors de ces expériences

Cette relation traduit l'importance des effets de la température (optimum : 20°C) sur la croissance des escargots et donc sur la bioaccumulation d'éléments métalliques dans leur organisme, quand ils sont présents dans leur environnement. L'hygrométrie joue aussi un rôle prédominant (optimum : > 80%) mais l'utilisation des bougies poreuses limite son influence lors de nos expériences sur le terrain.

Comme la croissance des escargots, sur le site de CEDILOR, a été significative en 2002 (multiplication du poids moyen par 2.63), l'accumulation moindre d'éléments métalliques par rapport à 2001 (IGCPM de 20 en 2001 et 14 en 2002 pour les transférés) peut provenir d'une diminution des teneurs en éléments métalliques dans le sol du site. De même en 2003, la croissance importante des escargots transférés (multiplication du poids moyen par 4.02) est couplée à une accumulation moindre d'éléments métalliques, par rapport à 2001 (IGCPM de 16 en 2003). La détermination des concentrations en éléments métalliques dans le sol en 2001, 2002 et 2003 nous permettra de déterminer si l'accumulation réduite d'éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés provient ou non d'une diminution des teneurs en éléments métalliques dans le sol du site.

II.5.2. Bioindication de la qualité du sol par *Helix aspersa aspersa* - Relation entre les concentrations dans le sol et dans les viscères des escargots

Pour tester et évaluer le pouvoir bioindicateur d'*Helix aspersa* lors de cette étude, il est nécessaire de comparer l'évolution des concentrations dans les viscères des escargots à l'évolution des concentrations en éléments métalliques dans le sol, dans le même temps.

La Figure 26 montre l'évolution des concentrations en EM dans les viscères des escargots transférés entre 2001 et 2003.

Entre 2001 et 2002, les concentrations moyennes en Cu, Fe, Zn, Mn et Pb diminuent significativement ($p < 0.05$). Entre 2002 et 2003, dans le cas du Fe, Zn, Mn et Pb, il y a stabilisation mais en ce qui concerne le cuivre, sa concentration augmente significativement entre 2002 et 2003 ($p < 0.05$). Les concentrations moyennes en nickel, cadmium et chrome n'évoluent pas de manière significative entre 2001-2002 et 2002-2003, avec cependant une tendance à la diminution pour le cadmium.

Dans le même temps, les concentrations en éléments métalliques dans le sol du site fluctuent aussi. Les teneurs en fer et en nickel diminuent significativement entre 2001 et 2002 avant une hausse significative en 2003 ($p < 0.05$). A l'inverse, les teneurs en cadmium augmentent significativement entre 2001 et 2002 avant de se stabiliser en 2003 ($p < 0.05$). Les concentrations en zinc ne sont pas significativement différentes entre 2001 et 2002 mais elles diminuent significativement en 2003 ($p < 0.05$). Les concentrations en cuivre, manganèse, plomb et chrome n'évoluent pas de manière significative entre 2001- 2002 et 2002-2003 ($p < 0.05$).

Le Tableau 31 récapitule les tendances évolutives des concentrations en éléments métalliques dans les viscères et le sol, afin de mettre en évidence d'éventuelles relations.

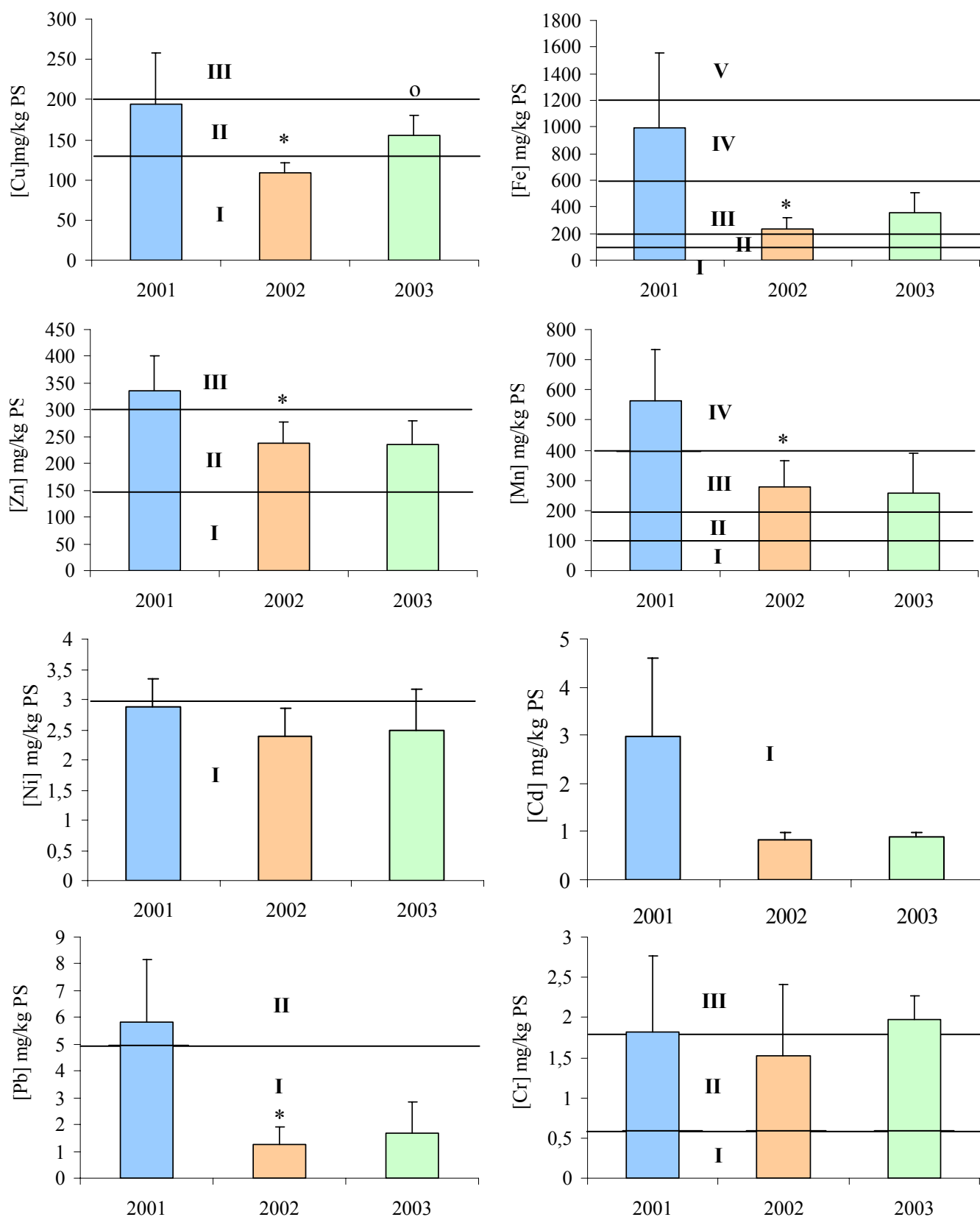


Figure 26 : Evolution des concentrations moyennes, entre les trois microcosmes, en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés sur le site de CEDILOR entre 2001, 2002 et 2003, positionnées par rapport aux limites des classes de contamination élaborées par Pihan (2001) (* : concentrations différents entre 2001 et 2002, o : concentrations différentes entre 2002 et 2003, Mann Whitney, $p < 0.05$)

Tableau 31 : Evolution des teneurs en EM dans les viscères des escargots transférés (classes de contamination de I à III selon Pihan, 2001) comparée à l'évolution des teneurs dans le sol du site de CEDILOR (= : stabilisation, > : diminution, < : hausse des concentrations en EM dans le sol entre 2001 et 2003 ; \rightarrow baisse ou hausse significative, \Rightarrow pas de changement significatif, \dashrightarrow tendance à la diminution).

	Evolution des classes de contamination dans les viscères des escargots transférés				Evolution des teneurs dans les sols		
	2001	2002	2003	03-01	2002-2001	2003-2002	03-01
Cu	II \rightarrow	I \rightarrow	II	=	=	=	=
Fe	IV \rightarrow	III \Rightarrow	III	<	<	>	<
Zn	III \rightarrow	II \Rightarrow	II	<	=	<	<
Mn	IV \rightarrow	III \Rightarrow	III	<	=	=	=
Ni	I \Rightarrow	I \Rightarrow	I	=	<	>	<
Pb	II \rightarrow	I \Rightarrow	I	<	=	=	=
Cd	I \dashrightarrow	I \Rightarrow	I	=	>	=	>
Cr	III \Rightarrow	II \Rightarrow	III	=	=	=	=

Le Tableau 31 montre l'évolution des concentrations dans les viscères des escargots par rapport à celle des teneurs en éléments métalliques dans le sol, entre 2001 et 2003. La diminution des concentrations en fer, zinc, manganèse et plomb dans les viscères des escargots transférés reflète la diminution des teneurs en fer et zinc ou du moins, la stabilisation des teneurs en manganèse et plomb dans le sol entre 2001 et 2003. Dans le cas du chrome et du cuivre, la concentration dans les viscères des escargots reste stable de même que sa teneur dans le sol. Par contre, alors que la teneur en nickel du sol diminue significativement entre 2001 et 2003, les concentrations dans les viscères des escargots restent stables, tout en relevant, d'une manière permanente, de la classe I c'est à dire de la classe de non contamination. Dans le cas du cadmium, alors que la teneur dans le sol augmente significativement entre 2001 et 2002 avant de se stabiliser, les concentrations dans les viscères des escargots n'évoluent pas de manière significative entre 2001 et 2003, avec même une tendance à la diminution entre 2001 et 2002, tout en relevant les trois années de la classe I de non contamination.

Aucune expérimentation, à ce jour, n'a tenté de mettre en relation l'évolution des concentrations en éléments métalliques dans *Helix aspersa* à l'évolution des concentrations en métaux dans le sol d'un site, suivi sur plusieurs années. Pihan et de Vaufleury (2000) ont testé l'efficacité de la remédiation d'un site de stockage de déchets en comparant les concentrations en éléments métalliques dans les escargots transférés sur le site avant et après la remédiation. Les principales études réalisées, portant sur le pouvoir bioindicateur de cet organisme, ont consisté à prélever des

organismes autochtones (i.e. biosurveillance passive) et des échantillons de sol sur les sites à étudier et à doser les niveaux en éléments métalliques atteints : de nombreuses études ont été menées à proximité d'industries métallurgiques et de mines (Coughtrey et Martin, 1976 ; Hopkin, 1989 ; Rabitsch, 1996) ou le long d'infrastructures routières (Williamson, 1980 ; Gomot de Vaufleury et Pihan, 2001 ; Menta et Parisi, 2001 ; Swaileh *et al.*, 2001a-c ; Viard *et al.*, 2004a) mais dans tous les cas pour donner des résultats à l'instant t. Par ailleurs, une seule expérimentation de biosurveillance active a été réalisée par Scheifler *et al.* en 2003, pendant 7 semaines : 15 H.a.a. ont été transférés dans des microcosmes en acier implantés sur un sol forestier amendé de manière à évaluer le transfert des EM du sol vers les escargots.

Pour Beeby et Richmond (2002), un organisme sentinelle idéal doit montrer une relation linéaire entre la source et les niveaux en métaux dans les tissus, dans le temps. Pour leur étude, ils ont prélevé des *Helix aspersa* autochtones sur des sites présentant une large gamme de contamination polymétallique, en Grande Bretagne et au Pays de Galle. Il en ressort des relations linéaires significatives entre les concentrations en Pb, Zn et Cd dans la glande digestive des escargots récoltés et leur concentration dans le sol : les coefficients de régression sont, respectivement, de 0.50, 0.42 et 0.72. Les résultats obtenus lors de notre étude confirment les résultats de Beeby et Richmond et les complètent. Des relations linéaires significatives peuvent être mise en évidence pour les métaux suivants Fe, Zn, Mn, Ni et Cd : les coefficients de régression linéaire obtenus sont, respectivement, de 1, 0.97, 0.81, 0.98 et 0.99.

A partir de ces travaux menés entre juin et novembre, il apparaît que les escargots sont capables de mettre en évidence une contamination métallique de leur environnement, même quand les conditions atmosphériques ne sont pas optimales (fin novembre), et de refléter l'évolution des teneurs en éléments métalliques. Toutefois, une température moyenne minimale comprise entre 15 et 20°C doit être respectée, couplée à une hygrométrie supérieure à 80%, afin de permettre aux escargots d'avoir une activité et donc de s'alimenter normalement tout au long de l'expérience. De plus, la photopériode doit s'approcher au mieux de 18L/6O. A la vue de ses résultats, il est donc préconiser de réaliser les expériences de biosurveillance active entre les mois de mai et septembre, afin de satisfaire au mieux les conditions environnementales nécessaires à la croissance des escargots transférés.

Le transfert en microcosmes de lots d'H.a.a. sur le site de CEDILOR, trois années de suite, montre l'évolution dans le temps des concentrations en éléments métalliques dans le sol. Entre 2001 et 2003, l'apport en éléments métalliques dans l'environnement proche est très réduit et souligne

l'importance de la conception initiale de ce site. En effet, la zone d'implantation de l'usine correspond à un périmètre étanche, où les eaux de pluie percolent dans le sol avant d'être drainées vers le bassin de rétention puis rejetées dans l'Orne, après contrôle de leur conformité. La nature drainante des sols peut expliquer la diminution des teneurs dans les sols en certains éléments métalliques, présents initialement dans les terres apportées, par exportation.

L'originalité de notre étude réside dans sa répétition dans le temps, avec des escargots issus du même élevage, permettant ainsi un suivi optimal des niveaux en métaux sur les sites d'études. Il serait donc intéressant de transférer les escargots, dans ces conditions, sur différents sites, afin de valider le protocole mis au point pour un large panel de contaminations.

CHAPITRE III BIOSURVEILLANCE DE DIFFERENTS SITES

Entre 2001 et 2003, plusieurs expériences de biosurveillance ont été menées sur différents sites d'intérêt global (un site naturel minier, un site industriel en activité historique et une friche industrielle développée sur un ancien site industriel) afin de valider, *in situ*, la méthode de transfert d'escargots *Helix aspersa aspersa* dans des microcosmes mis au point afin d'optimiser la réponse évaluée par le niveau de bioaccumulation en éléments métalliques.

III.1. Biosurveillance d'un site présentant une contamination naturelle : Hargarten aux Mines (57) (Annexe 8)

III.1.1. Enregistrement de la température et de l'hygrométrie

Les évolutions de la température et de l'hygrométrie, au cours de cette expérience, sont présentées sur la Figure 27.

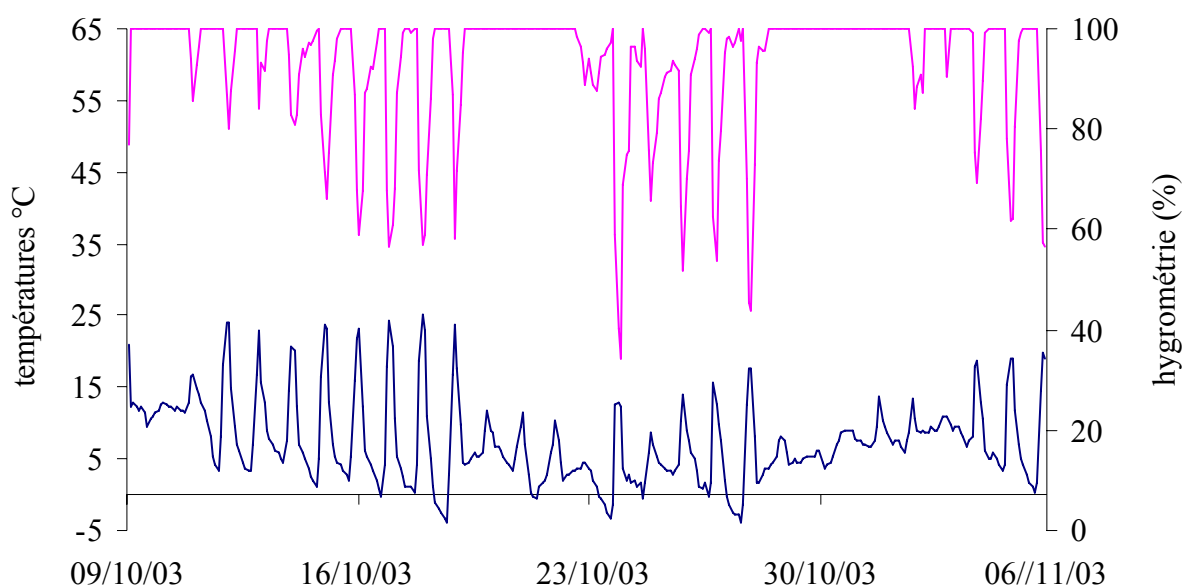


Figure 27 : Evolution de la température et de l'hygrométrie au cours de l'expérience menée à Hargarten aux Mines en 2003 ([température](#) ; [hygrométrie](#)).

Au cours de l'expérience menée au printemps 2003, la température moyenne enregistrée est de 7.43 °C, ce qui est inférieur à la température recommandée *in situ* entre 15 et 20°C, avec un minimum de -3.8°C la nuit et un maximum de 25.2°C en journée. L'hygrométrie moyenne est de 93.1%.

III.1.2. Evolution de la croissance pondérale et du diamètre

L'évolution du poids et du diamètre moyen des escargots transférés à Hargarten aux Mines est présentée sur la Figure 28.

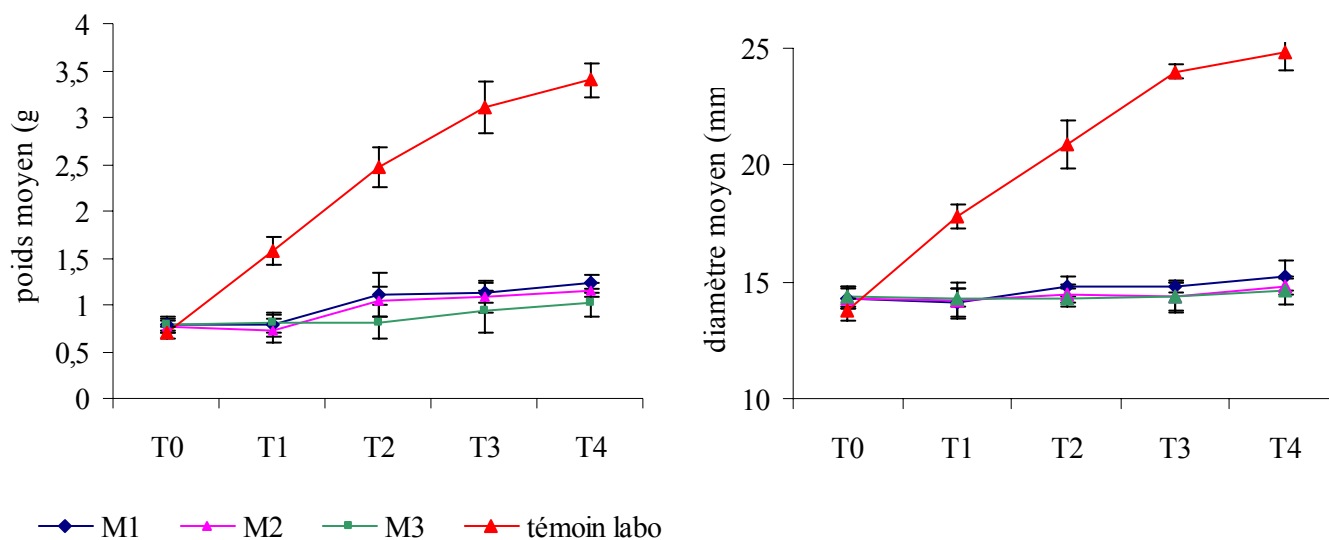


Figure 28 : Evolution du poids et du diamètre moyen des escargots transférés à Hargarten aux Mines en automne 2003 et des « témoins laboratoire » (M1 à 3 : microcosmes 1 à 3 ; T1 à T4 : semaines 1 à 4).

Au début de l'expérience, les escargots présentent un poids moyen homogène de 0.78 ± 0.07 g et un diamètre moyen de 14.32 ± 0.42 mm. Par la suite, le poids et le diamètre des escargots évoluent peu : multiplication du poids moyen par 1.46 et du diamètre moyen par 1.04. Dans le même temps, les témoins laboratoire multiplient leur poids par 4.86 et leur diamètre par 1.8.

Pour rappel, les témoins terrains, non représentés sur la figure, multiplient leur poids moyen par 6.4 et leur diamètre moyen par 1.87.

A quatre semaines, le poids moyen des escargot transférés est de 1.14 ± 0.14 g et le diamètre de 14.90 ± 0.59 mm.

III.1.3. Accumulation en métaux lourds dans les escargots

Les concentrations en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés à Hargarten aux Mines sont présentées sur la Figure 29, par rapport aux niveaux des classes de contamination définies par Pihan (2001). Seules les concentrations dans les viscères sont présentées : les concentrations dans le pied, inférieures pour tous les métaux sauf pour le cuivre, sont en Annexe 8.

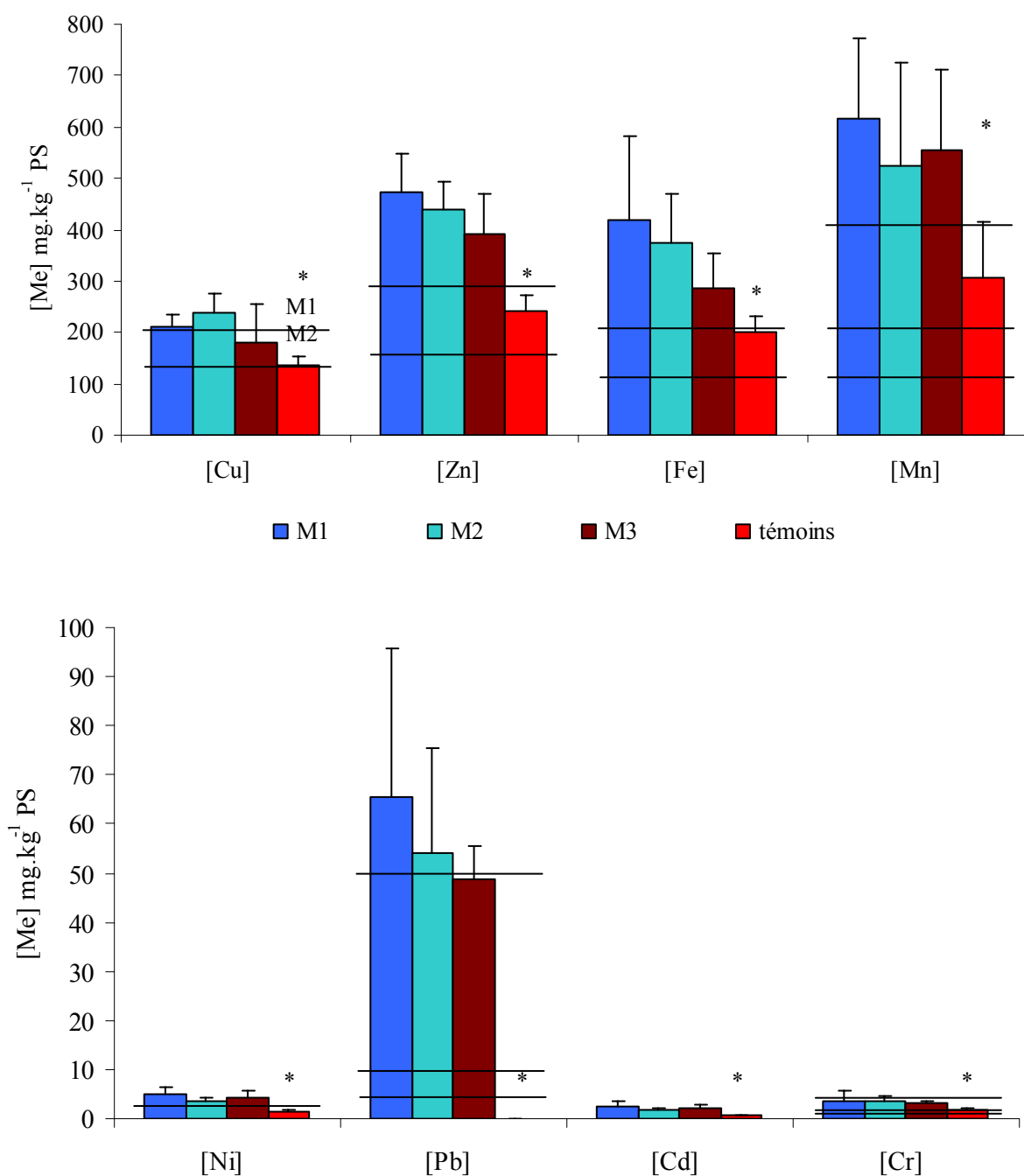


Figure 29 : Concentrations en éléments métalliques, en mg.kg⁻¹ PS, dans les viscères des escargots transférés à Hargarten aux Mines et dans les « témoins laboratoire », positionnées par rapport aux limites des classes de contamination élaborées par Pihan (2001) (* : différence significative entre les témoins et les transférés)

Les concentrations en éléments métalliques mesurées, dans les viscères des escargots transférés sur le site d'Hargarten aux Mines, ne sont pas significativement différentes entre les trois microcosmes M1-M2-M3 (Mann Whitney, $p < 0.05$). Les concentrations en zinc, fer, manganèse, nickel, plomb, cadmium et chrome, mesurées dans les viscères des témoins sont significativement inférieures à

celles des transférés. Dans le cas du cuivre, la concentration mesurée dans les escargots transférés dans le microcosme 3 n'est pas significativement différente de celle mesurée dans les témoins (Mann Whitney, $p < 0.05$). Les grilles de contamination des viscères définies par Pihan (2001) permettent d'établir l'indice global de contamination polymétallique IGCPM du site en 2003 (Tableau 32).

Tableau 32 : Classes de contamination, concernant les viscères (Pihan, 2001), pour les témoins laboratoire et les escargots transférés sur le site d'Hargarten aux Mines, dans M1-M2 et M3.

	Cu	Mn	Fe	Zn	Ni	Cd	Pb	Cr	IGCPM
témoin labo	II	III	II	II	I	I	I	III	16
Microcosme 1	III	IV	III	III	II	I	IV	III	23
Microcosme 2	III	IV	III	III	II	I	IV	III	23
Microcosme 3	II	IV	III	III	II	I	III	III	21
<i>Classe retenue M</i>	<i>III</i>	<i>IV</i>	<i>III</i>	<i>III</i>	<i>II</i>	<i>I</i>	<i>IV</i>	<i>III</i>	23

Alors que les concentrations entre les différents microcosmes ne sont pas significativement différentes, on observe tout de même quelques différences dans les classes de contamination pour le plomb et le cuivre : les escargots transférés dans M3 appartiennent à des classes inférieures à celles rencontrées dans M1 et M2, respectivement III et II.

III.1.4. Caractérisation du sol et de la végétation du site

Les concentrations en éléments métalliques rencontrées sur le site d'Hargarten aux Mines sont présentées sur la Figure 30.

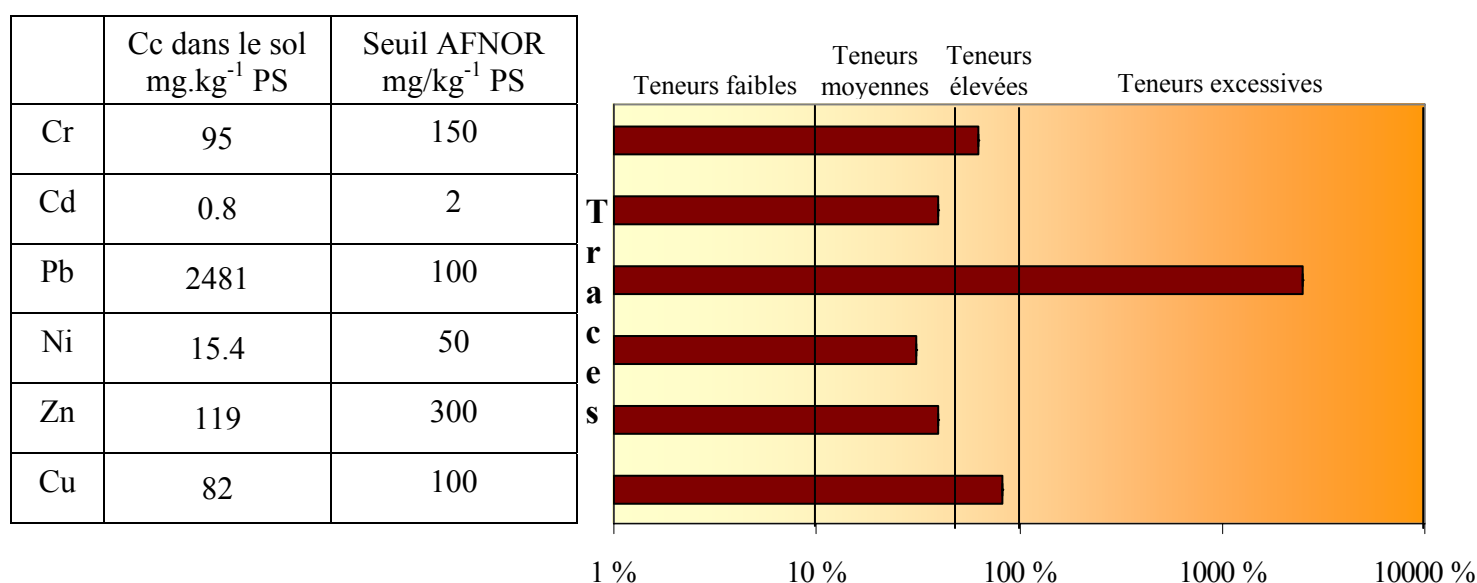


Figure 30 : Concentrations (Cc) en éléments métalliques, dans le sol du site d'Hargarten aux Mines, évaluées par rapport au seuil fixé par la norme AFNOR NF U 44-041 (100 % = seuil AFNOR).

Comme le montrent les analyses de sol effectuées par le BRGM, ce site se caractérise par une concentration en plomb importante de 2481 mg.kg^{-1} de sol, supérieure au seuil de la norme AFNOR, provenant des affleurements de minerai de plomb dans cette région. Les autres métaux sont présents en des quantités moyennes (cadmium, nickel et zinc) ou élevées (chrome et cuivre), cependant inférieures aux seuils définis dans la norme AFNOR. Par rapport aux seuils en vigueur aux Pays Bas (VROM Ministry, 1997), seule la teneur en nickel est inférieure au seuil de référence (valeur A). Les concentrations en zinc, cadmium et chrome sont proches de leur seuil respectif de référence alors que la teneur en cuivre est supérieure. Les teneurs en plomb dépassent largement les valeurs de référence établies. Par rapport aux valeurs de constat d'impact pour les sols à usage sensible VCIus (Annexe 7), les concentrations en éléments métalliques dans le sol sont inférieures aux VCIus pour le Cu, Zn, Ni, Cd, Cr. Par contre en ce qui concerne le plomb, la concentration présente dans le sol du site d'Hargarten aux Mines est 6 fois supérieure à la VCIus du plomb (400 mg.kg^{-1} PS) et dépasse même la VCI défini pour les sols à usage non sensible (2000 mg.kg^{-1} PS). Les caractéristiques physico-chimiques du sol sont les suivantes : pH 5, 74% de sable, carbone organique 27.14 g.kg^{-1} , teneur en matières organiques 46.7 g.kg^{-1} et une CEC de 7.2 cmol.kg^{-1} . Les concentrations mesurées dans la végétation du site sont présentées sur la Figure 31.

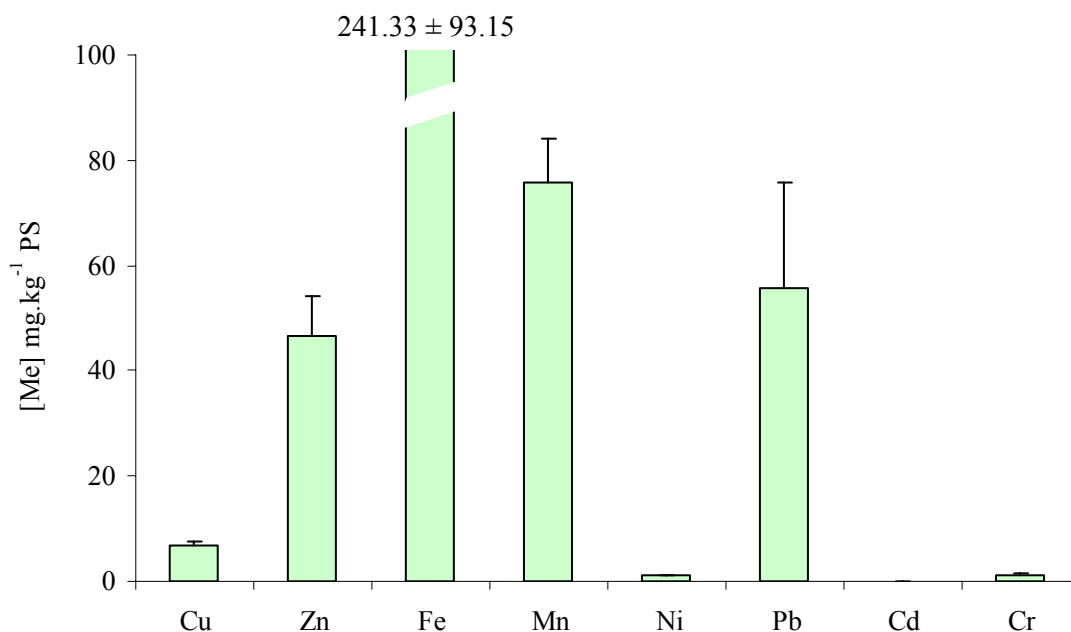


Figure 31 : Concentrations en éléments métalliques dans la végétation (trèfle autochtone) à l'intérieur des microcosmes implantés sur le site d'Hargarten aux Mines.

Les concentrations en cuivre, zinc, nickel et cadmium sont considérées comme normales dans les parties aériennes des plantes. Par contre, les concentrations en chrome ($1.07 \pm 0.46 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS) s'avèrent être critiques pour les plantes sensibles et les concentrations en plomb ($55.79 \pm 20.08 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS) sont excessives et toxiques pour les plantes (Tableau 9 Synthèse Bibliographique) mais aucune phytotoxicité n'est observée sur le trèfle autochtone du site.

III.1.5. Discussion

Au cours de cette expérience, la température (moyenne de 7.4°C) a probablement limité la croissance des escargots : leur poids moyen n'a été multiplié que par 1.8. L'hygrométrie mesurée (moyenne 93.1%) est conforme au *preferendum* de croissance (Gomot, 1994). Les températures froides, associées à des périodes d'obscurité comprises entre 9 et 10h, peuvent être à l'origine d'une alternance de phases de dormance et d'activité, limitant donc la croissance des escargots.

Les concentrations en cuivre, zinc, cadmium et chrome, dans le sol et le trèfle du site, sont inférieures aux NOEC, CE50 et CE20 déterminées pour la croissance, le taux de consommation ou la fécondité d'*Helix aspersa aspersa* (Tableau 22 Synthèse Bibliographique). Par contre, bien que la concentration en plomb dans le sol soit inférieure à la CE50 de la croissance, elle s'avère être supérieure à la CE20 du taux de consommation. Les escargots transférés sur le site d'Hargarten aux Mines peuvent donc avoir présenté une inhibition partielle de la croissance due à un phénomène de répulsion, provoquée par une concentration excessive en plomb dans le sol. Cette capacité des escargots de détecter de fortes concentrations en métaux dans leur source de nourriture a déjà été montrée par Simkiss et Watkins (1990), Swaileh et Ezzughayyar (2000) et Swaileh *et al.* (2002) pour le cuivre et le plomb : la répulsion de la nourriture entraîne un jeûne forcé des escargots qui entrent alors en estivation. Toutefois, les concentrations en éléments métalliques retrouvées dans les viscères des escargots transférés, significativement supérieures à celles des témoins, indiquent une prise de nourriture (sol et végétaux) au cours de l'expérience. Rabitsch (1996), dans une étude menée à proximité d'une mine de zinc et de plomb, signale une concentration en plomb dans le sol semblable à celle de notre étude (2440 mg Pb.kg⁻¹ PS) et une concentration en plomb dans les viscères d'*Helix pomatia* de 330 mg Pb.kg⁻¹ PS en soulignant l'existence de différences d'accumulation inter espèces. Cette concentration est nettement supérieure à celle observée dans la présente étude chez H.a.a. (entre 50 et 65 mg.kg⁻¹ PS). De même, Coughtrey et Martin (1976) ont mesuré des concentrations en plomb, cadmium et zinc supérieures dans les viscères d'*Helix aspersa* récoltés à proximité d'une mine de plomb et de zinc en activité (Tableau 23, Synthèse Bibliographique). Les escargots transférés sur ce site présentent un indice global de contamination polymétallique très élevé par rapport au site précédemment étudié de CEDILOR (IGCPM : 14 à 20 selon les années).

Les concentrations en plomb mesurées dans le sol du site correspondent aux concentrations retrouvées par Denaix *et al.* (2001) à proximité d'une mine de plomb et de zinc (2340 mg Pb.kg⁻¹ PS) et par Kugonic et Kopusar (2000) à différentes distances d'une mine de plomb (concentrations variant entre 734 et 4470 mg Pb.kg⁻¹ PS). De même, la concentration en cadmium mesurée dans le sol est conforme à celles retrouvée à proximité d'une mine de plomb variant entre 0.89 et 23mg.kg⁻¹

PS, par Kugonic et Kopusar (2000). Compte tenu des concentrations en éléments métalliques retrouvées dans les viscères des escargots transférés, par rapport aux teneurs totales en EM dans le sol, H.a.a. se présente comme un macroconcentreur de cuivre ($BAF_{Cu} : 2.55$), de zinc ($BAF_{Zn} : 3.66$) et de cadmium ($BAF_{Cd} : 2.56$) et comme un déconcentreur des autres métaux ($BAF_{Ni} : 0.28$; $BAF_{Pb} : 0.02$; $BAF_{Cr} : 0.04$). Ces résultats sont conformes aux données de la littérature (Dallinger, 1993 ; Viard *et al.*, 2004a).

En tenant compte des équations proposées par Pihan (2001) pour le cuivre et le cadmium, mettant en relation la concentration dans la nourriture (x) avec celle mesurée dans le pied ou les viscères des escargots (y), le ratio sol/végétation de nourriture ingérée par les escargots peut être déterminé à partir des concentrations moyennes présentes dans les viscères (la farine apportant très peu de métaux)

- pour le cuivre, dans les viscères $y = 5.5923 x - 13.812$ ($R^2 = 0.9017$)

- pour le cadmium, dans les viscères $y = 3.0026 x + 0.3928$ ($R^2 = 0.4059$)

A partir de ces équations, les concentrations moyennes dans la nourriture prise par les escargots sont de $39.90 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$ PS et $0.55 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$ PS, ce qui correspond à un ratio sol/végétation en % de 44/56 pour le cuivre et 66/34 pour le cadmium.

L'évaluation des capacités bioindicatrices d'*Helix aspersa aspersa* de la contamination naturelle du site d'Hargarten aux Mines est présentée dans le Tableau 33.

Tableau 33 : Comparaison entre les niveaux de bioaccumulation en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés, par rapport aux témoins, et les niveaux atteints dans les sols par rapport aux seuils en vigueur en France et aux Pays-Bas (<, > : différence inférieure ou supérieure significative pour les stations mentionnées, ≈ : valeur proche du seuil)

	Critère : Qualité du sol		Critère : Bioaccumulation des EM Transférés/Témoins
	Norme AFNOR	Norme Pays Bas	
Cu	<	>	>
Zn	<	≈	>
Cd	<	≈	>
Pb	>>>	>>>	>>>
Ni	<	<	>
Cr	<	≈	>

Ce tableau met en évidence une relation non négligeable entre le niveau de contamination en éléments métalliques dans le sol et leur accumulation dans les viscères des escargots. Pour le plomb, les teneurs anormalement élevées dans le sol se traduisent par une accumulation importante du plomb dans les viscères. Pour les autres métaux, les teneurs dans le sol supérieures ou proches de

la valeur de référence des Pays Bas correspondent à une accumulation significative de ces métaux dans les viscères des escargots.

Le sol d'Hargarten aux Mines se caractérise par une contamination moyenne en Zn, Ni et Cd, une contamination élevée en Cu et Cr et une contamination plus qu'excessive en Pb, d'origine naturelle. Cette importante contamination du sol en plomb, associé au chrome, se retrouve au niveau du trèfle autochtone, dont les teneurs en chrome et plomb sont importantes dans les parties aériennes. Après un mois sur le site, les concentrations en Cr, Pb et Cu, atteintes dans les viscères des escargots transférés, reflètent les niveaux élevés présents dans le sol et la végétation. Dans le cas du Zn, Ni et Cd, les teneurs moyennes dans le sol et normales dans le trèfle se traduisent par des niveaux faibles à moyens dans les escargots, en fonction des pourcentages respectifs de trèfle et de sol ingérés.

III.2. Biosurveillance de sites industriels

III.2.1. Un site industriel en activité : SOTRENOR (62) (Annexe 9)

III.2.1.1. Enregistrement de la température et de l'hygrométrie

Au cours de cette expérience, quatre enregistreurs ont été placés au niveau des quatre stations du site évaluées : les enregistrements obtenus sont semblables d'une station à l'autre, avec des minima, maxima et moyennes semblables. C'est pourquoi, seul l'enregistrement obtenu au niveau de la station 2 est présenté ici, à titre d'illustration (Figure 32).

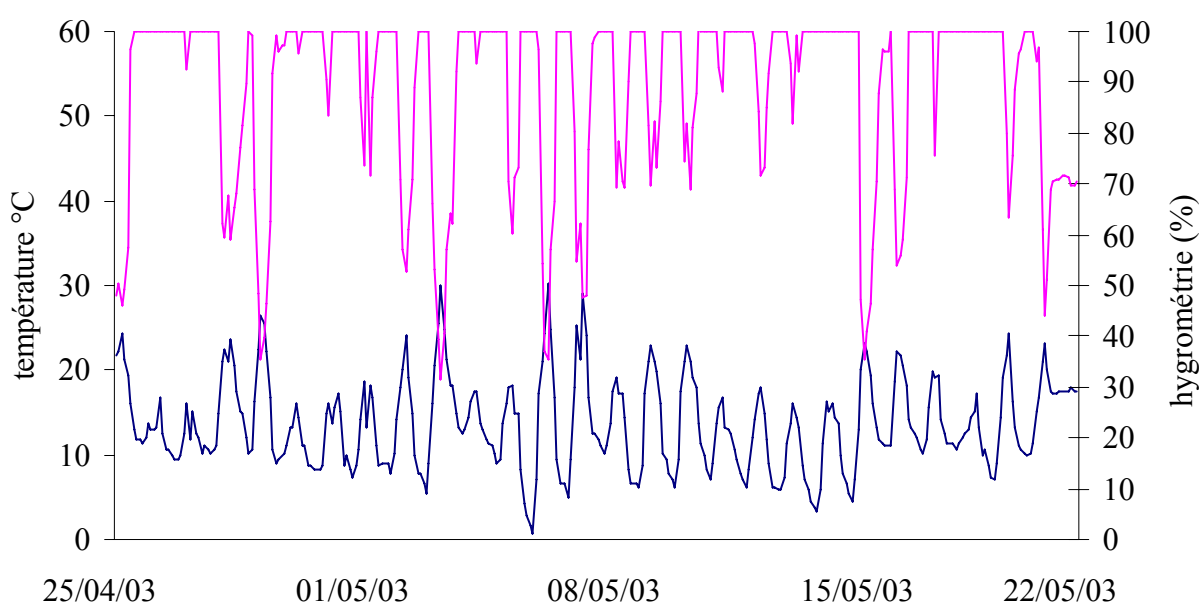


Figure 32 : Evolution de la température et de l'hygrométrie au cours de l'expérience menée sur le site de SOTRENOR en 2003, au niveau de la station expérimentale 2 ([température](#) ; [hygrométrie](#))

Les températures moyennes relevées durant cette expérience varient entre 13.1°C au niveau de la station 1 et 13.6°C au niveau des stations 2 et 3, avec des minima proches de 0°C et des maxima aux alentours de 30°C. L'hygrométrie moyenne est comprise entre 87.6 et 89.7%.

III.2.1.2. Evolution de la croissance pondérale et du diamètre

L'évolution du poids et du diamètre moyen des escargots, pour chacun des microcosmes implantés sur chacune des stations, est présentée sur la Figure 33.

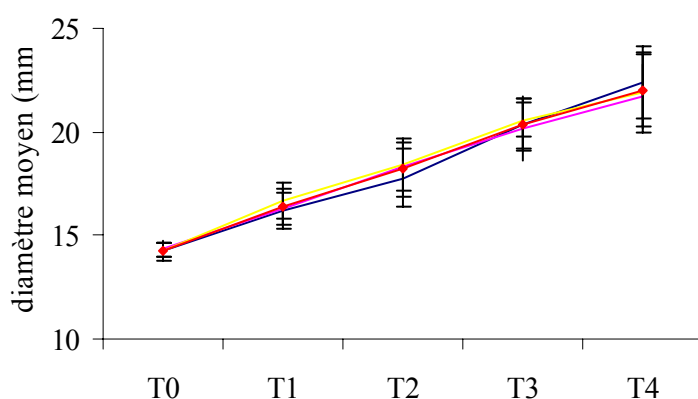
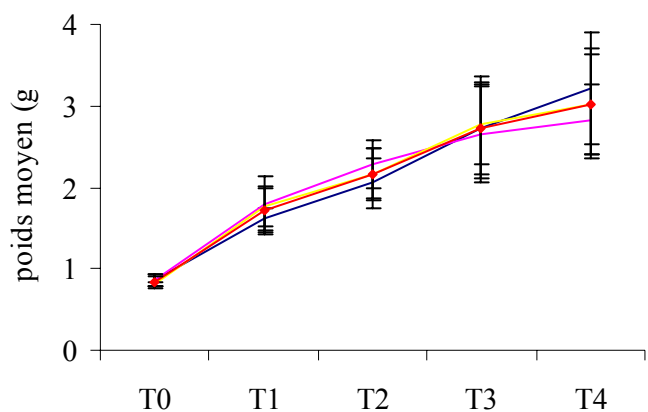
Au début de l'expérience, le poids moyen des escargots transférés dans les microcosmes n'est pas significativement différent (Mann Whitney, $p < 0.05$) : les escargots pèsent 0.82 ± 0.01 g.

Au cours de l'expérience, la variabilité inter microcosme, pour chacune des stations, s'avère être très réduite, aussi bien en ce qui concerne l'évolution du poids des escargots que de leur diamètre.

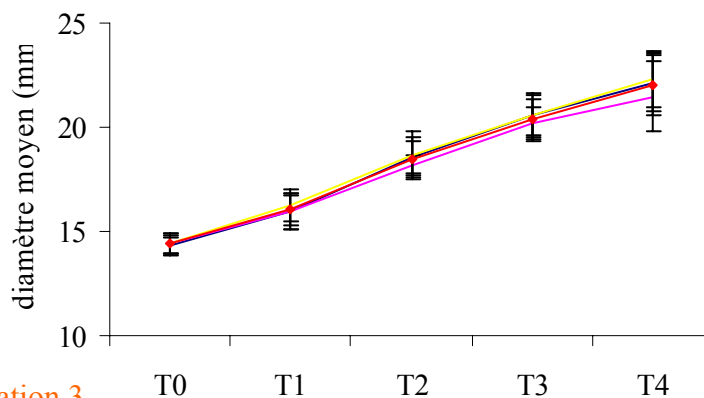
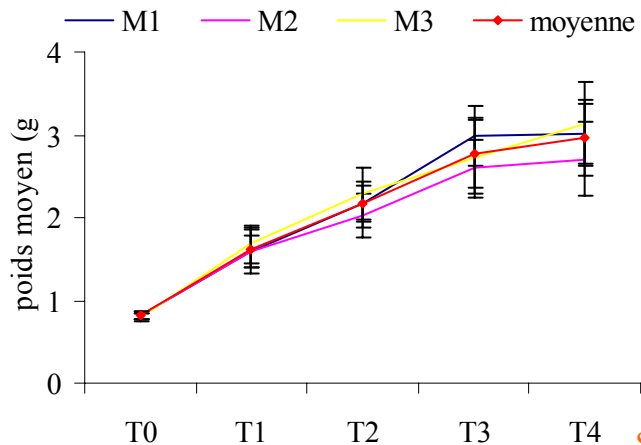
En effet, les poids moyens atteints par les escargots transférés au niveau des stations 3 et 4 ne sont pas significativement différents entre les trois microcosmes : leur poids moyen, après un mois, est de 3.07 ± 0.36 g au niveau de la station 3 et de 2.90 ± 0.54 g au niveau de la station 4. (Mann Whitney, $p < 0.05$). Dans le cas des stations 1 et 2, le poids moyen des escargots de l'un des trois microcosme est significativement différent de celui des deux autres : pour la station 1, le poids moyen des escargots placés dans M1 est significativement supérieur à celui de M2 et pour la station 2, le poids moyen des escargots transférés dans M3 est significativement supérieur à celui de M2 (Mann Whitney, $p < 0.05$). Au bout des quatre semaines d'expérience, les poids moyens atteints pour chacune des stations ne sont pas significativement différents : 3.02 ± 0.61 g pour la station 1, 2.95 ± 0.46 g pour la station 2, 3.07 ± 0.36 g pour la station 3 et 2.90 ± 0.54 g pour la station 4.

Les mêmes observations peuvent être faites concernant l'évolution du diamètre moyen : aucune différence significative (Mann Whitney, $p < 0.05$) entre les diamètres moyens atteints dans chacun des microcosmes implantés sur une station et pas de différence significative (Mann Whitney, $p < 0.05$) entre les diamètres moyens des escargots des quatre stations, après quatre semaines (22 ± 1.71 mm pour la station 1, 21.98 ± 1.45 mm pour la station 2, 22.04 ± 1.52 mm pour la station 3 et 21.91 ± 1.29 mm pour la station 4). La Figure 34 reprend les poids et diamètre moyens des escargots, par station, comparés à l'évolution de ces mêmes paramètres chez les escargots « témoins laboratoire ».

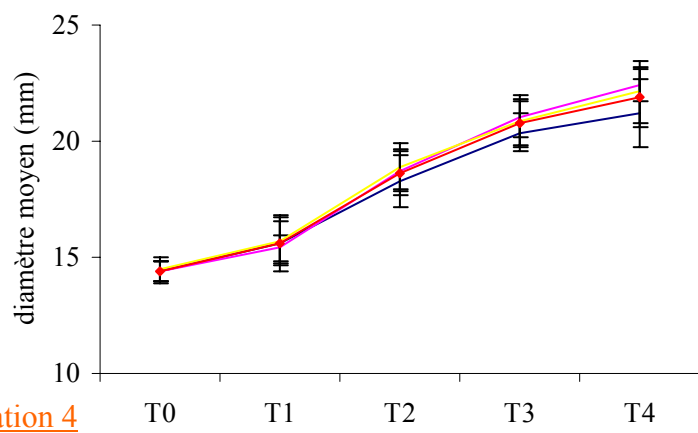
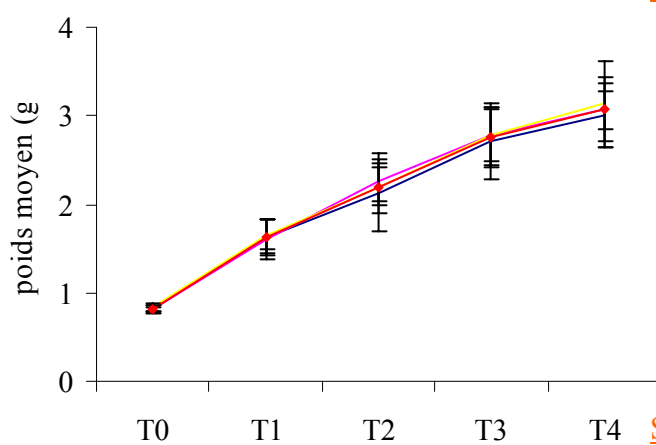
Station 1



Station 2



Station 3



Station 4

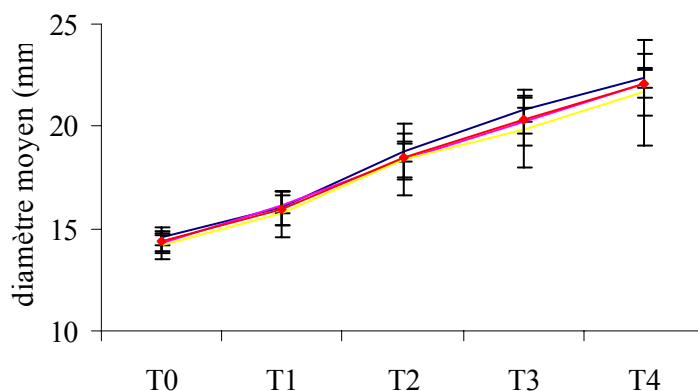
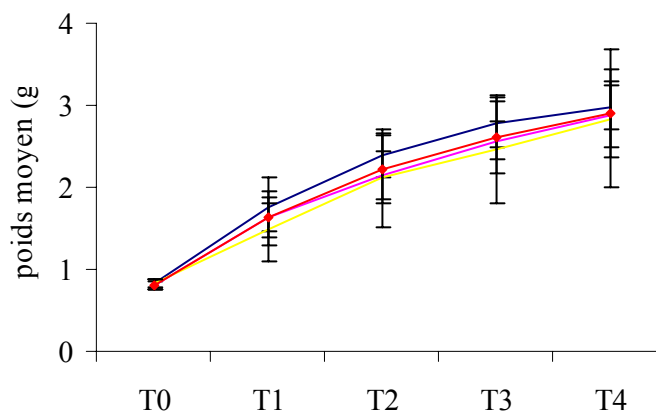


Figure 33 : Evolution des poids et diamètres moyens des escargots transférés dans chaque microcosme, implantés sur chacune des quatre stations du site de SOTRENOR, en 2003 (M1 à M3 : microcosmes ; T1 à T4 : semaines 1 à 4).

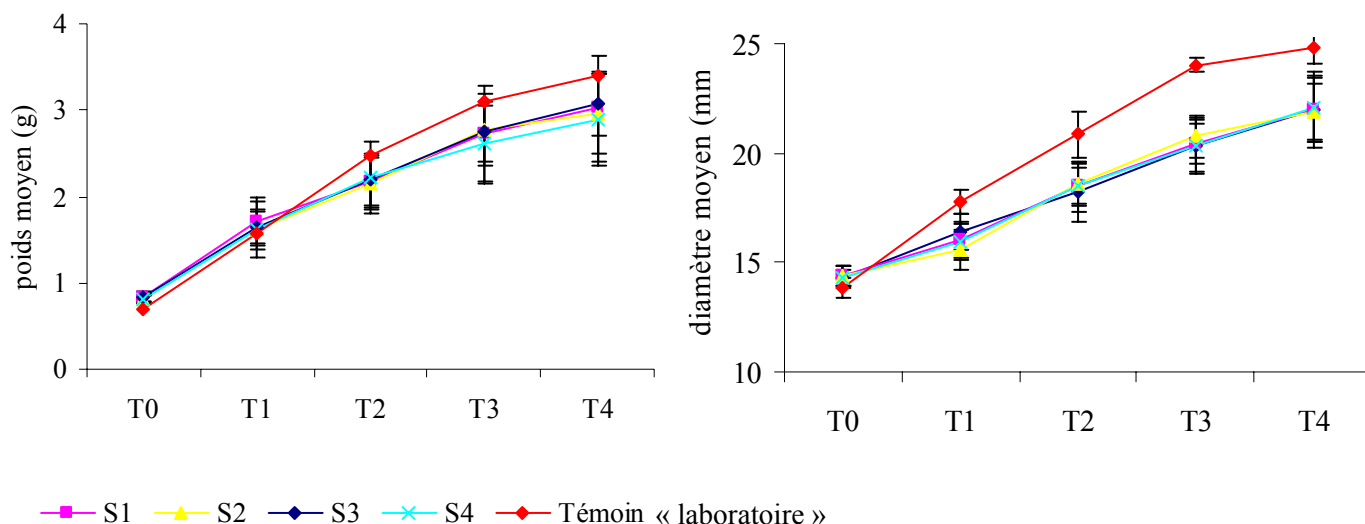


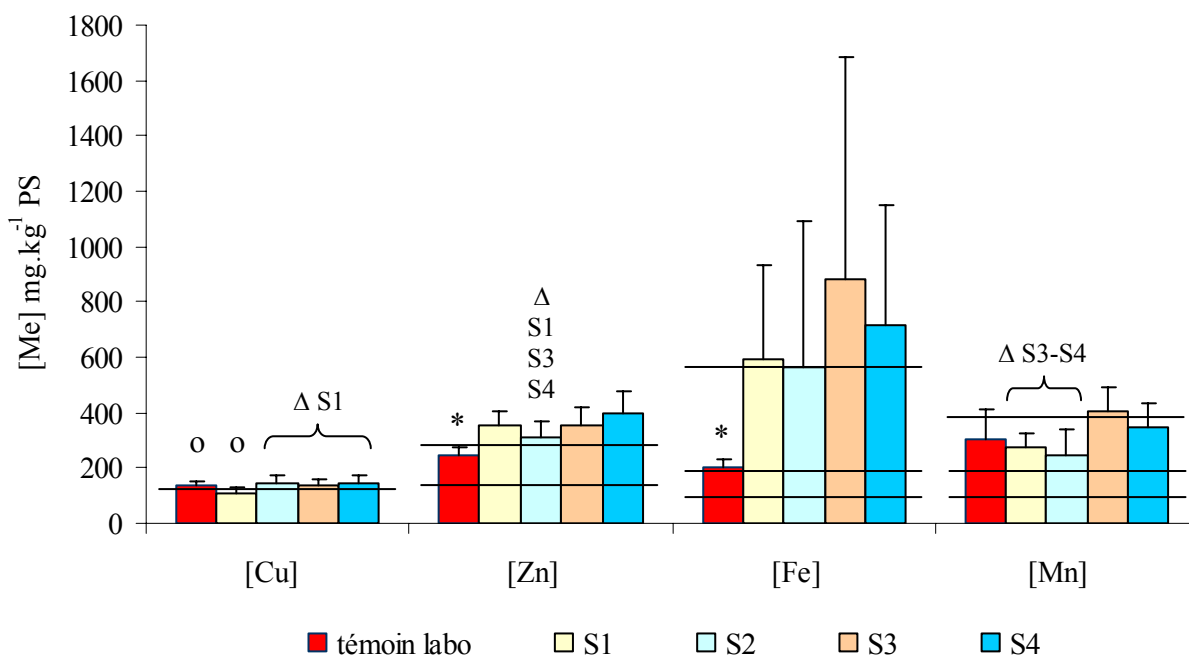
Figure 34 : Evolution du poids et du diamètre moyen des escargots transférés sur le site de SOTRENOR, pour les stations S1, S2, S3 et S4, comparée à celle des témoins laboratoire (S1 à S4 : stations 1 à 4 ; T1 à T4 : semaines 1 à 4) .

Alors que les témoins multiplient leur poids moyen par 4.86, les escargots transférés sur le site multiplient leur poids moyen par 3.63. En ce qui concerne le diamètre moyen, les témoins « laboratoire » le multiplient par 1.8 alors que celui des escargots transférés est multiplié par 1.53.

III.2.1.3. Accumulation en métaux lourds dans les escargots

III.2.1.3.1. Concentrations en métaux dans les escargots transférés

Les concentrations en éléments métalliques, mesurées dans les viscères (concentrations dans les pieds en annexe) des escargots transférés au niveau des quatre stations du site de SOTRENOR, sont présentées sur la Figure 35, par rapport aux niveaux des classes de contamination définies par Pihan (2001).



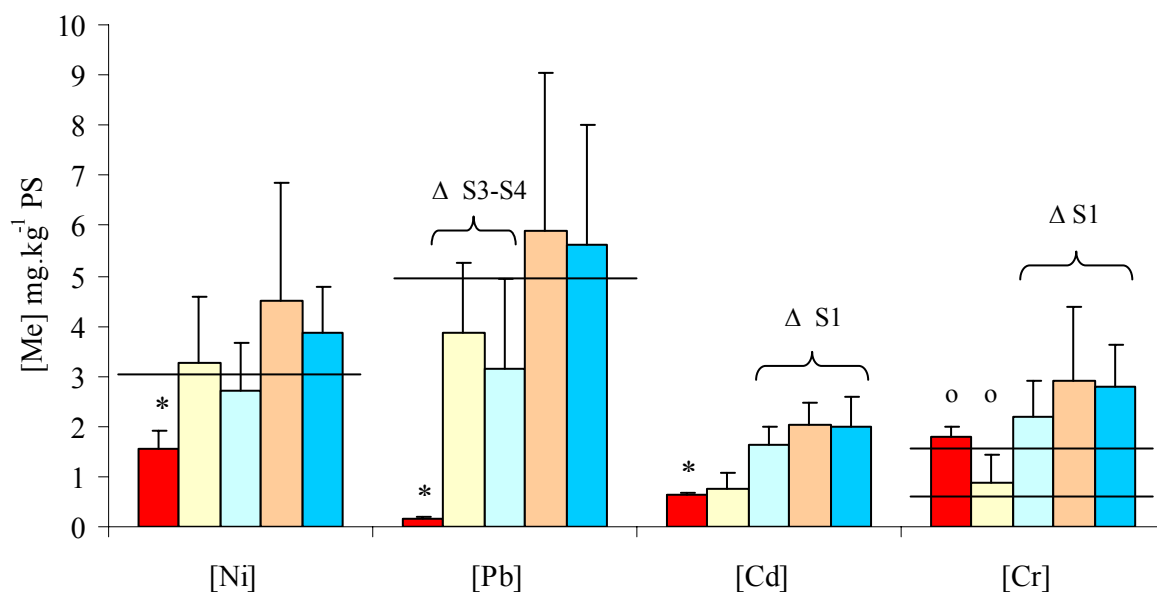


Figure 35 : Concentrations moyennes en éléments métalliques (mg.kg^{-1} PS) dans les viscères des escargots transférés aux stations S1-S2-S3-S4 et dans les viscères des « témoins laboratoire » (* : différence significative entre témoins et transférés à toutes les stations, o : différence significative entre témoins et station considérée, Δ : différence significative entre stations indiquées S_i , avec $i = 1-2-3-4$) (Mann Whitney, $p < 0.05$).

Les concentrations en zinc, fer, nickel, plomb et cadmium, dans les viscères des témoins laboratoire, sont significativement inférieures à celles mesurées dans les viscères des escargots transférés (Mann Whitney, $p < 0.05$). Les concentrations en manganèse, mesurées dans les viscères des témoins laboratoire et des escargots transférés, ne sont pas significativement différentes (Mann Whitney, $p < 0.05$). Dans le cas du cuivre et du chrome, les concentrations mesurées dans les viscères des témoins ne sont pas significativement différentes de celles présentes dans les viscères des escargots transférés sur les stations 2-3-4 mais elles sont significativement supérieures à celles mesurées dans les viscères des escargots transférés au niveau de S1.

Les concentrations en cuivre, cadmium et chrome, mesurées dans les viscères des escargots transférés sur la station 1, sont significativement inférieures à celles des escargots placés sur les trois autres stations, présentant entre elles des concentrations non significativement différentes (Mann Whitney, $p < 0.05$). En ce qui concerne le zinc, ce sont les escargots transférés sur la station 2 qui présentent les concentrations les plus faibles dans leurs viscères alors que les concentrations mesurées dans les escargots placés sur S1, S3 et S4 ne sont pas significativement différentes entre elles (Mann Whitney, $p < 0.05$). Dans le cas du manganèse et du plomb, les escargots transférés sur S1 et S2 présentent des concentrations similaires, significativement inférieures aux concentrations mesurées dans les escargots transférés sur S3 et S4, ces dernières concentrations n'étant pas significativement différentes entre elles (Mann Whitney, $p < 0.05$). Enfin, en ce qui concerne le fer et le nickel, toutes les concentrations mesurées dans les viscères des escargots des quatre stations ne

sont pas significativement différentes entre elles (Mann Whitney, $p < 0.05$). Les grilles de contamination des viscères définies par Pihan (2001) permettent d'établir l'indice global de contamination polymétallique IGCPM du site en 2002, au niveau de chacune des stations (Tableau 34).

Tableau 34 : Classes de contamination, concernant les viscères (Pihan, 2001), pour les « témoins labo » et les escargots transférés au niveau des stations S1-S2-S3-S4, sur le site de SOTRENOR.

	Cu	Mn	Fe	Zn	Ni	Cd	Pb	Cr	IGCPM
témoin labo	II	III	III	II	I	I	I	III	16
Station 1	I	III	IV	III	II	I	I	II	17
Station 2	II	III	IV	III	II	I	I	III	19
Station 3	II	IV	IV	III	II	I	II	III	21
Station 4	II	III	IV	III	II	I	II	III	20

Les témoins laboratoire présentent un indice global de contamination polymétallique inférieur aux indices atteints par les escargots transférés, avec un maximum de 21 au niveau de la station 3. Ces données confirment le gradient de contamination des stations, sur le site de SOTRENOR, visible sur les histogrammes de la Figure 35 :

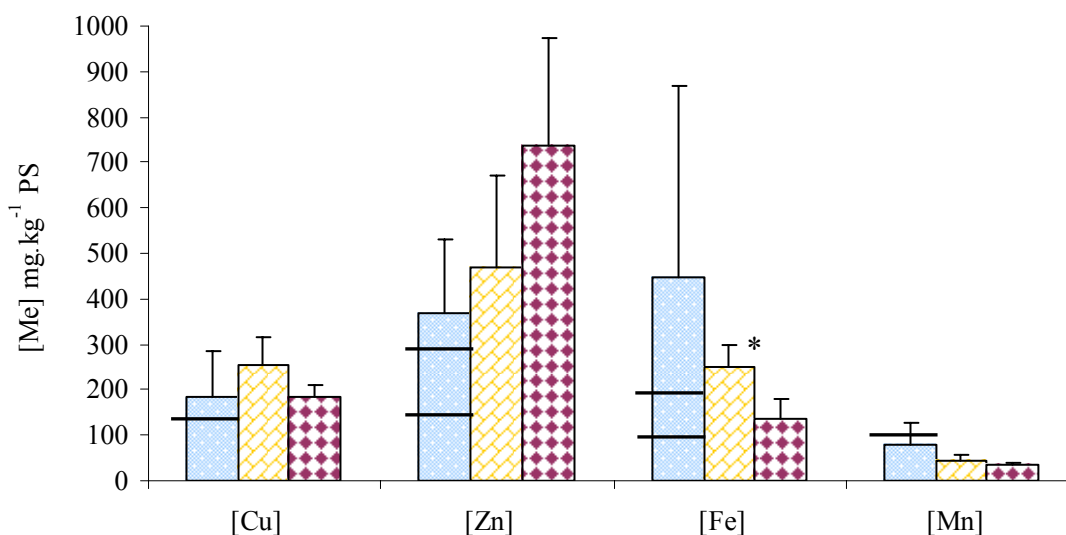
Station 3 > Station 4 > Station 2 > Station 1.

III.2.1.3.2. Concentrations en métaux dans les escargots autochtones récoltés

Les escargots autochtones du site de SOTRENOR appartiennent à trois espèces différentes :

- *Helix aspersa aspersa* H.a.a. (n=8) récoltés au niveau de la station 2, sur des chardons.
- *Monacha cartusiana* M.c. (n=4) récoltés au niveau de la station 3, sur des herbes hautes.
- *Ceruella virgata* C.v. (n=4) récoltés au niveau de la station 3, sur des herbes hautes.

Les concentrations mesurées dans les viscères des escargots sont présentées sur la Figure 36.



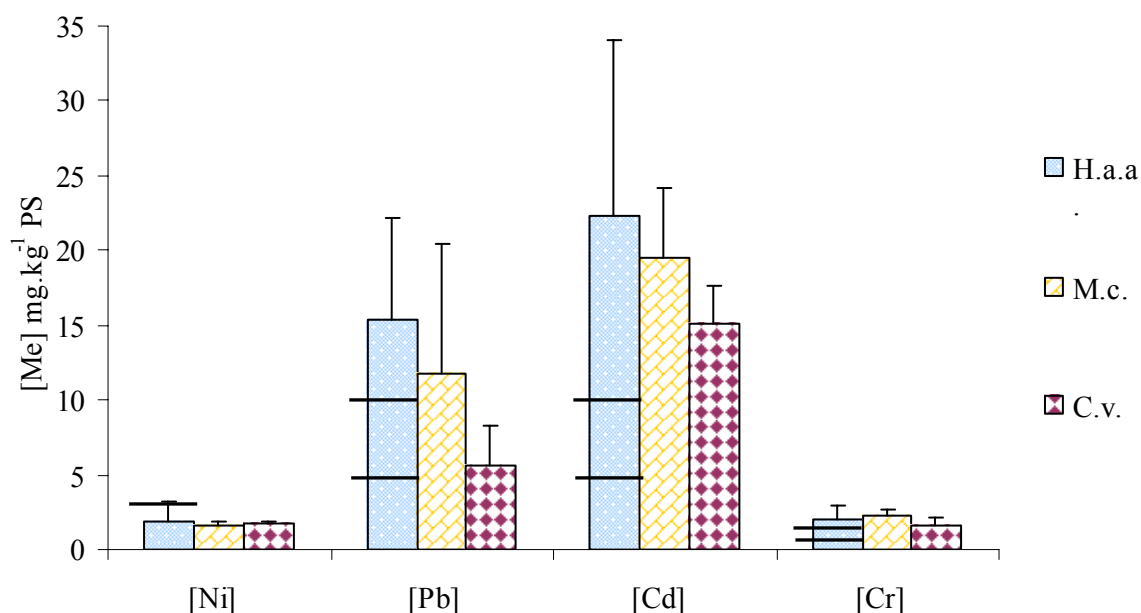


Figure 36 : Concentrations en éléments métalliques dans les viscères des escargots autochtones récoltés sur le site de SOTRENOR, avec les niveaux des grilles de contamination définies par Pihan (2001) pour les H.a.a. autochtones récoltés (* : différence significative entre M.c. et C.v., Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Au niveau de la station 3, les concentrations en éléments métalliques mesurées dans les viscères des escargots autochtones récoltés M.c. et C.v. ne sont pas significativement différentes entre elles, excepté dans le cas du fer, pour lequel les concentrations mesurées dans M.c. sont significativement supérieures à celles trouvées dans C.v. (Mann-Whitney, $p < 0.05$). Les concentrations en fer, manganèse et nickel trouvées dans les viscères des escargots H.a.a., transférés au niveau de la station 3, sont significativement supérieures à celles mesurées dans les viscères des autochtones M.c. et C.v.. L'inverse est observable pour le zinc et le cadmium : les concentrations trouvées dans les viscères des H.a.a. transférés sur la station 3 sont significativement inférieures à celles mesurées dans les autochtones de la station (Mann-Whitney, $p < 0.05$). Dans le cas du cuivre et du plomb, alors que les concentrations dans les viscères des autochtones M.c. sont significativement supérieures à celles présentes dans les H.a.a. transférés, les concentrations trouvées dans les viscères des autochtones C.v. ne sont pas significativement différentes de celles présentes dans les transférés. Enfin, en ce qui concerne le chrome, les concentrations mesurées dans les viscères des H.a.a. transférés ne sont pas significativement différentes de celles présentes dans les viscères de M.c. mais sont significativement supérieures de celles trouvées dans les viscères de C.v. (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Les concentrations mesurées dans les viscères des *Helix aspersa aspersa* récoltés sur le site, à proximité de l'implantation des microcosmes de la station 2, appartiennent à la classe III de contamination (Pihan, 2001) en ce qui concerne le zinc ($370.43 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS), le fer ($446.35 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS), le plomb (15.42 mg.kg^{-1} PS), le cadmium (22.35 mg.kg^{-1} PS) et le chrome (1.97 mg.kg^{-1} PS), à la classe II pour le cuivre (182.7 mg.kg^{-1} PS) et la classe I pour le nickel (1.86 mg.kg^{-1} PS) et le manganèse (Tableau 35).

Tableau 35 : Classes de contamination des escargots H.a.a. transférés sur la station 2, comparées à celles des H.a.a. autochtones récoltés au niveau de cette même station.

H.a.a.	Cu	Zn	Fe	Mn	Ni	Pb	Cd	Cr	IGCPM
<i>Transférés</i>	II	III	IV	III	II	I	I	III	19
<i>Autochtones</i>	II	III	III	I	I	III	III	III	19

Les concentrations en cuivre, zinc, fer, nickel et chrome mesurées dans les escargots autochtones *Helix aspersa aspersa* ne sont pas significativement différentes de celles trouvées dans les viscères des escargots transférés en station 2. Les concentrations en manganèse mesurées dans les viscères des H.a.a. transférés sont significativement supérieures à celles trouvées dans les viscères des H.a.a. autochtones de la station 2. A l'inverse, les concentrations en plomb et en cadmium, mesurées dans les viscères des H.a.a. transférés sont significativement inférieures à celles mesurées dans les viscères des H.a.a. autochtones (Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Les indices globaux de contamination polymétallique obtenus, au niveau de la station 2, par les H.a.a. transférés et autochtones sont égaux mais présentent une signification différente compte tenu de la présence, dans les autochtones, de plomb et de cadmium en quantités supérieures (classe III).

III.2.1.4. Caractérisation du sol et du trèfle du site

Les concentrations en éléments métalliques, mesurées dans le sol des quatre stations du site de SOTRENOR, sont présentées sur la Figure 37.

Les caractéristiques physico-chimiques de ce sol sont les suivantes : pH 8.3, 36.7% de sable et 49.8% de limons, teneur en matières organiques 126.1 g.kg^{-1} et capacité d'échange cationique 8.2 cmol.kg^{-1} .

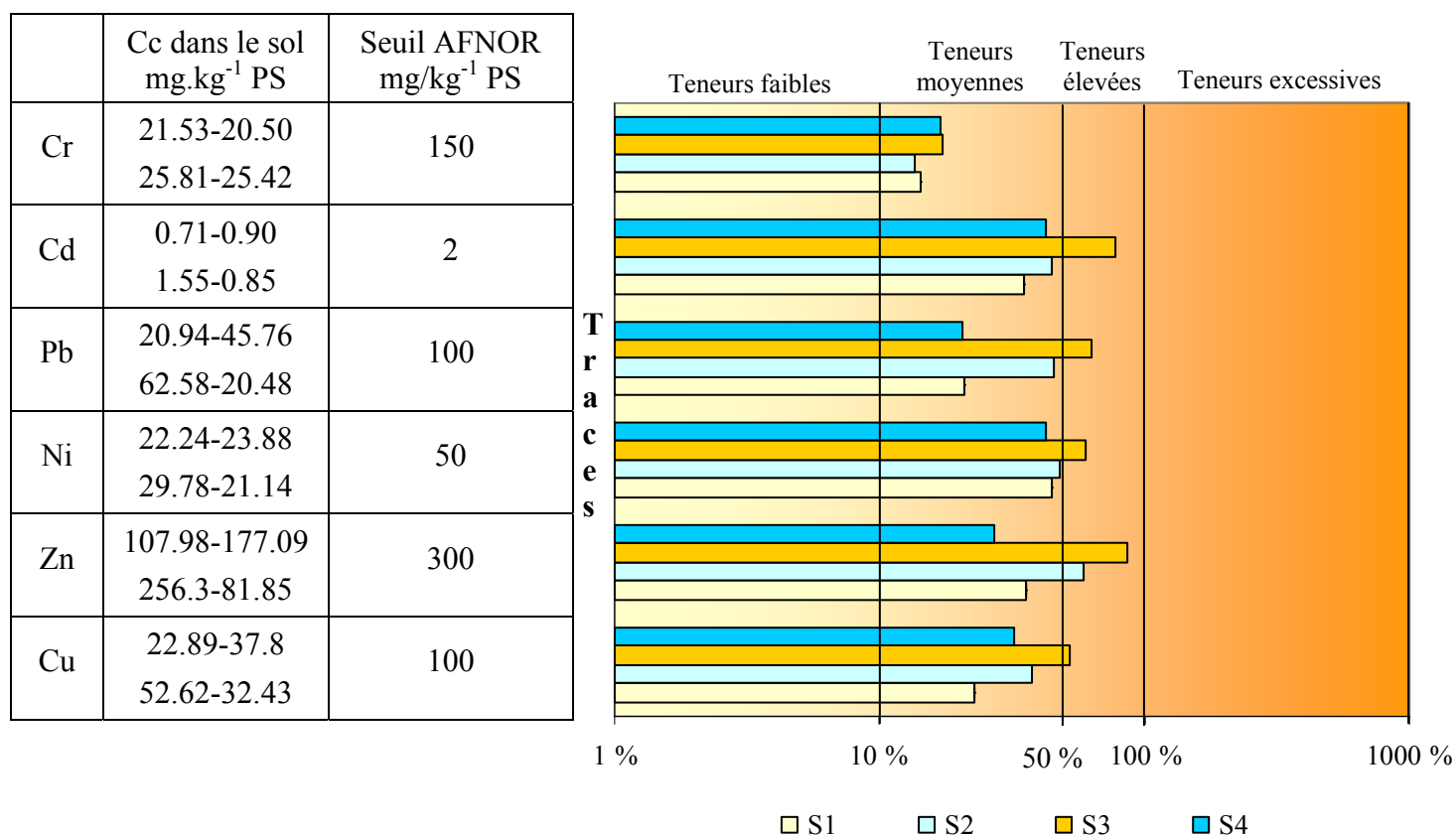


Figure 37 : Concentrations (Cc) en éléments métalliques, dans le sol des quatre stations du site de SOTRENOR (S1-S2/S3-S4), évaluées par rapport au seuil fixé par la norme AFNOR NF U 44-041 (100 % = seuil AFNOR).

Alors qu’au niveau des stations 1 et 4, les teneurs en éléments métalliques mesurées sont moyennes pour tous les métaux étudiés, pour la station 2, seules les concentrations en zinc correspondent à des teneur élevées (177.09 mg.kg-1 PS). En ce qui concerne la station 3, tous les métaux excepté le chrome sont présents dans le sol à des teneurs élevées, proches des seuils fixés par l’AFNOR dans le cas du Zn (256.3 mg.kg⁻¹ PS) et cadmium (1.55 mmg.kg⁻¹ PS).

En tenant compte des seuils en vigueur aux Pays Bas (VROM Ministry, 1997), les stations 2 et 3 présentent des teneurs en cuivre, zinc et cadmium supérieures aux seuils de référence (valeur A) correspondants. La station 4 présente une concentration en cadmium de 0.85 mg.kg⁻¹ PS, dépassant légèrement la valeur de référence A du cadmium de 0.8 mg.kg⁻¹ PS.

En se référant aux valeurs de constat d’impact pour un usage industriel, soit non sensible (VCIuns, Annexe 7), toutes les concentrations en éléments métalliques dans le sol du site sont inférieures aux VCIuns correspondantes.

Par rapport aux données de la littérature concernant les concentrations en éléments métalliques dans les sols industriels, les concentrations mesurées dans le sol de SOTRENOR sont conformes aux niveaux de contamination présents sur ces sites (Thuy *et al.*, 2000 ; Facchinelli *et al.*, 2001) dans le

cas du cuivre, du nickel, du cadmium et du chrome. En ce qui concerne le plomb et le zinc, les teneurs retrouvées au niveau de la station 3 sont supérieures aux données fournies par ces études (Tableau 3, Synthèse Bibliographique). Toutefois, il apparaît clairement que le site présente un niveau de contamination réduit, les teneurs présentes dans divers sols industriels pouvant atteindre jusqu'à 2020 mg Cu.kg⁻¹ PS (Kabata-Pendias et Pendias, 1992), 12400 mg Zn.kg⁻¹ PS (Kabata-Pendias et Pendias, 1992), 20400 mg Mn.kg⁻¹ PS (van Straalen *et al.*, 2001), 11000 mg Pb.kg⁻¹ PS (Samsøe-Petersen *et al.*, 2002), 26000 mg Ni.kg⁻¹ PS (Kabata-Pendias et Pendias, 1992), 336 mg Cd.kg⁻¹ PS (Kabata-Pendias et Pendias, 1992) et 10000 mg Cr.kg⁻¹ PS (Kabata-Pendias et Pendias, 1992).

A partir de ces données, un classement des stations en fonction de leurs teneurs en éléments métalliques totales peut être réalisé, suivant un gradient de contamination décroissant :

Station 3 > Stations 2-4 > Station 1.

Les concentrations en éléments métalliques mesurées dans le trèfle semé au niveau des quatre stations du site sont présentées sur la Figure 38.

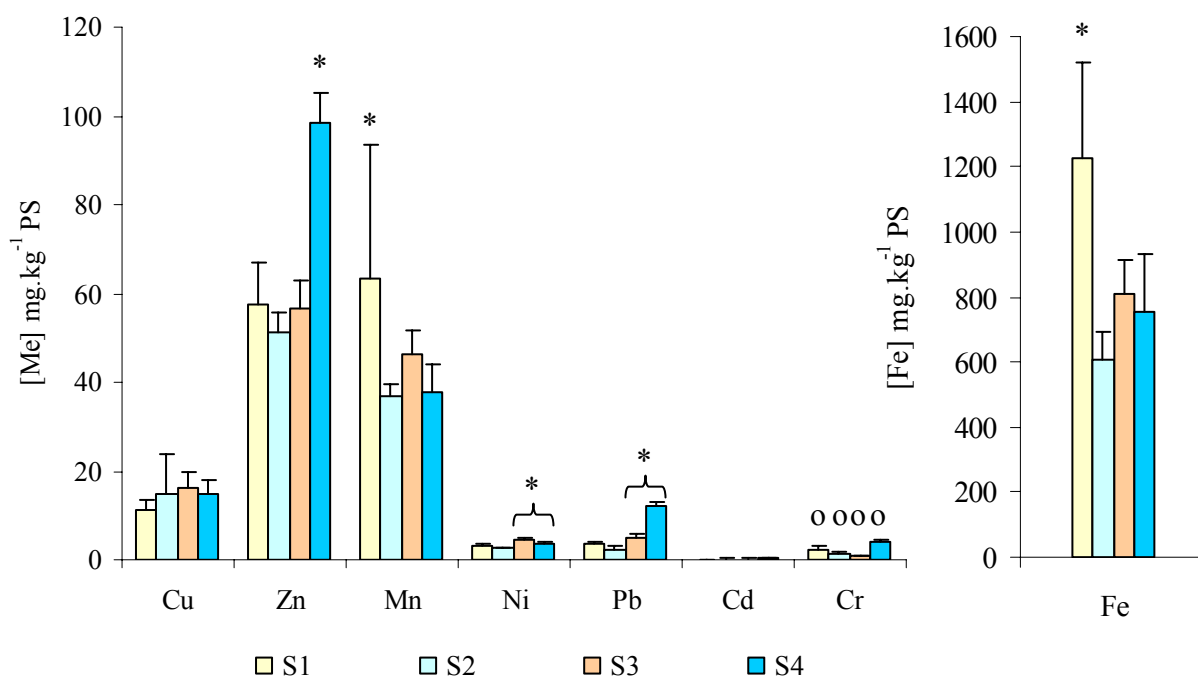


Figure 38 : Concentrations en éléments métalliques dans le trèfle semé sur les stations S1-S2-S3-S4 du site de SOTRENOR, en mg.kg⁻¹ PS (* : différence significative avec concentration supérieure à celle des autres stations ; o : différence significative entre toutes les stations, Mann-Whitney, $p < 0.05$).

Les concentrations en cuivre et en cadmium ne sont pas significativement différentes entre les quatre stations (Mann Whitney, $p < 0.05$). Dans le cas du zinc, la concentration mesurée dans le

trèfle de la station 4 est significativement supérieure à celles mesurées au niveau des stations 1-2-3, ces dernières ne présentant pas de différence significative entre elles (Mann Whitney, $p < 0.05$). En ce qui concerne le fer et le manganèse, les concentrations mesurées dans le trèfle au niveau des stations 2-3-4 ne sont pas significativement différentes entre elles mais elles sont significativement inférieures aux concentrations mesurées au niveau de la station 1 (Mann Whitney, $p < 0.05$). Pour le nickel et le plomb, les stations se divisent en deux groupes : les stations 1-2 présentent des concentrations significativement inférieures à celles mesurées au niveau des stations 3-4 (Mann Whitney, $p < 0.05$). Enfin, en ce qui concerne le chrome, les concentrations mesurées pour chacune des stations sont toutes significativement différentes entre elles et présentent le gradient décroissant suivant : station 4 > station 1 > station 2 > station 3 (Mann Whitney, $p < 0.05$).

Les concentrations en cuivre, zinc et nickel, mesurées dans le trèfle semé sur toutes les stations, correspondent aux teneurs normales rencontrées dans les parties aériennes de plantes (Kabatia-Pendias et Pendias, 1986). En ce qui concerne le plomb, alors que les teneurs mesurées dans le trèfle au niveau des stations 1-2-3 correspondent aux teneurs normales, le trèfle ayant poussé sur la station 4 présente des teneurs pouvant être critiques pour les plantes sensibles. De même pour le chrome, alors que les stations 1 et 3 présentent des teneurs normales dans le trèfle, les concentrations des plants des stations 2 et 4 sont critiques pour les plantes sensibles (Kabatia-Pendias et Pendias, 1986). Dans le cas du chrome, le trèfle des quatre stations présente des concentrations critiques.

III.2.1.5. Discussion

Au cours de cette expérience, les températures enregistrées (moyenne de 13.1°C) étaient légèrement inférieures aux optimums de croissance définis (Gomot, 1994), ainsi qu'aux recommandations issues de l'étude réalisée sur le site de CEDILOR, alors que l'hygrométrie (moyenne de 88%) était favorable à la croissance de escargots transférés. La croissance limitée peut avoir été induite par les températures faibles ou par des teneurs excessives en éléments métalliques dans le sol. Toutefois, les concentrations en cuivre, zinc, plomb, cadmium et chrome, mesurées dans le sol et le trèfle au niveau des quatre stations, sont inférieures aux NOEC, CE50 et CE20 déterminées pour la croissance, le taux de consommation ou la fécondité d'*Helix aspersa aspersa* (cf. valeurs dans tableau synthèse bibliographique).

Compte tenu des concentrations en éléments métalliques retrouvées dans les viscères des escargots, par rapport aux concentrations totales mesurées dans les sols des stations, H.a.a. apparaît comme un macroconcentreur de cuivre (BAF_{Cu} entre 2.63 et 4.85) et de cadmium (BAF_{Cd} de 2.37 au niveau de la station S4), et comme un déconcentreur de fer, manganèse, nickel, plomb et chrome (BAF

compris entre 0.02 et 0.79). Les résultats obtenus sur ce site confirment la capacité de macroconcentration du cuivre et du cadmium mise en évidence par Dallinger (1993) (Tableau 14 – Synthèse Bibliographique, BAF_{Cu} compris entre 1.5 et 10) et Viard *et al.* (2004a). En ce qui concerne le zinc, la capacité de concentration varie selon les stations de la microconcentration au niveau des stations S2 et S3 (BAF_{Zn} respectivement de 1.77 et 1.39) à la macroconcentration au niveau des stations S1 et S4 (BAF_{Zn} respectivement de 3.3 et 4.85). Il existe donc pour une même espèce (ici *Helix aspersa aspersa*) une variabilité dans la capacité bioindicatrice vis-à-vis d'un EM, le zinc dans le cas présent.

L'intérêt de la biosurveillance passive réalisée sur le site de SOTRENOR est la récolte d'escargots *Helix aspersa aspersa* autochtones, au niveau de la station 2. Ainsi, il a été possible d'évaluer la réponse des H.a.a. transférés pendant un mois de confinement sur le site (escargots âgés de 1 mois à T0), par rapport au diagnostic fourni par les individus autochtones, adultes pouvant se déplacer sur une plus grande surface. Dans le cas du cuivre, du zinc, du fer, du nickel et du chrome, les concentrations mesurées dans les escargots transférés ne sont pas significativement différentes de celles rencontrées dans les escargots autochtones : le transfert de jeunes *Helix aspersa aspersa*, pendant un mois, sur site, traduit donc bien les niveaux de contamination des sols par ces métaux. Par contre, en ce qui concerne le plomb et le cadmium, les escargots transférés sous-estiment très nettement les niveaux de contamination de la station 2 ; dans le cas du manganèse, le phénomène inverse est observé avec une bioaccumulation significativement supérieure chez les individus transférés. Il apparaît donc essentiel de coupler biosurveillance active et passive, avec si possible la récolte d'organismes de la même espèce, afin de pouvoir réaliser un diagnostic de contamination du site le plus fiable possible. Par comparaison à des individus *Helix aspersa aspersa*, récoltés en milieu autoroutier (Pihan, 2001), les concentrations en zinc, fer, cadmium et plomb, mesurées chez les H.a.a. autochtones de SOTRENOR, sont supérieures et traduisent une contamination du site historique d'origine multiple. En effet, contrairement au site de CEDILOR qui a été construit sur de la terre rapportée, le site de SOTRENOR a été installé sur une ancienne zone industrielle regroupant aussi bien les « Charbonnières de France » que EDF-GDF.

Toutefois, les caractéristiques physico-chimiques du sol de SOTRENOR doivent jouer un rôle important dans la biodisponibilité des éléments métalliques vis-à-vis des escargots et donc exercer un impact non négligeable sur leur bioaccumulation par les escargots transférés et autochtones. Cet aspect sera envisagé dans la discussion globale de ce chapitre.

L'évaluation des capacités bioindicatrices d'*Helix aspersa aspersa* de la contamination du site de SOTRENOR est présentée dans le Tableau 36.

Tableau 36 : Comparaison entre les niveaux de bioaccumulation en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés, par rapport aux témoins « laboratoire » et aux *Helix aspersa aspersa* autochtones de la station S2, et les niveaux atteints dans les sols par rapport aux seuils en vigueur en France et aux Pays-Bas (<, > : différence significative, inférieure ou supérieure, pour les stations mentionnées).

	Critère : Qualité du sol		Critère : Bioaccumulation des EM	
	Norme AFNOR	Norme Pays Bas	Transférés/T labo	Autochtones/ Transférés
Cu	<	A-B (S2-S3)	=	=
Zn	<	A-B (S2-S3)	>	=
Ni	<	< A	>	=
Pb	<	< A	>	>
Cd	<	A-B (S2-S3-S4)	>	>
Cr	<	< A	=	=

Ce site se caractérise par des niveaux en métaux dans le sol faibles puisque inférieurs dans tous les cas aux seuils définis par la norme AFNOR. La réglementation en vigueur aux Pays-Bas étant plus stricte, il apparaît alors que les seuils de qualité sont dépassés pour le cuivre et le zinc pour les stations 2 et 3, et pour le cadmium pour les stations 2-3-4, ce qui correspond à une accumulation supérieure du zinc et du cadmium dans les viscères des escargots transférés, par rapport à la station 1. Toutefois, en ne tenant compte que des différences significatives, entre stations, pour le sol et les escargots, les gradients de contamination suivants sont obtenus :

Escargots transférés station 3 > station 4 > station 2 > station 1

Teneurs dans le sol station 3 > station 2-4 > station 1

Les escargots reflètent donc bien les variations de contamination à l'échelle spatiale, sur un site.

Le sol de SOTRENOR se caractérise par des concentrations en éléments métalliques moyennes à élevées selon les stations considérées, avec le gradient de contamination décroissant suivant : S3 > S4-S2 > S1. Cette contamination du sol se retrouve dans les parties aériennes du trèfle, avec des teneurs pouvant être critiques au niveau de certaines stations, dans le cas du Cd, Pb et Cr. Le gradient décroissant de contamination est le suivant : S4 > S1 > S2 > S3. Après un mois sur le site, les concentrations atteintes dans les viscères des escargots transférés reflètent les concentrations présentes dans le sol, avec un gradient de contamination semblable à celui obtenu pour le sol : S3 > S4 > S2 > S1. De plus, dans le cas de la station 2, il s'avère que des individus adultes autochtones,

ayant prospecté une surface supérieure à celle fournie par trois microcosmes, fournissent un diagnostic de contamination importante en cadmium et en plomb. Le gradient différent obtenu pour le trèfle reflète une biodisponibilité différente des éléments métalliques vis-à-vis de la végétation et des escargots.

III.2.2. Ancienne cokerie d'Homécourt (54) (Annexe 10)

III.2.2.1. Enregistrement de la température et de l'hygrométrie

L'évolution de la température et de l'hygrométrie moyennes est représentée sur la Figure 39.

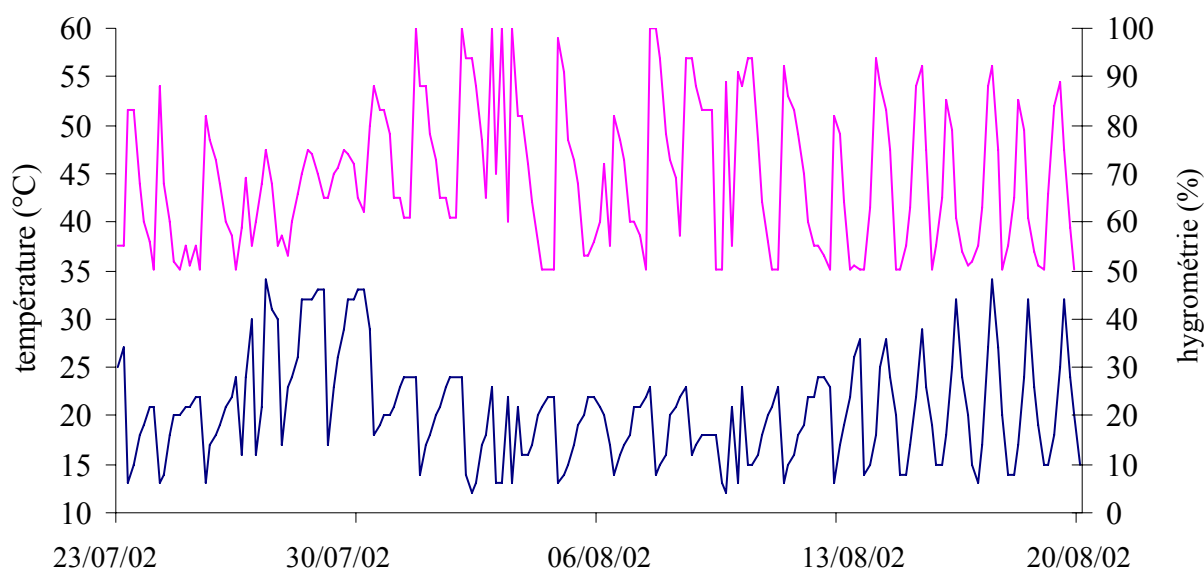


Figure 39 : Evolution de la température et de l'hygrométrie au cours de l'expérience menée sur le site d'Homécourt en 2002 ([température](#) ; [hygrométrie](#))

Les températures enregistrées au cours de l'expérience varient entre 12°C et 34°C, avec une moyenne de 20.5°C ; l'hygrométrie moyenne enregistrée est de 70%, conforme aux préférendums définis par Gomot (1994) pour une croissance optimale, en conditions de laboratoire, et aux recommandations issues de l'expérience menée à CEDILOR, dans cette présente étude, pour les expériences de biosurveillance active.

III.2.2.2. Evolution de la croissance pondérale et du diamètre moyen

Chaque semaine, les escargots sont pesés et mesurés individuellement : l'évolution de leur croissance pondérale et de leur diamètre est présentée sur la Figure 40.

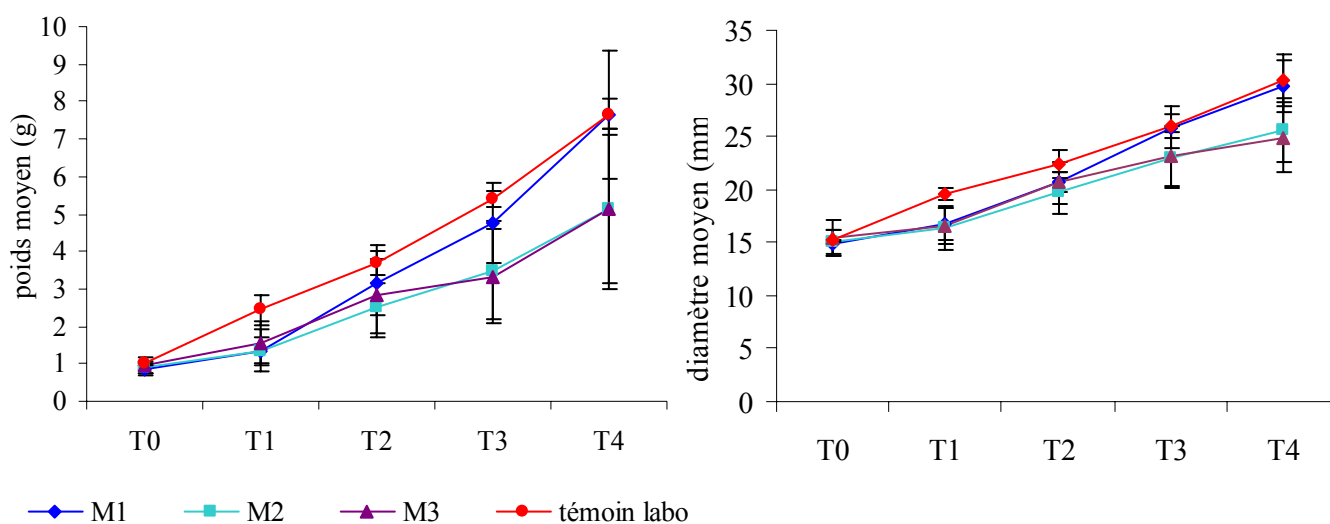


Figure 40 : Evolution du poids et du diamètre moyen des escargots transférés sur le site d'Homécourt en 2002 dans les microcosmes M1-M2-M3 et chez les témoins, placés en conditions de laboratoire

A T0, les poids moyen des escargots transférés dans les microcosmes M1-M2-M3 ne sont pas significativement différents et sont compris entre 0.85 et 0.95 g. Après quatre semaines, le poids moyen des escargots est multiplié par 6.6, avec toutefois des différences notables entre les trois microcosmes : les escargots placés dans M1 multiplient leur poids moyen par 7.6 alors que ceux transférés dans M2 et M3 le multiplient par 5.8 et 5.4, respectivement. Les escargots transférés dans les microcosmes M2 et M3 présentent un poids moyen, à la fin de l'expérience, significativement inférieur à celui des escargots transférés dans M1.

La croissance des escargots placés dans M1 rejoint, après 4 semaines, celle des escargots témoins, ayant grandi en laboratoire avec un même poids moyen de 7.6 ± 0.4 g.

En ce qui concerne l'évolution du diamètre moyen des escargots transférés, il est multiplié par 1.8 au cours de l'expérience, alors que celui des témoins labo est multiplié par 2, dans le même temps. Les différences entre microcosmes observées pour le poids moyen se retrouvent pour le diamètre : les escargots transférés dans M1 présentent un diamètre moyen de 29.78 mm, significativement supérieur à celui des escargots transférés dans M2 et M3 (25.59 et 24.87 mm, respectivement). Dans le même temps, les témoins labo multiplient leur diamètre moyen par 2 en augmentant de 15.2 ± 0.1 à 30.25 ± 2.4 mm.

III.2.2.3. Accumulation en métaux lourds dans les escargots

III.2.2.3.1. Concentrations en métaux dans les escargots transférés

Les concentrations en cuivre, zinc, fer, manganèse, nickel, plomb, cadmium et chrome, dans les viscères des escargots transférés et des témoins laboratoire, sont présentées sur la Figure 41, par

rapport aux niveaux des classes contamination définies par Pihan (2001). Les concentrations dans les pieds sont présentées en Annexe 10.

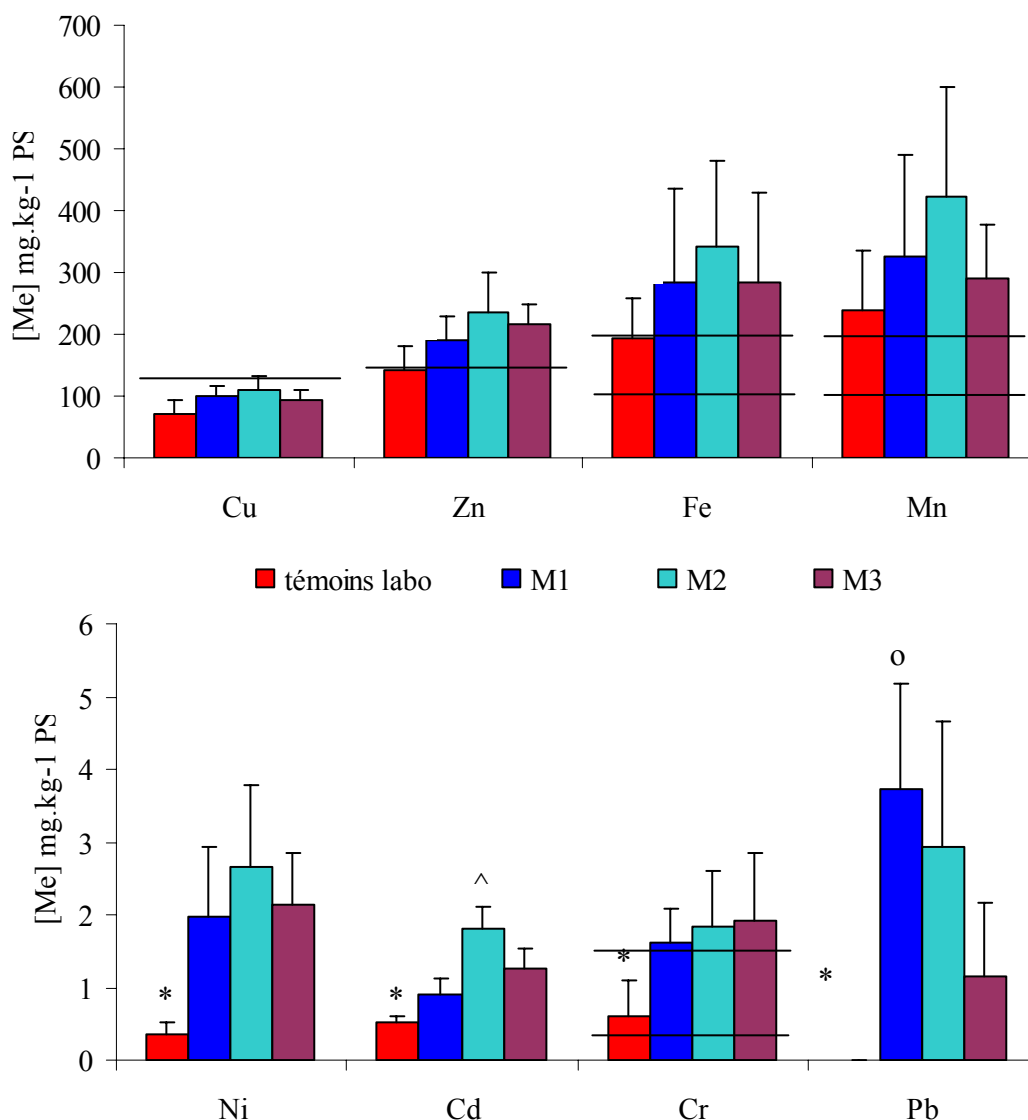


Figure 41 : Concentrations moyennes (en mg.kg⁻¹ PS) en éléments métalliques mesurées dans les viscères des escargots transférés dans les microcosmes M1-M2-M3 et dans les « témoins laboratoire », positionnées par rapport aux limites des classes de contamination élaborées par Pihan (2001) (* : différence significative entre les témoins labo et les escargots transférés ; ^ : concentration moyenne dans les escargots transférés dans M2 significativement supérieure à celle des escargots placés dans M1 et M3 ; o : concentration dans les escargots transférés dans M1 significativement supérieures à celle des escargots transférés dans M3, Test de Mann Whitney, $p < 0.05$).

Les concentrations en cuivre, zinc, fer et manganèse mesurées dans les viscères des escargots transférés, ne sont pas significativement différentes de celles mesurées dans les viscères des témoins restés en laboratoire (Mann Whitney, $p < 0.05$). Pour tous les autres métaux étudiés, les

concentrations dans les viscères des témoins sont significativement différentes de celles mesurées dans les viscères des escargots transférés : en effet, les concentrations en nickel, cadmium, chrome et plomb sont significativement inférieures dans les escargots témoins par rapport aux transférés (Mann Whitney, $p < 0.05$).

Les concentrations moyennes en cuivre, zinc, fer, manganèse, nickel et chrome, mesurées dans les viscères des escargots transférés dans chaque microcosme, ne sont pas significativement différentes entre M1, M2 et M3. Par contre, la concentration en cadmium mesurée dans les viscères des escargots transférés dans le microcosme M2 est significativement supérieure à celles des escargots transférés dans M1 et M3 et la concentration en plomb mesurée dans les escargots transférés dans le microcosme M1 est significativement supérieure à celle mesurée dans les viscères des escargots transférés dans M3 (Mann Whitney, $p < 0.05$).

Les grilles de contamination des viscères définies par Pihan (2001) permettent d'établir l'indice global de contamination polymétallique IGCPM du site en 2003 (Tableau 37).

Tableau 37 : Classes de contamination, concernant les viscères (Pihan, 2001), pour les témoins laboratoire, les escargots transférés dans les microcosmes M1-M2-M3 et classe moyenne retenue lors de cette expérience de biosurveillance active sur le site d'Homécourt.

	Cu	Mn	Fe	Zn	Ni	Cd	Pb	Cr	IGCPM
Témoin laboratoire	I	III	II	I	I	I	I	I	11
Transfert dans M1	I	III	III	II	I	I	I	II	14
Transfert dans M2	I	IV	III	II	I	I	I	III	16
Transfert dans M3	I	III	III	II	I	I	I	III	15
Classe retenue	I	III	III	II	I	I	I	III	15

L'indice global de contamination polymétallique est supérieur pour les escargots transférés par rapport aux témoins laboratoire : il y a accumulation des éléments Fe, Zn et Cr dans les viscères des escargots transférés.

Les concentrations en cuivre mesurées dans les viscères des escargots témoins et des transférés ne sont pas significativement différentes : ils appartiennent à la classe I de contamination, avec des concentrations comprises entre $70.39 \pm 21.82 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS, pour les témoins, et $108.91 \pm 22.03 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS pour les escargots transférés dans M2. Dans le cas du manganèse, bien que les concentrations dans les viscères des escargots transférés ne soient pas différentes de celles mesurées dans les témoins, différentes classes de contamination sont présentes : alors que les témoins et les escargots transférés dans M1 et M3 appartiennent à la classe III de contamination (concentrations

comprises entre $238.13 \pm 98.88 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS pour les témoins et $325.26 \pm 166.60 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS pour les escargots placés dans M1), les escargots transférés dans M2 appartiennent à la classe IV de contamination, avec une concentration de $421.88 \pm 177.74 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS, sans cependant de différence significative entre M2 et M1.

En ce qui concerne le fer et le zinc, les escargots témoins présentent des concentrations dans les viscères inférieures à celles des escargots transférés et appartiennent à des classes de contamination inférieures : dans le cas du fer, classe de contamination II pour les témoins et III pour les transférés et dans le cas du zinc, classe I pour les témoins et classe II pour les transférés, avec des différences significatives entre transférés et témoins.

Pour le nickel, le cadmium et le plomb, malgré une augmentation significative des concentrations dans les transférés, les témoins et les escargots transférés appartiennent à la même classe de contamination, la classe I. En ce qui concerne le chrome, alors que les témoins se situent à la limite des classes de contamination I et II (concentration de $0.59 \pm 0.51 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS), les escargots transférés dans M1 appartiennent à la classe de contamination II ($1.62 \pm 0.46 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS) et ceux transférés dans M2 et M3 à la classe III, sans différence significative entre les trois microcosmes.

III.2.2.3.2. Concentrations en métaux dans les escargots autochtones récoltés (*Ceriuella neglecta*)

Toutes les concentrations mesurées dans les viscères des escargots transférés dans les microcosmes ne présentent pas de différence significative entre les microcosmes, excepté dans le cas du cadmium et du plomb. Pour rendre les comparaisons plus faciles et dans un souci de clarté, les concentrations mesurées dans les escargots autochtones, appartenant à l'espèce *Ceriuella neglecta* récoltés sur le site de Homécourt, sont comparées à la concentration moyenne en métal des trois microcosmes, des H.a.a. transférés (Figure 42).

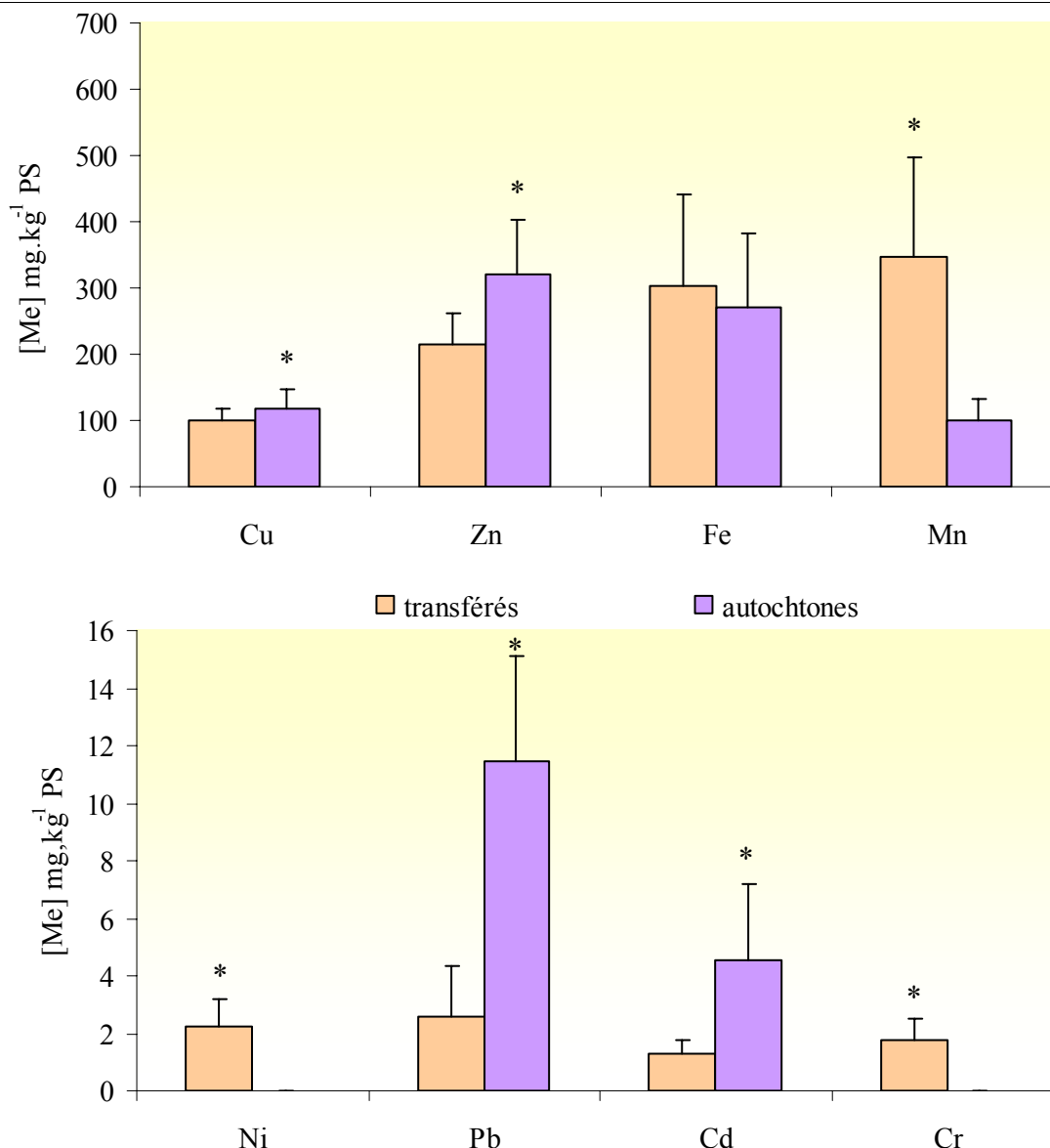


Figure 42 : Comparaison entre les concentrations en métaux mesurées dans les escargots autochtones *Ceriuella neglecta* du site d'Homécourt et les concentrations moyennes dans les escargots H.a.a. transférés dans les trois microcosmes (* : différence significative entre les concentrations dans les autochtones de l'espèce *Ceriuella neglecta* et dans les transférés de l'espèce H.a.a., Test de Mann Whitney, $p < 0.05$).

Toutes les concentrations en éléments métalliques mesurées dans les viscères des escargots transférés, excepté pour le fer, sont significativement différentes de celles mesurées dans les viscères des escargots autochtones *Ceriuella neglecta* : dans le cas du cuivre, du zinc, du plomb et du cadmium, les concentrations sont significativement supérieures dans les viscères de l'espèce autochtone alors que pour le manganèse, le nickel et le chrome, les concentrations sont significativement supérieures dans les viscères des escargots transférés (Mann Whitney, $p < 0.05$).

III.2.2.4. Caractérisation du sol et du trèfle du site

Les caractéristiques physico-chimiques du sol sont les suivantes : pH 7.9, 74.9% de sable et 16% de limons, teneur en matières organiques 319.9 g.kg^{-1} et CEC 8.5 cmol.kg^{-1} .

Les concentrations totales en éléments métalliques mesurées dans le sol de la parcelle expérimentale d'Homécourt sont présentées sur la Figure 43, positionnées par rapport aux seuils fixés par la norme AFNOR U 44-041, pour chacun des éléments (© AGRO-système).

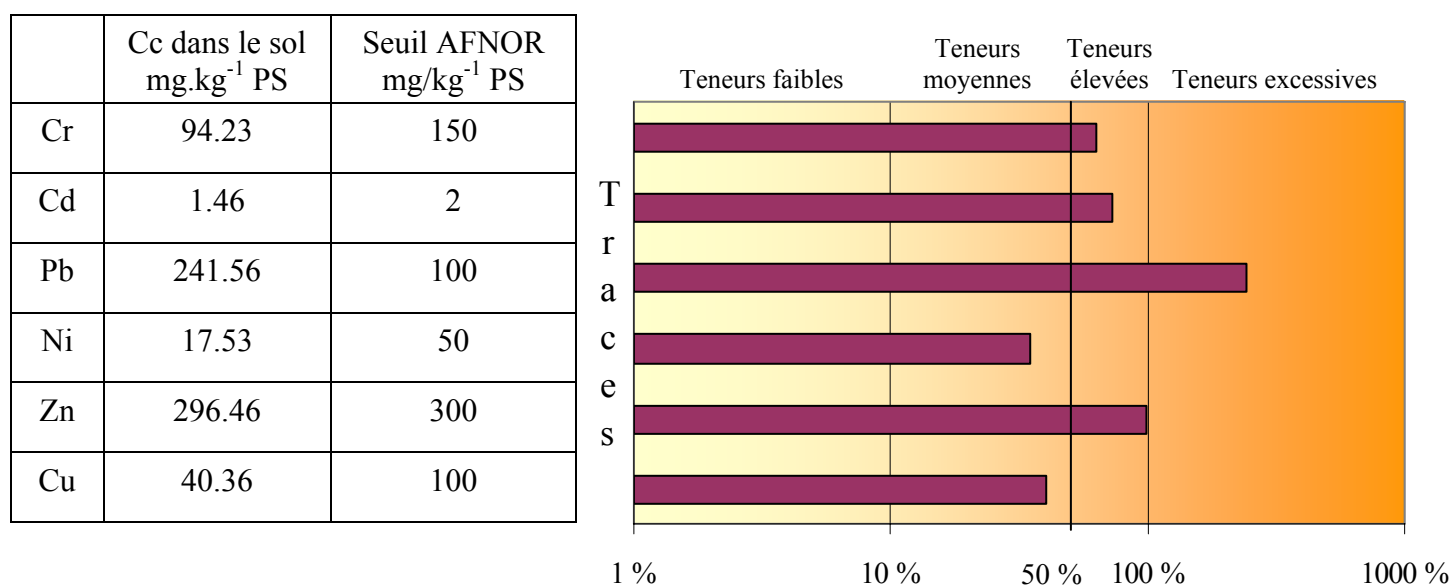


Figure 43 : Concentrations (Cc) en éléments métalliques, dans le sol de la parcelle d'étude d'Homécourt, évaluées par rapport au seuil fixé par la norme AFNOR NF U 44-041 (100 % = seuil AFNOR).

Le cuivre et le nickel sont présents, dans le sol de la parcelle d'Homécourt, à des teneurs moyennes ; en ce qui concerne le zinc, le cadmium et le chrome, les teneurs atteintes sont élevées, avec une concentration en zinc de $296.46 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS proche du seuil d'alerte défini par la Norme AFNOR. La concentration en plomb, quant à elle, est supérieure au seuil d'alerte défini par la Norme AFNOR, avec une teneur excessive de $241.56 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS.

Par rapport aux seuils en vigueur aux Pays Bas (VROM Ministry, 1997), les concentrations en zinc, plomb et cadmium dépassent les valeurs de référence (valeur A) correspondantes et la concentration en chrome (94.23 mg.kg^{-1} PS) s'en approche beaucoup (A = 100 mg.kg^{-1} PS).

Aucune des concentrations mesurées dans le sol de la parcelle ne dépasse les valeurs de constat d'impact pour un usage non sensible des sols (VCIuns, BRGM 2002). Par contre, les concentrations en chrome et plomb sont supérieures aux valeurs de définition source sol ($\text{VDSS}_{\text{Cr}} = 65 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS

et $VDSS_{Pb} = 200 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PS}$: ce sol est donc une source potentielle de pollution par le chrome et le plomb (Annexe 8, BRGM, 2002).

Les concentrations en fer et en manganèse dans le sol sont respectivement de $59.7 \pm 10.3 \text{ g.kg}^{-1} \text{ PS}$ et $1290.2 \pm 124.52 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PS}$.

Les concentrations en éléments métalliques dans la luzerne sont présentées sur la Figure 44.

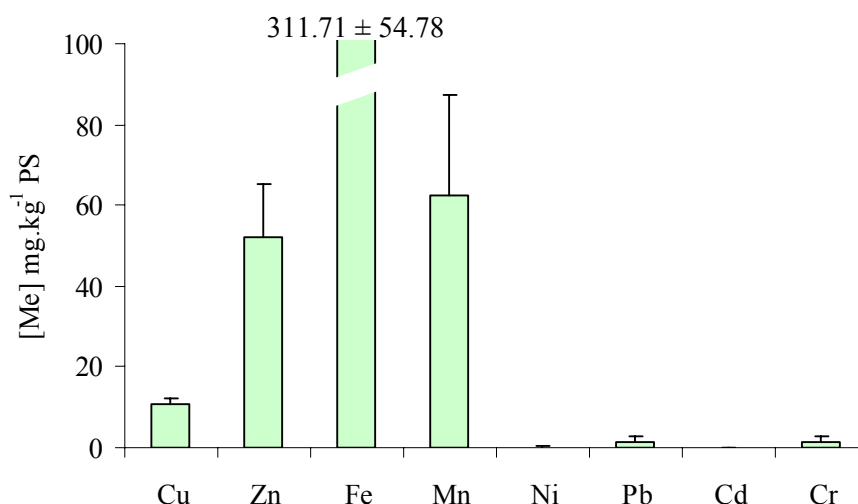


Figure 44 : Concentrations en éléments métalliques, en $\text{mg.kg}^{-1} \text{ PS}$, dans la luzerne de la parcelle d'Homécourt.

Les concentrations en cuivre, zinc, nickel, plomb et cadmium correspondent aux teneurs normales retrouvées dans les parties aériennes des plantes. Par contre, les teneurs en chrome retrouvées dans la luzerne ($1.56 \pm 1.46 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PS}$) peuvent s'avérer critique pour les plantes sensibles (Kabatia-Pendias et Pendias, 1986).

III.2.2.5. Dosages des HAPs dans le sol et les escargots transférés à Homécourt

Des échantillons de terre ont été prélevés au niveau des parcelles expérimentales, mises en place par le LIMOS, puis caractérisés après tamisage à 2mm par le laboratoire central d'analyses des sol de l'INRA (Arras). Les teneurs en HAP mesurées dans ce sol sont présentées dans le Tableau 38, conjointement aux concentrations en HAP dosées dans les escargots transférés sur ces parcelles (analyses réalisées à l'IRH, Nancy).

Tableau 38 : Dosage des 16 HAP (en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ PS) dans le pied et les viscères d'escargots transférés (n=2 individus par microcosme) et teneurs en HAP dans le sol de la parcelle expérimentale du LIMOS en mg.kg^{-1} MS (< : concentration en HAP inférieure à la valeur qui suit).

HAPs	sol	M1 pied	M1 viscères	M2 pied	M2 viscères	M3 pied	M3 viscères
Naphtalène	nd	< 90	< 63	< 63	< 34	< 48	< 34
Acénaphthylène	nd	< 54	< 37	< 37	< 20	< 28	< 20
Acénaphène	407.22	< 27	274.69	< 19	25.52	< 14	243.93
Fluorène	269.29	< 45	< 32	< 32	< 17	< 24	< 17
Phénanthrène	510.71	< 45	796.09	< 32	< 17	< 24	< 17
Anthracène	81.24	< 45	108.90	< 32	< 17	< 24	< 17
Fluoranthène	169.76	< 27	527.52	< 19	73.07	< 14	478.82
Pyrène	108.32	< 45	354.21	< 32	53.87	< 24	320.73
<i>Baa</i>	61.02	< 27	121.71	< 19	< 10	< 14	112.58
Chrysène	40.18	< 45	170.34	< 32	40.92	< 24	142.49
<i>Bbf</i>	39.71	< 27	< 19	< 19	< 10	< 14	< 10
<i>Bkf</i>	33.4	< 27	< 19	< 19	< 10	< 14	< 10
<i>Bap</i>	46.5	< 27	< 19	< 19	< 10	< 14	< 10
<i>Dbaha</i>	3.99	< 90	< 63	< 63	< 34	< 48	< 34
Bghip	19.17	< 90	< 63	< 63	84.37	< 48	93.68
<i>Ip</i>	24.61	< 90	81.19	< 63	37.19	< 48	77.97
$\Sigma 16$ HAP (US EPA)	1815	0.00	2434.65	0.00	314.93	0.00	1470.21
<i>somme Afssa</i>	-	-	322.6	-	111.19	-	254.55

Les concentrations en HAP mesurées dans le sol de la parcelle révèlent une importante contamination de cette parcelle, les 16 HAPs appartenant à la liste de l'EPA totalisant 1815 mg.kg^{-1} de matière sèche. Cette concentration est largement supérieure aux seuils en vigueur aux Pays Bas, concernant les HAP totaux (200 mg.kg^{-1} MS).

Les escargots accumulent des quantités non négligeables de HAP dans les viscères : la moyenne, pour les trois microcosmes, des 16 HAP de la liste de l'EPA est de $1406.6 \pm 1061.28 \mu\text{g.kg}^{-1}$ PS pour les escargots transférés alors qu'elle est nulle dans les témoins à l'issue de l'élevage. Les HAP principalement accumulés par les escargots sont, selon un ordre décroissant, le phénanthrène, le fluoranthène, le pyrène, l'acénaphène, le chrysène et l'anthracène, avec des concentrations supérieures à $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ PS. Le rapport entre les concentrations en HAP dans les viscères des escargots et les teneurs en HAP correspondantes dans le sol varie entre 0.67×10^{-3} (pour

l'acénaphène) et 4.24×10^{-3} (pour le chrysène), avec des coefficients supérieurs pour les HAP à 4 cycles et plus par rapport aux HAP à 3 cycles (anthracène, acénaphène et phénanthrène).

Il n'existe pas de valeurs réglementaires pour les HAP dans les denrées comestibles, comme l'escargot, sauf pour les additifs aromatiques de fumage, pour lesquels la teneur limite en benzo(a)pyrène est fixée à $0.03 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Il est donc difficile d'interpréter ces teneurs en HAP dans les escargots d'un point de vue réglementaire.

Dans le cadre de l'épisode de pollution de l'Erika, l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) a proposé des valeurs guides dans les mollusques et dans les poissons respectivement de 200 et $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ PS pour les 6 HAP suivants : benzo(a)anthracène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(a,h)anthracène et indéno(1,2,3,c,d)pyrène. D'après les valeurs mesurées dans les escargots, la somme de ces 6 HAP dans les viscères des escargots transférés dans M1 et M3 dépasse le seuil fixé par l'Afssa (respectivement 322.6 et $254.55 \mu\text{g.kg}^{-1}$) et traduit donc un risque potentiel pour les consommateurs de ces animaux, conséquence des niveaux de contamination élevés en HAP dans le sol d'Homécourt.

III.2.2.6. Discussion

Au cours de cette expérience de biosurveillance active, les conditions de température (moyenne de 20.5°C) et d'hygrométrie (moyenne de 70%) ont été favorables à une bonne croissance des escargots transférés (poids moyen multiplié par 6.6). En effet, les concentrations en cuivre, zinc, nickel, plomb, cadmium et chrome, mesurées dans le sol et la luzerne de la parcelle, dont se sont nourris les escargots transférés pendant quatre semaines, sont inférieures aux NOEC, CE50 et CE20 déterminées pour la croissance, le taux de consommation ou la fécondité d'*Helix aspersa aspersa* (cf. valeurs dans les tableaux de la Synthèse Bibliographique). Lors d'une étude des sols à proximité d'un site métallurgique, Van Straalen *et al.* (2001) ont trouvé des concentrations variant entre 13.7 et $58.6 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$ PS, 18.8 et $54.6 \text{ mg Fe.kg}^{-1}$ PS, 48 et $276 \text{ mg Zn.kg}^{-1}$ PS, 1260 et $20400 \text{ mg Mn.kg}^{-1}$ PS, 9.6 et $54.9 \text{ mg Pb.kg}^{-1}$ PS et 13.4 et $43.1 \text{ mg Ni.kg}^{-1}$ PS. Les teneurs rencontrées sur le site d'Homécourt sont conformes à ces valeurs excepté pour le plomb, pour lequel le site d'Homécourt présente une concentration plus importante ($241.56 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS).

Par rapport à l'étude menée par Samsoe-Petersen *et al.* (2001), sur un sol de faible contamination présentant des teneurs semblables en cuivre (58 mg.kg^{-1} PS), zinc (259 mg.kg^{-1} PS) et nickel (11 mg.kg^{-1} PS), les concentrations en Cu, Zn et Ni retrouvées dans la luzerne du site d'Homécourt sont supérieures à celles mesurées dans la laitue ($0.53 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$ PS, $2.28 \text{ mg Zn.kg}^{-1}$ PS et $0.02 \text{ mg Ni.kg}^{-1}$ PS).

Compte tenu des concentrations en éléments métalliques trouvées dans les viscères des escargots, par rapport aux concentrations totales en EM mesurées dans le sol, H.a.a. apparaît comme un déconcentreur de tous les métaux excepté pour le cuivre où il y a macroconcentration. Le BAF du cuivre est de 2.5 alors que les BAF des autres métaux sont compris entre 0.01 et 0.9. Ces résultats présentent *Helix aspersa aspersa* comme un déconcentreur de plomb, ce qui est en accord avec les résultats obtenus par Viard *et al.* (2004a) lors d'une étude en milieu autoroutier. Dans le cas du zinc, alors que Dallinger (1993) classait H.a.a. dans les microconcentreurs et Viard *et al.* (2004a) dans les macroconcentreurs, ces résultats présentent H.a.a. comme un déconcentreur de zinc. Les variations de bioaccumulation d'un même métal révèlent des différences dans sa biodisponibilité pour les organismes, variant en fonction de la végétation présente sur le site mais surtout en fonction des paramètres physico-chimiques du sol : influence du pH (Ge *et al.*, 2000 ; Peakall et Burger, 2003) ou du taux de matières organiques (Singh *et al.*, 2000) par exemple.

L'évaluation des capacités bioindicatrices d'*Helix aspersa aspersa* de la contamination du site d'Homécourt est présentée dans le Tableau 39.

Tableau 39 : Comparaison entre les niveaux de bioaccumulation en éléments métalliques dans les viscères des escargots transférés, par rapport aux témoins et aux escargots autochtones, et les niveaux atteints dans les sols, par rapport aux seuils en vigueur en France (NF U 44-041) et aux Pays Bas (<, > : différence supérieure ou inférieure significative)

	Critère : Qualité du sol		Critère : Bioaccumulation des EM	
	NF U 44-041	Norme Pays Bas	H.a.a. transférés / H.a.a. témoins	Autochtones C.n. / H.a.a. transférés
Cu	< seuil	< A	=	>
Zn	= seuil	A-B	>	>
Ni	< seuil	A-B	>>	<
Pb	>> seuil	B-C	>>>	>>>
Cd	< seuil	A-B	>	>>
Cr	< seuil	< A	>	<

Ce tableau met en évidence une relation étroite entre les niveaux de contamination en éléments métalliques dans le sol et leur accumulation dans les viscères des escargots. Pour le cuivre, les faibles teneurs observées dans le sol se traduisent par une accumulation non significative du métal dans les viscères des transférés, par rapport aux individus témoins. Les autochtones C.n., évoluant sur le site depuis une période plus longue, présentent une accumulation significative. Dans le cas du chrome, alors que les teneurs dans le sol sont faibles, les escargots transférés ont tout de même

accumulé ce métal en quantité supérieure par rapport aux témoins. En ce qui concerne le zinc, le nickel, le plomb et le cadmium, le seuil fixé par la norme AFNOR et/ou le seuil en vigueur aux Pays bas sont dépassés et se traduisent par des accumulations importantes dans les viscères des transférés et des autochtones. Si on prend comme exemple le plomb, il est présent en quantité excessive dans le sol et les concentrations dans les viscères des escargots transférés sont multipliées par 2.5 par rapport aux témoins « laboratoire » et par 6 par rapport aux escargots autochtones C.n.

Le sol d'Homécourt se caractérise par une importante contamination en plomb et en HAP, une contamination moyenne en Zn, Cd et Cr, et une faible contamination en Cu et Ni. La luzerne, ayant poussé sur ce sol, présente des teneurs normales en éléments métalliques dans ses parties aériennes, excepté pour le chrome, dont les concentrations atteintes peuvent être critiques pour les plantes sensibles. Après un mois sur le site, les escargots transférés présentent une contamination importante en Cr, une faible contamination en Zn et une absence de contamination en Cu, Ni, Cd et Pb. L'absence de contamination en Cu et Ni dans le sol et la luzerne concorde bien avec la classe I de non contamination des escargots pour ces métaux. En ce qui concerne le Zn, le Cr et les HAP, les teneurs trouvées dans les escargots reflètent la contamination du site, visible au niveau du sol et de la végétation. Dans le cas du plomb et du cadmium, même si les escargots transférés n'appartiennent qu'à la classe I de contamination, les concentrations trouvées dans les viscères sont significativement supérieures à celles des témoins et reflètent donc la contamination du sol par ces éléments. De plus, les escargots autochtones récoltés confirment la contamination du site en plomb et cadmium.

III.2.3. Intérêt des escargots autochtones dans le diagnostic de sites industriels

Les résultats de bioaccumulation obtenus soulignent les différences inter espèces de bioaccumulation des éléments métalliques. D'une part, les escargots autochtones de l'espèce C.n., récoltés sur la parcelle d'Homécourt, présentent des concentrations en zinc, plomb et cadmium supérieures à celles des transférés et importantes dans le cas du zinc et du plomb : si on leur appliquait les grilles de contamination définies par Pihan pour *Helix aspersa aspersa*, ils appartiendraient respectivement, aux classes III, III et I, avec un indice global de contamination polymétallique de 14. D'autre part, malgré un temps de séjour des autochtones sur le site *a priori*

supérieur à celui des transférés, les autochtones présentent une accumulation inférieure en manganèse, nickel et chrome. Dans le cas du manganèse, cette spécificité a déjà été observée par Pihan (2001) ainsi que par Menta et Parisi (2001). Ces derniers ont réalisé une étude comparative des concentrations en métal dans *Helix aspersa*, *Helix pomatia* et *Arion rufus*, dans une zone semi rurale du nord de l'Italie : *H. aspersa* présente des concentrations en manganèse de 299.16 ± 69.31 mg.kg⁻¹ PS, dans la glande digestive, significativement supérieures à celles observées dans les viscères d'*H. pomatia* (210.78 ± 32.25 mg.kg⁻¹ PS) et de *A. rufus* (92.01 ± 5.61 mg/kg⁻¹ PS). Il en est de même pour les concentrations en zinc, fer et plomb. La variation des concentrations en éléments métalliques, selon les espèces de gastéropodes, dépend de l'état physiologique des organismes, de leur âge, des conditions environnementales et des différentes pollutions anthropiques des écosystèmes (Bohac et Pospisil, 1989). Ainsi, dans une étude menée en 1996, Rabitsch a montré que les concentrations en éléments métalliques augmentent avec l'âge des individus : sur un même site, les organismes juvéniles présentent des concentrations en cadmium et zinc inférieures à celles observées chez les adultes de la même espèce.

Ces constatations confirment l'importance de la recherche de gastéropodes autochtones sur les sites d'études afin d'avoir une vision globale de la contamination des sites : les escargots transférés renseignent, par comparaison à des abaques connues, sur le niveau de contamination du site après une mise en présence de 1 mois au stade H.a.a. jeune, alors que les organismes autochtones nous renseignent sur la contamination du site, intégrée à partir d'un temps de présence supérieur de l'ordre de 1 à plusieurs années, au stade adulte. C'est l'intégration de ses deux sources d'informations qui permet la réalisation d'un diagnostic complet et fiable. Ainsi, les niveaux élevés en Zn, Pb et Cd rencontrés sur la parcelle d'Homécourt sont l'héritage des activités passées de ce site, une ancienne cokerie. Par comparaison à des individus de la même espèce *Ceriuella neglecta*, prélevés en milieu autoroutier (Pihan, 2001), les concentrations mesurées en zinc, fer, plomb et cadmium sont supérieures et traduisent l'origine sidérurgique de la contamination du site d'Homécourt.

III.3. Evaluation des risques sanitaires

Pour les trois sites étudiés, les risques sanitaires liés à la consommation d'escargots provenant de ces sites ont été évalués.

Les quantités de métaux apportées aux consommateurs ont été comparées aux doses hebdomadaires tolérables (DHT) pour le cuivre, le plomb et le cadmium, et à la dose journalière recommandée (DJR) pour le zinc. Les valeurs de DHT et DJR sont disponibles sur le site de l'OMS. Pour un

adulte d'un poids moyen de 60kg, elles correspondent à 35mg de cuivre, 1750µg de plomb, 490µg de cadmium et entre 12 et 15mg de zinc, selon le sexe.

Tout d'abord, plusieurs hypothèses sont à formuler : un homme mange en moyenne une douzaine d'escargots au cours d'un repas, le poids moyen (sans la coquille) d'un escargot est de 4.5g et le pourcentage d'eau moyen dans un escargot est de 90% (poids sec = 10% poids frais).

Ensuite, les DHT fournies par l'OMS sont rapportées à la quantité de métal correspondante apportée par **un** escargot : les DHT sont donc divisées par 12 (hypothèse 1) et on obtient la « quantité de métal/escargot » soit la colonne 3 du tableau 40. Pour obtenir la concentration en métal dans un escargot, il faut rapporter la valeur précédente au poids moyen d'un escargot adulte, soit 4.5g : on obtient alors une concentration en mg.kg⁻¹ d'escargot frais, notée [escargot] mg.kg⁻¹ poids frais, soit la colonne 4 du tableau 40. Sachant qu'un escargot est composé à 90% d'eau, cette concentration est enfin convertie en mg.kg⁻¹ de poids sec, valeur inscrite dans la dernière colonne du Tableau 40.

Tableau 40 : Détermination des concentrations en métal tolérables dans les escargots, lors de leur consommation, à partir des doses hebdomadaires tolérables (DHT) pour le cuivre, le plomb et le cadmium, et de la dose journalière recommandée (DJR) pour le zinc, fournies par l'OMS.

Métal	DHT _{Cu, Pb, Cd} DJR _{Zn}	Quantité métal/escargot	[escargot] mg.kg ⁻¹ poids frais	[escargot] mg.kg ⁻¹ poids sec
Cu	35 mg	2.92 mg	648.88	6488.9
Pb	1750 µg	145.83 µg	32.4	324
Cd	490 µg	40.83 µg	9.073	90.7
Zn	13.5 mg	1.13 mg	251.11	2511.1

Pour chaque métal, ces valeurs sont alors comparées aux concentrations retrouvées dans les viscères des escargots transférés. Toutefois, il faut garder à l'esprit que les DHT et la DJT sont calculées, par l'OMS, en prenant déjà en compte des facteurs de sécurité.

Les escargots transférés sur le site d'Homécourt présentent les concentrations suivantes : 100.85 mg Cu.kg⁻¹ PS, 2.60 mg Pb.kg⁻¹ PS, 1.32 mg Cd.kg⁻¹ PS et 214.42 mg Zn.kg⁻¹ PS. La consommation d'une douzaine d'escargots récoltés sur ce site ne présente donc pas de risque pour la santé humaine.

Dans le cas du site de Sotrenor, les concentrations dans les escargots transférés au niveau des quatre stations sont les suivantes : 134.65 mg Cu.kg⁻¹ PS, 4.63 mg Pb.kg⁻¹ PS, 1.60 mg Cd.kg⁻¹ PS et

355.78 mg Zn.kg⁻¹ PS. La consommation d'une douzaine d'escargots provenant de ce site ne présente donc pas de risque pour la santé humaine.

En ce qui concerne le site d'Hargarten aux Mines, les concentrations mesurées dans les escargots transférés sont les suivantes : 209.3 mg Cu.kg⁻¹ PS, 55.98 mg Pb.kg⁻¹ PS, 2.05 mg Cd.kg⁻¹ PS et 435.8 mg Zn.kg⁻¹ PS. La consommation d'une douzaine d'escargots provenant de ce site ne présente donc pas de risque pour la santé humaine.

Par comparaison aux teneurs mesurées dans les escargots témoins de laboratoire des expériences de biosurveillance réalisées, provenant de l'élevage de l'Université de Metz, les concentrations en cadmium et plomb sont toujours inférieures aux doses hebdomadaires tolérables rapportées à un escargot, alors que les concentrations en zinc sont dans tous les cas supérieures à la dose journalière recommandée.

CONCLUSIONS DE LA PREMIERE PARTIE

Les précédentes études de biosurveillance réalisées en milieu autoroutier ou en milieu industriel ont souligné l'importance de connaître les concentrations des contaminants dans tous les compartiments de l'écosystème, afin de pouvoir évaluer au plus juste l'impact des activités anthropiques sur l'environnement.

Le diagnostic de sites doit donc passer, désormais, par une intégration des données concernant le sol et la végétation, afin d'interpréter de manière fiable les variations de comportement observées au niveau des organismes bioindicateurs transférés sur les sites. Ainsi, dans le cas de biosurveillance de sites à l'aide de l'organisme sentinelle *Helix aspersa aspersa*, leur transfert sur des parcelles semées de trèfle permet des comparaisons entre sites et une meilleure compréhension des interactions entre le sol, la végétation et l'escargot.

La réalisation d'expériences de biosurveillance, avec transfert d'escargots dans des microcosmes améliorés (sur une parcelle de trèfle semé au préalable et avec apport d'eau par une bougie poreuse), nous a permis de valider ce protocole d'étude de la bioaccumulation des éléments métalliques, sous réserve des conditions environnementales pouvant limiter la croissance des organismes quand les températures sont trop basses.

C'est dans ce contexte que nous nous sommes alors intéressés à l'influence des éléments métalliques, présents dans l'environnement ou dans la nourriture, sur les escargots d'élevage et leur devenir dans l'organisme. Dans un premier temps, une étude écotoxicologique a donc été entreprise afin d'évaluer leurs effets potentiels et leur devenir au cours d'un cycle d'élevage, au sein de trois élevages hélicoles français.

Ensuite, des escargots d'élevage ont été intoxiqués par de la poudre de cuivre afin d'identifier les phénomènes de détoxication de ce métal et de préciser sa localisation cellulaire.

RESULTATS

Deuxième Partie

*Etude écotoxicologique appliquée concernant le cuivre :
problèmes liés à l'héliciculture et accumulation.*

CHAPITRE IV PROBLEMATIQUE DE LA SUPPLEMENTATION EN ELEMENTS METALLIQUES, DONT LE CUIVRE, DE LA NOURRITURE DES ESCARGOTS D'ELEVAGE ET COMPORTEMENT DES ELEMENTS METALLIQUES.

Cette étude, réalisée en collaboration avec une équipe de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Lyon, a pour but d'une part, de mettre en relation l'évolution de la flore bactérienne à Gram négatif à la contamination polymétallique d'escargots d'élevage et, d'autre part, d'étudier la cinétique d'accumulation d'éléments métalliques durant un élevage. Une publication, rédigée en collaboration avec l'Ecole Vétérinaire de Lyon, a été soumise à la Revue de Médecine Vétérinaire.

Dans cette partie, les données concernant l'accumulation en éléments métalliques dans les escargots d'élevage et l'évolution des profils bactériologiques, recueillies pour trois élevages français, sont présentées afin d'identifier un lien potentiel entre éléments métalliques, bactériologie et pathologie des escargots d'élevage.

Dans l'héliciculture française, outre les troubles touchant la reproduction et connus sous les terminologies de « pontes roses » et/ou « pontes transparentes (Degez, 1992 ; Hugon, 1993 ; Rous, 1993), un syndrome mortel récent, apparemment associé à la période estivale, semble avoir été à l'origine de pertes considérables dans toute la filière hélicicole. Plusieurs hypothèses ont été avancées quant à une étiologie bactérienne, voire une intoxication par certains métaux lourds, la nourriture des escargots étant fréquemment complémentée en oligo-éléments, dont le cuivre. Quelle que soit la somme des arguments avancés, on se heurte à l'absence quasi totale de référentiels de base permettant d'étayer ces hypothèses. Par ailleurs, de plus en plus d'héliciculteurs désirant s'engager dans une démarche de reconnaissance de la qualité de leur production, il paraissait dès lors nécessaire d'étudier, en conditions d'élevage, la flore microbienne habituelle et « normale » des escargots en même temps que la présence d'éléments traces métalliques.

Dans ce cadre, l'objectif de notre étude était de préciser la nature et l'évolution, tant de la contamination polymétallique que du profil bactérien de la flore globale chez l'escargot d'élevage *Helix aspersa*, au sein de trois élevages hélicoles français. Les prélèvements ont été réalisés dans trois unités hélicoles élevant essentiellement du Gros Gris (*Helix aspersa maxima*) et définis comme suit :

élevage 1 (E1) situé dans le Maine et Loire, présentant un système d'élevage de type dit mixte, c'est-à-dire associant la phase de reproduction en enceintes à ambiance contrôlées, à la phase d'engraissement des juvéniles en parcs extérieurs (type « naisseur/engraisseur »). Cet élevage s'étend sur 4500m² et disposent de 25000 reproducteurs.

élevage 2 (E2) situé en Savoie, présentant aussi un système d'élevage mixte, « naisseur/engraisseur ». La superficie de l'élevage est de 556m², pour 32500 reproducteurs.

élevage 3 (E3) situé dans le Doubs, élevage hélicicole de type engraisseur seul. La superficie de l'élevage est de 1250m².

Les concentrations en éléments métalliques dans le sol et la végétation des élevages ont été suivies ainsi que la croissance, la bioaccumulation et la flore intestinale des escargots.

IV.1. Mortalité dans les élevages et identification bactérienne

La mortalité dans les élevages varie entre 5 et 10% ce qui correspond à une situation normale (Aubert, 1998).

Les résultats de l'identification bactérienne sont rapportés en nombre de colonies formant unité (CFU) par gramme d'escargots (en poids sec) analysé pour la bactériologie (Tableau 41.a). Ils montrent que l'escargot d'élevage *Helix aspersa* héberge de façon permanente une population bactérienne aérobie à Gram négatif quel que soit l'élevage considéré. La taille et le profil de cette flore évoluent au sein d'un même élevage, mais aussi d'un élevage à l'autre, et ce, en fonction de l'âge des animaux (Figure 45). Cette évolution indique un fort taux de colonisation dès le transfert des naissains de la salle d'éclosion aux parcs extérieurs à l'âge de 8/10 jours. Pour l'élevage E1, ce taux (28.7 CFU/g) augmente au cours des semaines suivantes pour atteindre un pic (44.6 CFU/g) en milieu d'engraissement à 3 mois d'âge. On observe ensuite une baisse notable des taux en fin d'engraissement (2.86 CFU/g) lorsque les animaux ont entre 5 et 6 mois d'âge. Pour l'élevage E2, ce taux (4.2 CFU/g) augmente progressivement au cours de la période d'élevage (7.7 CFU/g à 3 mois puis 9.1 CFU/g à 5 mois). En ce qui concerne l'élevage E3, le taux de colonisation est le plus élevé dans les naissains (56 CFU/g), baisse ensuite en fin d'engraissement avant de remonter en période d'hibernation pour atteindre 39.6 CFU/g, valeur toutefois inférieure à celle des naissains.

La culture sur milieu de Rambach s'est révélée négative quant à la présence des espèces des genres *Salmonella* et *Shigella*.

L'ensemble des résultats montre que le profil bactérien varie d'un élevage à l'autre. La flore aérobie à Gram négatif comprend une population dominante d'*Aeromonas* au sein de l'élevage E1 (73%) jusqu'à 3 mois, tandis que les Entérobactéries telluriques dominent au sein de l'élevage E2 (71%) et

E3 (85.7%), à tous les stades de prélèvement. Les autres bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Chryseobacterium*, ...) représentent une part infime et peu variable de l'ensemble de la flore isolée tout au long de la période considérée au sein des élevages. La composition de cette flore bactérienne subit par ailleurs des variations d'un individu à l'autre, mais elle reste majoritairement et constamment dominée par les *Aeromonas* (*A. caviae*, *A. hydrophila*) et les Entérobactéries telluriques appartenant au genre *Escherichia* (*E. vulneris*), *Klebsiella* (*K. oxytoca*), *Pantoea*, *Citrobacter* (*C. freundii*, *C. braakii*), *Buttiauxella* (*B. agrestis*).

Tableau 41a : Composition et évolution de la flore bactérienne à Gram négatif chez les escargots des élevages E1, E2 et E3 (CFU/g ; (...)) : pourcentage de la flore totale à Gram négative ; N : Naissains ; *Aero* : *Aeromonas sp.* ; Entero : Entérobactéries).

	E1			E2			E3			
	N	3 mois	5 mois	N	3 mois	5 mois	N	3 mois	5 mois	9 mois
<i>Aero</i>	21 (73%)	40 (90%)	0.6 (21%)	0.7 (17%)	0.6 (8%)	0.5 (5%)	1 (1.8%)	-	0	34 (85.9%)
<i>Entero</i>	4.2 (15%)	3.3 (7%)	1.3 (45%)	3 (71%)	4.4 (58%)	7.6 (84%)	48 (85.7%)	-	4.2 (100%)	4.6 (11.6%)
<i>Autres Gram -</i>	3.5 (12%)	1.3 (3%)	0.96 (34%)	0.5 (12%)	2.7 (34%)	1 (11%)	7 (12.5%)	-	0	1 (2.5%)

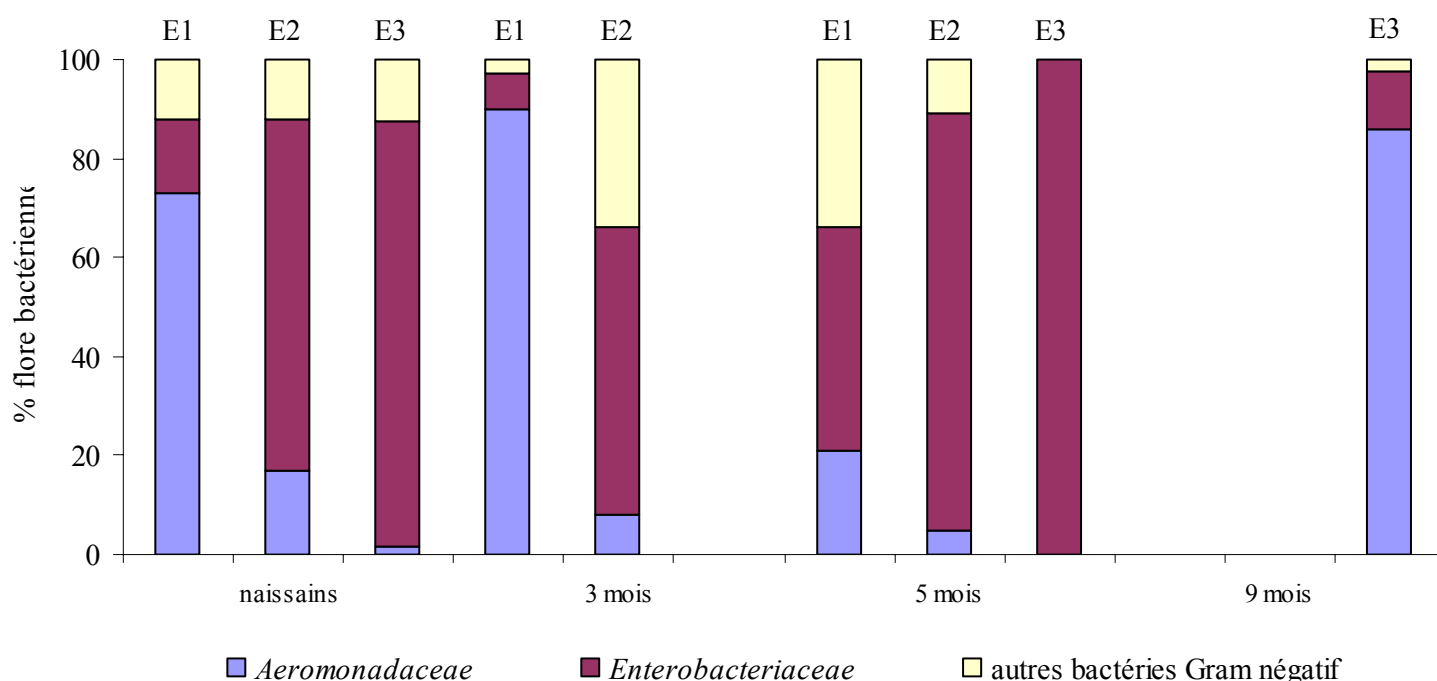


Figure 45 : Evolution de la flore bactérienne des escargots des trois élevages de leur naissance à 9 mois.

Tableau 41b : Concentration en métaux (Cu, Zn, Pb, Cd) dans le pied P, les viscères V de H.a. et dans certains éléments du biotope (sol et aliment) en mg.kg⁻¹ PS ± écart-type) et dans l'eau en µg.l⁻¹, pour les élevages E1, E2 et E3. (Ld : limites de détection, Tr : trèfle, Pl : Plantain)

		E1				E2				E3		
Œufs T0	Cu	28.9				34.6				-		
	Zn	17.4				16.9						
	Pb	< ld				< ld						
	Cd	< ld				< ld						
		Naissain	1 mois	3 mois	5 mois	Naissain	1 mois	3 mois	5 mois	5 mois	9 mois	
Escargots à différents stades de croissance	Cu P	54.1	72.3 ± 19.4	76.7 ± 23.8	102.9 ± 20.3	51	67.5 ± 16.5	43.3 ± 36.3	50.7 ± 13.5	193.28 ± 78.4	227.18±41.9	
	V		96.1 ± 12.4	90.8 ± 19	71.6 ± 10.9		45.5 ± 10.6	37.3 ± 10.6	52.7 ± 14	202.01 ± 56.74	242.51±28.3	
	Zn P	34.4	64.4 ± 11.7	62.5 ± 5	45 ± 3.1	26.8	96 ± 59	69.8 ± 7.8	62.7 ± 5.9	60.04 ± 7.61	59.63 ± 3.6	
	V		277.7 ± 52.1	232.4 ± 56.8	131.2 ± 26.4		358.3 ± 130.6	308.1 ± 107	262.2 ± 114.4	239.86 ± 81.22	224.07±56.7	
	Pb P	<ld	< ld	< ld	< ld	<ld	<ld	< ld	< ld	< ld	< ld	0.47 ± 0.32
	V			0.6 ± 0.4	0.6 ± 0.04			0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.3	< ld	< ld	0.54 ± 0.67
Cd	P	<ld	< ld	< ld	< ld	<ld	<ld	< ld	< ld	< ld	< ld	
	V			1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1			1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.3	0.91 ± 0.21	0.85 ± 0.28	
Sol	Cu	20.6 ± 2	16.3 ± 0.9		16.9 ± 1	28.2 ± 2.6	29.6 ± 2.1		29.4 ± 2.4	14.31 ± 4.08		
	Zn	104.2 ± 62.2	70.3 ± 13.3		69.1 ± 14.7	118.6 ± 11.3	118 ± 13		127.3 ± 11.7	105.03 ± 31.95		
	Pb	11.9 ± 2.1	13.8 ± 3.4		12.2 ± 2.3	47.4 ± 3.1	51.4 ± 2.4		47.3 ± 2.6	15.63 ± 3.04		
	Cd	<ld	<ld		<ld	<ld	<ld		<ld	0.49 ± 0.12		
Eau (µg.l ⁻¹)	Cu	6.7				232				685		
	Zn	21				1920				210		
	Pb	<1				122				2		
	Cd	0.1				0.3				0.4		
		Farine	Tr + Pl	Colza	Farine	Graminées	Farine	Graminées	Farine	Graminées		
Aliment	Cu	0.3 ± 0.1	10.9 ± 2.6	3.6 ± 0.6	11.2 ± 0.1	2.7 ± 0.4	34.76 ± 15.79	8.88 ± 0.69				
	Zn	3.9 ± 0.1	46.9 ± 17	35.6 ± 5.5	99.1 ± 0.4	18.7 ± 4.8	90.14 ± 13.84	35.34 ± 5.58				
	Pb	<ld	0.7 ± 0.03	<ld	<ld	<ld	0.54 ± 0.08	0.36 ± 0.05				
	Cd	<ld	<ld	0.5 ± 0.01	0.6 ± 0.01	<ld	0.54 ± 0.27	0.13 ± 0.06				

IV.2. Bioaccumulation des métaux lourds par *Helix aspersa maxima* (Tableau 40b)

IV.2.1. Elevage E1

Les concentrations en métaux lourds mesurées dans les escargots de l'élevage E1 sont représentées sur les Figures 46 (a, b1 et b2) ; les concentrations dans les différents compartiments de leur écosystème sont représentées sur les Figures 47 (a-b).

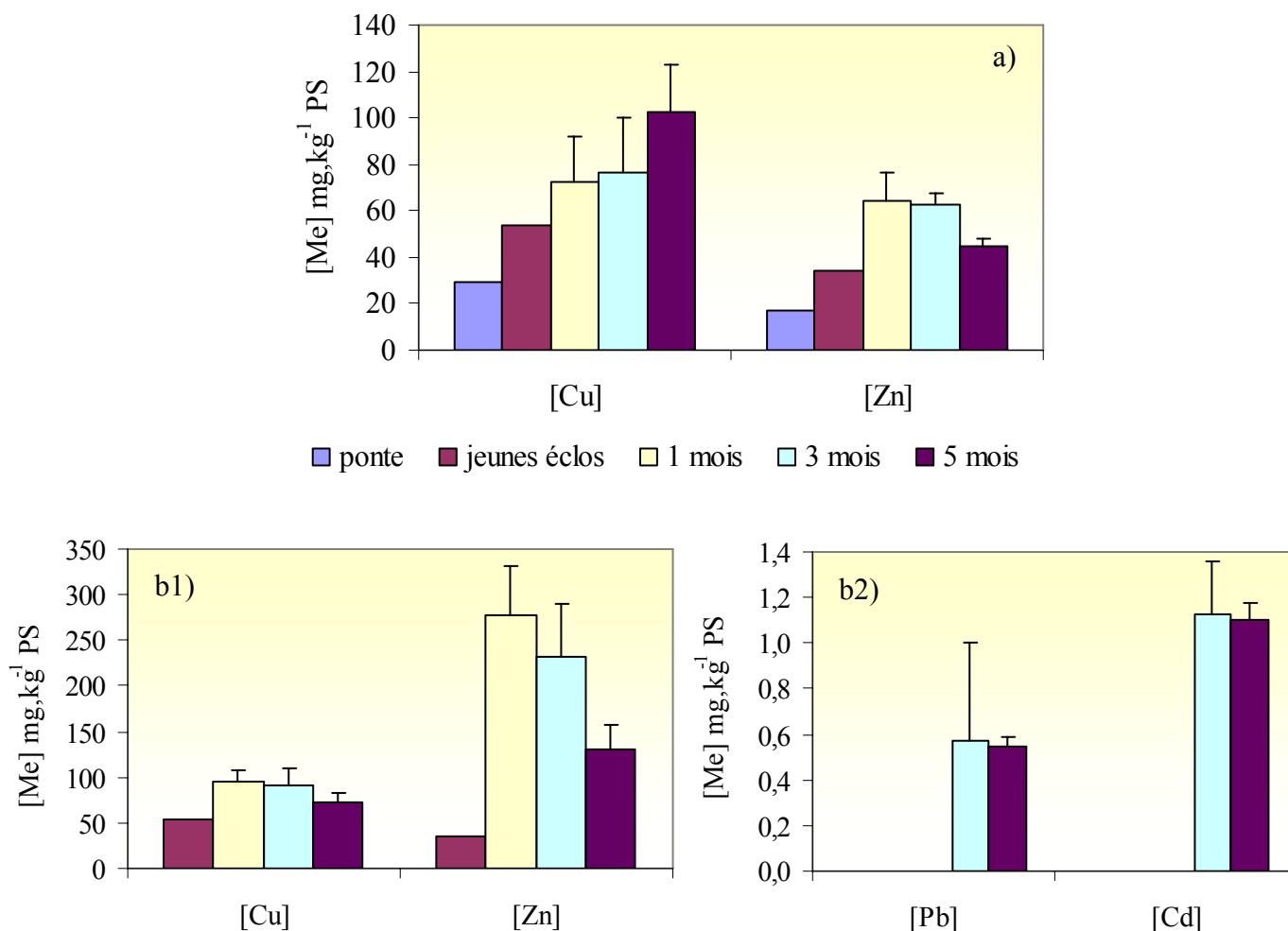


Figure 46 : Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd dans les pontes, les jeunes éclos puis dans le pied (a) et les viscères (b1 et b2) des escargots âgés de 1, 3 et 5 mois appartenant à l'élevage E1.

En ce qui concerne les pontes, seuls le cuivre et le zinc sont présents et au niveau le plus faible pour l'ensemble de l'étude.

Les concentrations en cuivre mesurées dans le pied des escargots (Figure 46a) augmentent régulièrement, et de manière significative, pendant les 5 mois de l'étude, pour passer de 54.1mg Cu.kg⁻¹ PS dans les jeunes éclos à 102.86 +/- 20.28 mg Cu.kg⁻¹ PS à 5 mois. Pendant ce même

temps, les concentrations en cuivre dans les viscères (Figure 46b1), après une augmentation significative jusqu'à 1 mois, se stabilisent le 3^{ème} mois puis diminuent significativement le cinquième mois en passant de 96.1 +/- 12.4 à 71.6 +/- 10.9 mg Cu.kg⁻¹ PS.

En ce qui concerne les concentrations en zinc, l'évolution est identique dans les pieds et les viscères, avec une augmentation pendant le premier mois, une stabilisation au 3^{ème} mois puis une diminution significative à 5 mois, pour atteindre 45 +/- 3.1 mg Zn.kg⁻¹ PS dans les pieds et 131.2 +/- 26.4 mg Zn.kg⁻¹ PS dans les viscères.

Les concentrations en plomb et cadmium ne sont pas détectables dans le pied des escargots. Dans le cas des viscères, elles ne le deviennent qu'à partir du troisième mois d'élevage et restent stables jusqu'au cinquième mois (0.60 mg Pb.kg⁻¹ PS et 1.1 mg Cd.kg⁻¹ PS).

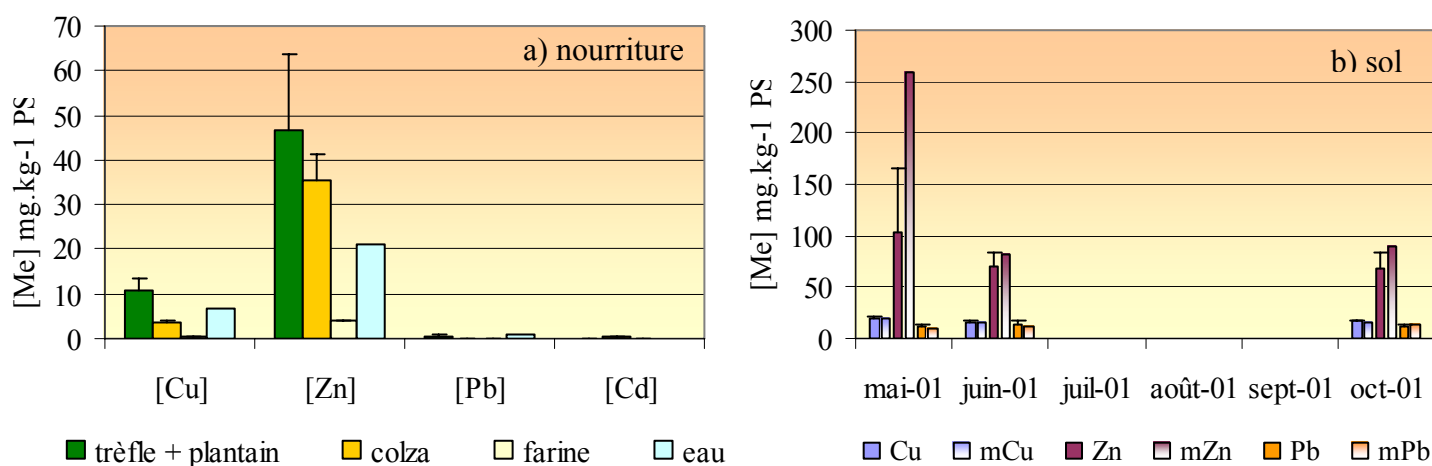


Figure 47 : Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd mesurées dans la nourriture à 5 mois (mg.kg⁻¹ PS et µg.l⁻¹ pour l'eau) (a) et le sol, en mg.kg⁻¹ PS, (b) de l'élevage E1 à T0, 1 mois et 5 mois (X = échantillons à 1m de la mangeoire ; mX = échantillon au niveau de la mangeoire)

La farine utilisée comme complément alimentaire contient de très faibles quantités de cuivre (0.3 +/- 0.1 mg.kg⁻¹) et de zinc (3.9 +/- 0.1 mg.kg⁻¹), les concentrations en plomb et cadmium sont inférieures aux seuils de détection (Figure 47a). Les végétaux semés dans les parcs ont accumulé du cuivre et du zinc dans leurs parties aériennes, avec une accumulation significativement supérieure pour le trèfle et le plantain par rapport au colza. Les teneurs dans ces végétaux ne dépassent pas les teneurs considérées comme normales (Schwartz, 1997 : 5-30 mg Cu.kg⁻¹ ; 27-150 mg Zn.kg⁻¹ ; 5-10 mg Pb.kg⁻¹ et 0.05-0.2 mg Cd.kg⁻¹).

Les prélèvements de sol ont été effectués en suivant le protocole, c'est-à-dire en distinguant bien ceux réalisés au niveau de la mangeoire (mCu, mZn et mPb) des autres effectués sur un cercle à 1m de distance de celle-ci. Cette distinction met en évidence, au mois de mai, une contamination du sol en zinc au niveau de la mangeoire (Figure 47b) avec une concentration multipliée par 2.5 par

rapport aux échantillons situés à 1m. En juin et en octobre, cette différence disparaît. En ce qui concerne le cuivre et le plomb, aucune différence significative n'est observée, quelque soit le mois (les concentrations en cadmium ne sont pas détectables). Ces teneurs en métaux mesurées ne dépassent ni les seuils d'anomalies définis par la norme AFNOR NF U 44-041, ni les valeurs d'intervention proposées par les Pays Bas (VROM Ministry, 1997).

De même, les teneurs en métaux dans l'eau ne dépassent pas les seuils d'intervention des Pays Bas (VROM Ministry, 1997) concernant l'eau dans les sols (seuils d'intervention : $75 \mu\text{g Cu.l}^{-1}$, $800 \mu\text{g Zn.l}^{-1}$, $75 \mu\text{g Pb.l}^{-1}$ et $6 \mu\text{g Cd.l}^{-1}$).

IV.2.2. Elevage E2

Les concentrations en métaux lourds mesurées dans les escargots de l'élevage E2 sont représentées sur les Figures 48 (a, b1 et b2) ; les concentrations dans les différents compartiments de leur écosystème sont représentées sur les Figures 49 (a-b).

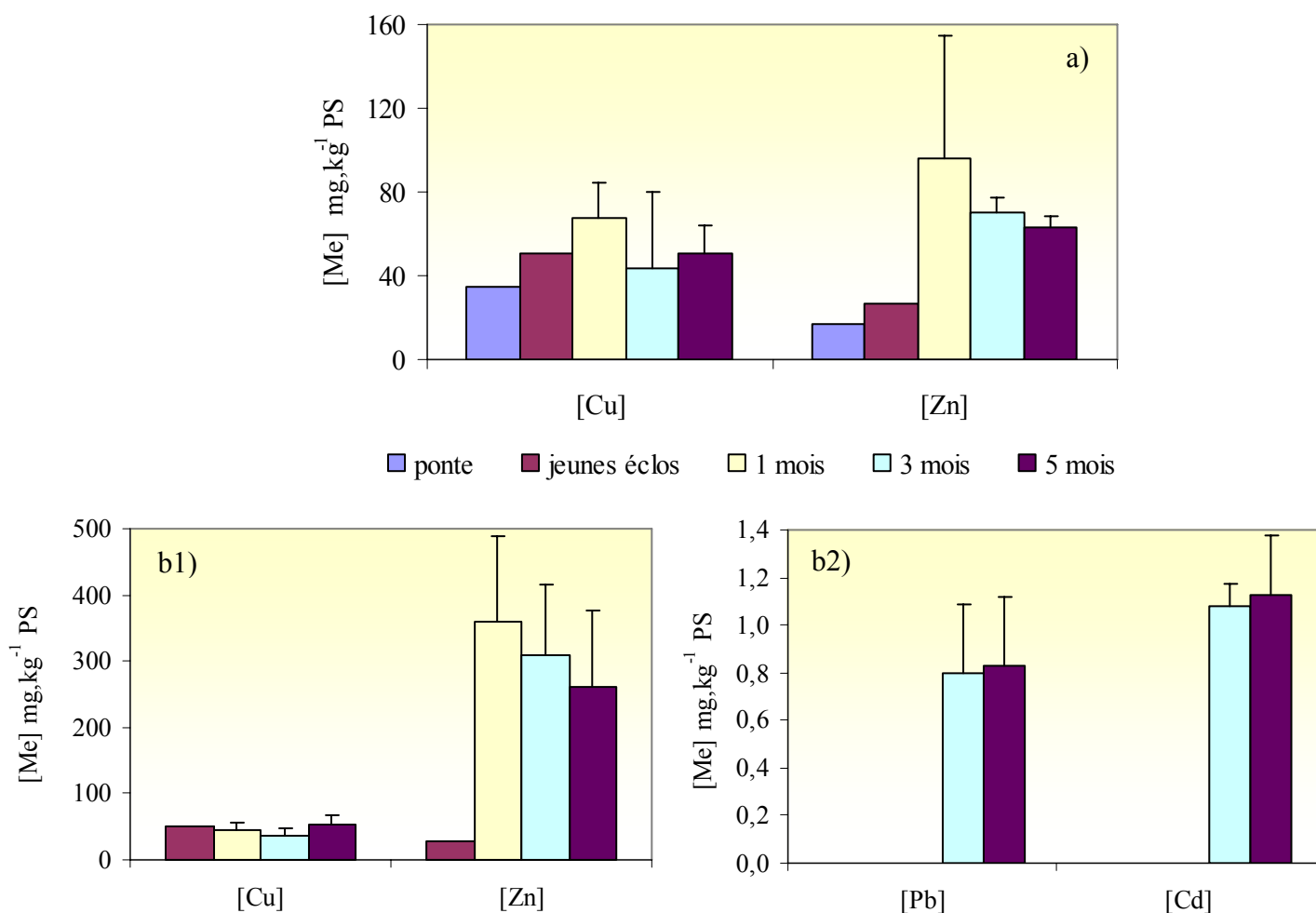


Figure 48 : Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd dans les pontes, les jeunes éclos de 10 jours, dans le pied (a) et les viscères (b1 et b2) des escargots âgés de 1, 3 et 5 mois appartenant à l'élevage E2.

En ce qui concerne les pontes, seuls le cuivre et le zinc sont présents et au niveau le plus faible pour l'ensemble de l'étude.

Les concentrations en cuivre mesurées dans les pieds (Figure 48a) sont maximales à 1 mois, avec $67.5 \pm 16.5 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ PS}$ et baissent significativement les mois suivants, pour atteindre $50.7 \pm 13.5 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ PS}$. Pendant ce temps, la concentration en cuivre dans les viscères, moindre que dans le pied, varie mais sans différence significative entre les mois, avec une moyenne de $45 \pm 7 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ PS}$ pour la durée de l'étude.

En ce qui concerne les concentrations en zinc, l'évolution est identique dans les pieds et les viscères, avec une augmentation pendant le premier mois (supérieure dans les viscères par rapport au pied) puis une diminution significative pour atteindre, au cinquième mois, $62.7 \pm 5.9 \text{ mg Zn.kg}^{-1} \text{ PS}$ dans les pieds et $262.2 \pm 114.4 \text{ mg Zn.kg}^{-1} \text{ PS}$ dans les viscères.

Les concentrations en plomb et cadmium sont inférieures au seuil de détection dans le pied des escargots. Dans le cas des viscères, leur présence est détectable à partir du troisième mois d'élevage et les concentrations restent stables jusqu'au cinquième mois ($0.80 \text{ mg Pb.kg}^{-1} \text{ PS}$ et $1.1 \text{ mg Cd.kg}^{-1} \text{ PS}$).

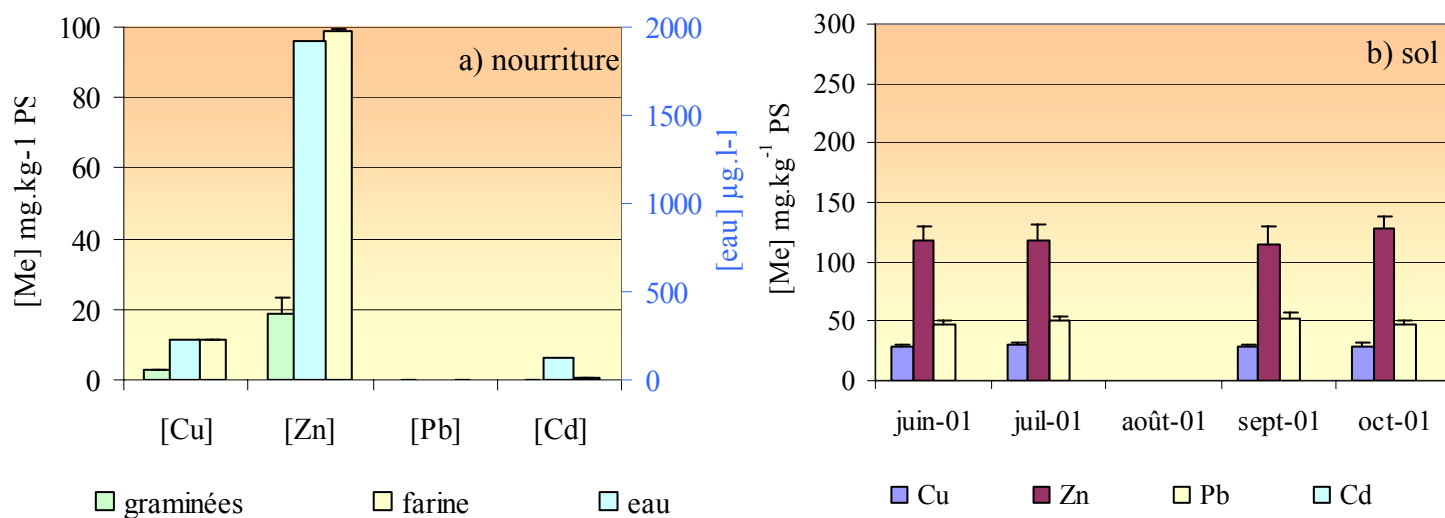


Figure 49 : Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd dans la nourriture ($\text{mg.kg}^{-1} \text{ PS}$), l'eau ($\mu\text{g.l}^{-1}$) (a) et le sol ($\text{mg.kg}^{-1} \text{ PS}$) (b) provenant de l'élevage E2

La farine utilisée dans cet élevage contient des concentrations en cuivre et zinc élevées ($11.2 \pm 0.1 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ PS}$ et $99.1 \pm 0.4 \text{ mg Zn.kg}^{-1} \text{ PS}$), des concentrations en cadmium détectables mais très faibles ($0.6 \pm 0.01 \text{ mg Cd.kg}^{-1} \text{ PS}$) et des concentrations en plomb inférieures au seuil de détection.

Les végétaux graminées ont accumulé peu de cuivre et de zinc dans leurs parties aériennes avec $2.7 \pm 0.4 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ PS}$ et $18.7 \pm 4.8 \text{ mg Zn.kg}^{-1} \text{ PS}$. Ces valeurs sont inférieures aux teneurs normales rencontrées dans les végétaux (Schwartz, 1997).

Les prélèvements de sol ont été effectués en suivant le protocole mais aucune différence significative n'a été montrée entre les échantillons au niveau de la mangeoire et ceux prélevés à 1m de distance. Les teneurs en métaux restent stables durant les 5 mois et sont inférieures aux seuils d'anomalie définis par la France ainsi qu'aux valeurs d'interventions des Pays Bas.

En ce qui concerne l'eau, les mesures montrent une importante contamination en Cu ($232 \mu\text{g.l}^{-1}$), Zn ($1920 \mu\text{g.l}^{-1}$) et Pb ($122 \mu\text{g.l}^{-1}$) avec des teneurs dépassant largement les seuils d'intervention des Pays Bas concernant l'eau dans les sols (seuil d'intervention : $75 \mu\text{g Cu.l}^{-1}$; $800 \mu\text{g Zn.l}^{-1}$; $75 \mu\text{g Pb.l}^{-1}$).

IV.2.3. Elevage E3

Les concentrations en métaux lourds mesurées dans les escargots de l'élevage E3 sont représentées sur les Figures 50.

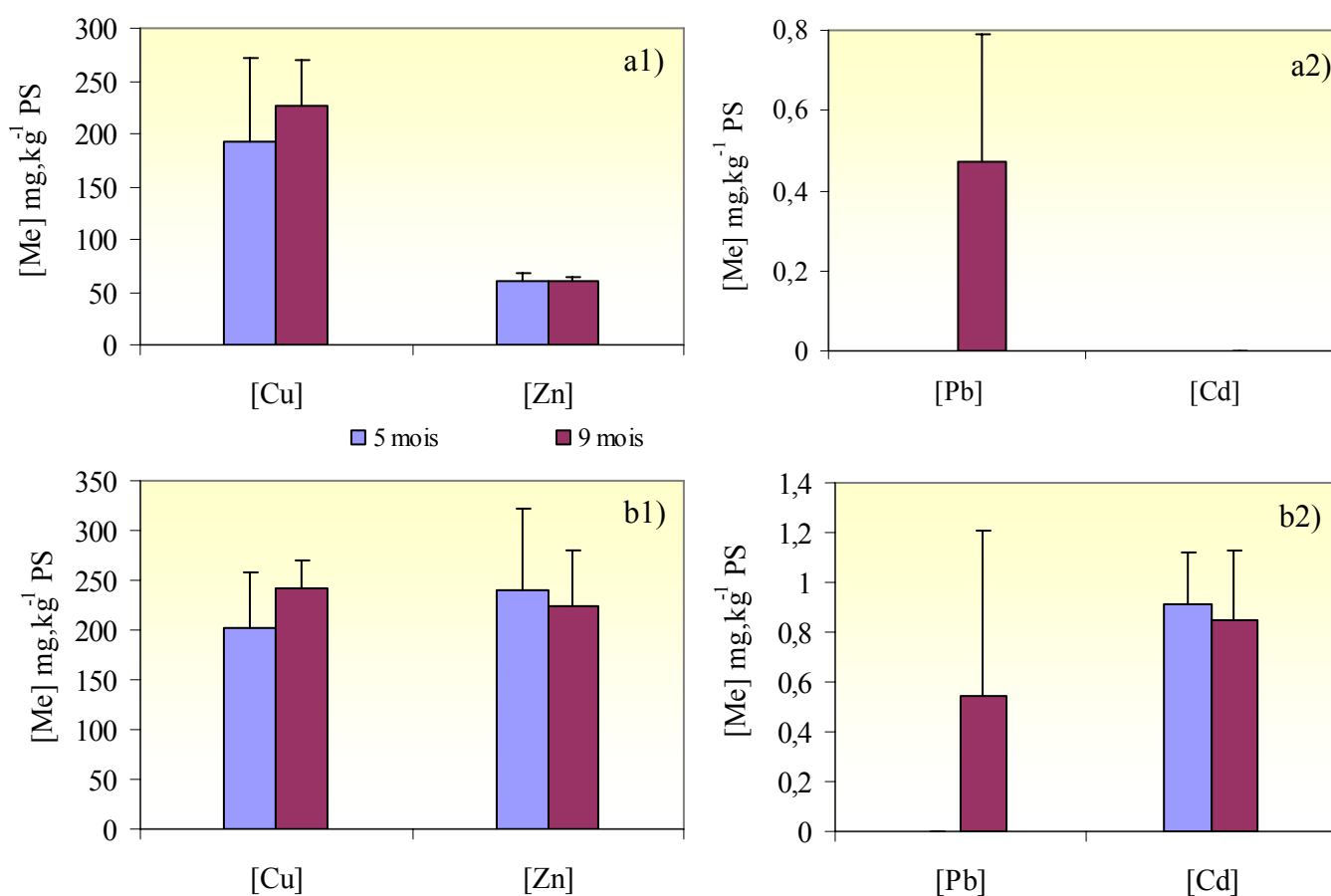


Figure 50 : Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd dans le pied (a1 et a2) et les viscères (b1 et b2) des escargots âgés de 5 et 9 mois appartenant à l'élevage E3.

Les concentrations en cuivre et en zinc mesurées dans le pied (a1) et les viscères (b1) des escargots provenant de l'élevage E3 restent stables entre 5 et 9 mois. Les escargots âgés de 5 mois présentent des concentrations en plomb inférieures à la limite de détection ; par contre, à 9 mois, la concentration atteint $0.54 \text{ mg Pb.kg}^{-1} \text{ PS}$ dans les viscères. Dans le cas du cadmium, alors que ces concentrations ne sont pas détectables dans le pied des escargots, les concentrations en cadmium dans les viscères ne sont pas significativement différentes entre 5 et 9 mois.

Les échantillons de sol disponibles ont été prélevés sur le parc hélicole le cinquième mois seulement, les concentrations mesurées dans ces échantillons et la nourriture (végétaux et farine) sont présentées sur la Figure 51.

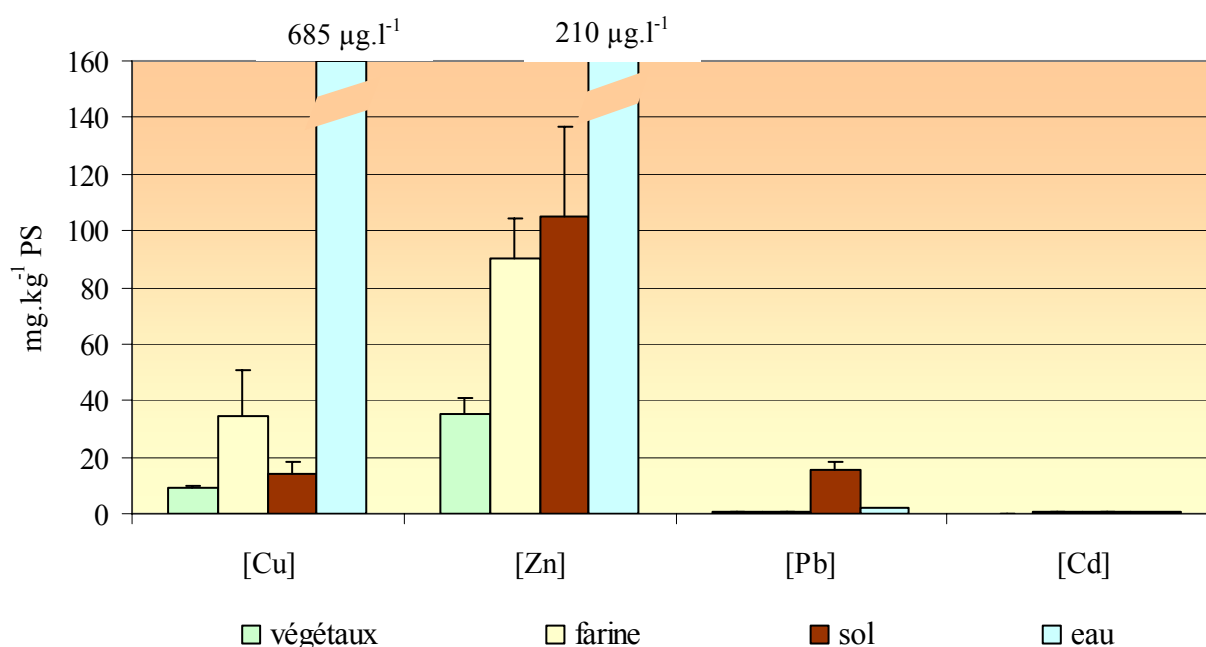


Figure 51 : Concentrations en Cu, Zn, Pb et Cd mesurées dans les végétaux, la farine, le sol ($\text{mg.kg}^{-1} \text{ PS}$) et l'eau ($\mu\text{g.l}^{-1}$) provenant de l'élevage E3.

La farine utilisée dans cet élevage contient des concentrations en cuivre et en zinc élevées ($34.76 \pm 15.79 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ PS}$ et $90.14 \pm 13.84 \text{ mg Zn.kg}^{-1} \text{ PS}$) alors que celles en plomb et en cadmium restent faibles ($0.54 \pm 0.08 \text{ mg Pb.kg}^{-1} \text{ PS}$ et $0.54 \pm 0.27 \text{ mg Cd.kg}^{-1} \text{ PS}$).

Les végétaux présentent des concentrations en métaux dans leurs parties aériennes inférieures aux teneurs normales définies par Schwartz (1997).

En ce qui concerne le sol, une seule série de prélèvements est disponible et nous renseigne donc seulement sur les concentrations en métaux dans le sol de l'élevage au bout de 5 mois : elles sont inférieures aux seuils d'anomalie pour les sols définis par la France (NF U 44-041) ainsi qu'aux valeurs d'intervention des Pays Bas (VROM Ministry, 1997).

Pour l'eau, les mesures montrent une importante contamination en Cu ($685 \mu\text{g.l}^{-1}$) avec des teneurs dépassant largement les seuils d'intervention concernant les eaux du sol des Pays Bas (seuil d'intervention : $75 \mu\text{g Cu.l}^{-1}$).

IV.3. Cinétique d'accumulation des éléments métalliques

Les prélèvements réalisés par les héliciculteurs depuis la ponte jusqu'à 5 mois, concernant les élevages E1 et E2, permettent d'étudier les cinétiques d'accumulation du cuivre, du zinc, du plomb et du cadmium au cours de cette période et de proposer des concentrations de référence en métaux dans des escargots non contaminés.

IV.3.1. Cinétique d'accumulation du cuivre

Pour les deux élevages considérés, les concentrations en cuivre ont été mesurées dans les œufs puis dans les jeunes éclos et dans le pied des escargots de 1 mois (Figure 52).

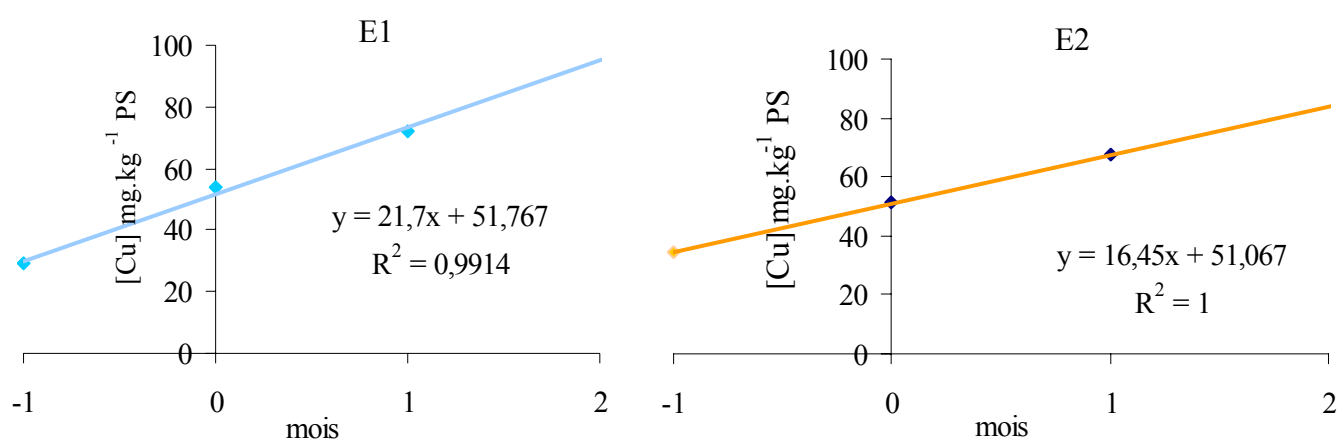


Figure 52 : Evolution des concentrations en cuivre dans les escargots des élevages E1 et E2, de leur naissance (mois « -1 ») à 1 mois de vie dans les parcs.

Comme le montrent les graphiques, les concentrations en cuivre augmentent linéairement le premier mois : les coefficients de régression linéaire R^2 mesurés sont de 0.9914 (élevage E1) et 1 (élevage E2). Après le premier mois, les concentrations en cuivre dans le pied des escargots se stabilisent avant d'augmenter au cours du cinquième mois. Simultanément, les concentrations en cuivre dans les viscères de ces escargots diminuent (élevage E1) ou restent stables (élevage E2) entre le premier et le cinquième mois.

IV.3.2. Cinétique d'accumulation du zinc

En ce qui concerne le zinc, l'évolution des concentrations mesurées dans les œufs, les jeunes éclos et le pied des escargots âgés de 1 mois, est présentée sur la Figure 53.

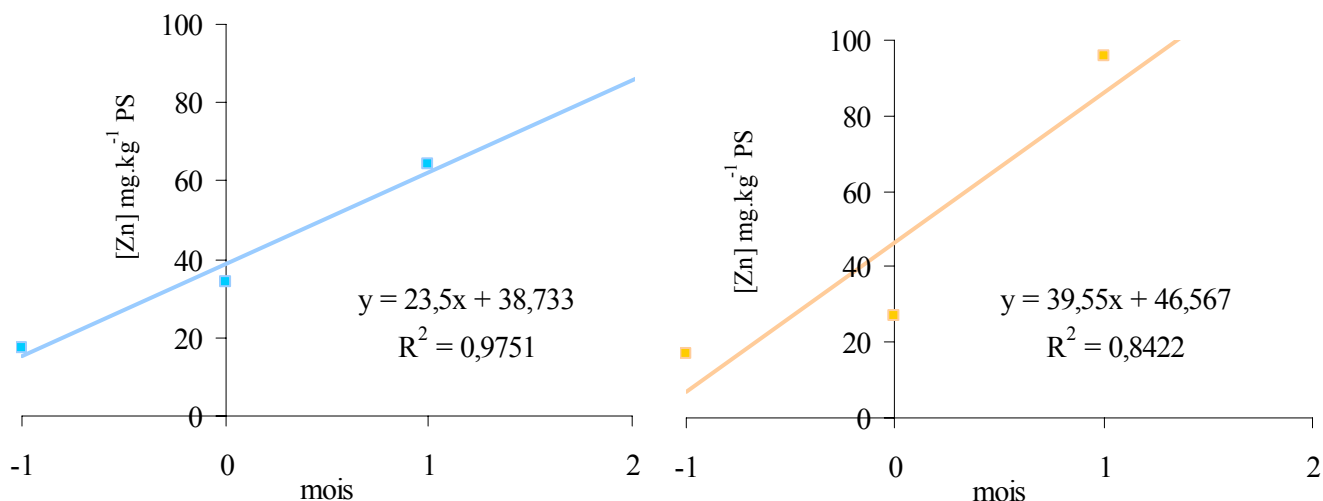


Figure 53 : Evolution des concentrations en zinc dans le pied des escargots des élevages E1 et E2, de leur naissance (mois « -1 ») à 1 mois de vie dans les parcs.

Les concentrations en zinc dans le pied des escargots augmentent de façon linéaire le premier mois : les coefficients de régression linéaire R^2 mesurés sont de 0.9751 pour l'élevage E1 et 0.8422 pour l'élevage E2. Les mois suivants, les concentrations en zinc diminuent dans le pied des escargots.

Les concentrations en zinc mesurées dans les viscères des escargots sont présentées sur la Figure 54.

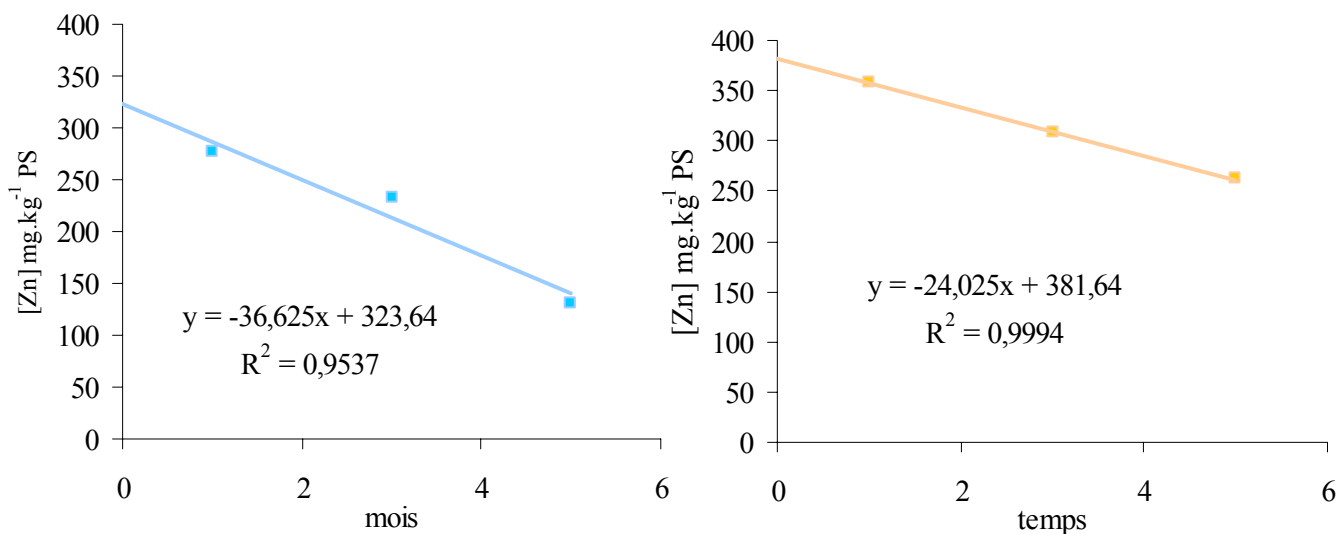


Figure 54 : Evolution des concentrations en zinc dans les viscères des escargots des élevages E1 et E2 du premier au cinquième mois d'élevage en parc.

Les concentrations en zinc dans les viscères des escargots diminuent de façon linéaire entre le premier et le cinquième mois : les coefficients de régression linéaire R^2 calculés sont de 0.9537 pour l'élevage E1 et 0.9994 pour l'élevage E2.

IV.3.3. Cinétique d'accumulation du plomb et du cadmium

Aucune cinétique n'a été mise en évidence pour ces deux métaux, les concentrations étant inférieures aux limites de détection pour tous les âges, dans le pied des escargots, et jusqu'à 1 mois dans les viscères. Toutefois, les concentrations en plomb et cadmium détectées dans les viscères des escargots sont stables entre le troisième et le cinquième mois. Les escargots de l'élevage E2 présentent des concentrations en plomb supérieures à ceux de E1, probablement du fait de la forte concentration en plomb observée dans l'eau. Par contre, les concentrations en cadmium dans les escargots des deux élevages ne sont pas significativement différentes entre elles.

Ces cinétiques confirment l'intérêt d'utiliser des escargots âgés de un mois pour les expériences de biosurveillance active car c'est entre 1 et 2 mois qu'ils présentent leur optimum d'accumulation (Gomot, 1994).

IV.4. Discussion

IV.4.1. Nature de la flore bactérienne dans les escargots d'élevage

Les résultats concernant la flore bactérienne, rencontrée dans les élevages étudiés, sont en accord avec ceux de Kodjo *et al.* (1996), quant à la présence chez l'escargot d'élevage d'une flore endogène composée de bactéries ubiquistes, aptes à coloniser les biotopes environnementaux (eaux, sol, végétaux). La présence dominante des Entérobactéries au sein des élevages E2 et E3 peut s'expliquer par le fait que ces élevages sont situés dans le quart Nord Est de la France et sont donc soumis à un climat plus froid que l'élevage E1. De fait, les *Aeromonas* sont majoritairement présents dans l'élevage E1 situé en région Ouest, davantage soumis à un climat de type océanique plus doux. Face à ces bactéries ubiquistes, l'escargot, animal ectotherme, semble tout au plus se comporter comme un bioindicateur.

IV.4.2. Bioaccumulation des éléments métalliques dans les escargots d'élevage

L'ensemble des résultats de l'analyse des métaux, montre que chaque élevage se caractérise par la prédominance, d'un métal donné. Les escargots de l'élevage E1 présentent, à 3 et 5 mois, des

concentrations significativement plus élevées en cuivre comparativement à ceux de l'élevage E2, malgré le fait que ce dernier présente des concentrations en cuivre supérieures dans la farine (11.2 mg.kg⁻¹ PS contre 0.3 mg.kg⁻¹ PS). Ces résultats seraient en accord avec ceux de Moser et Wieser (1979), qui rapportent que les concentrations en cuivre chez les escargots terrestres ne dépendent pas de celles de la ration ; mais Pihan (2001) a montré que, concernant le cuivre, les animaux provenant de parcs d'engraissement et donc ayant accès à une alimentation plus diversifiée (sol, plantes variées selon les élevages) présentent des concentrations supérieures à celles d'individus élevés hors sol alors qu'ils reçoivent la même concentration en métaux dans la farine. Les escargots de l'élevage E2 présentent des concentrations en zinc supérieures à celles mesurées dans les escargots de E1, à 1-3 et 5 mois : cette différence peut s'expliquer par des concentrations en zinc importantes dans le farine donnée dans l'élevage E2 (99.07 +/-0.39 mg Zn.kg⁻¹ PS), dans le sol sur lequel évoluent les escargots (130 mg Zn.kg⁻¹ PS) mais aussi dans l'eau distribuée (1920 µg.l⁻¹ Zn). Dans le cas des escargots de l'élevage E3, les concentrations en cuivre mesurées sont supérieures à celles des escargots des élevages E1 et E2, à 5 mois. L'accumulation de cuivre dans les viscères de ces escargots peut trouver son origine dans la forte teneur en cuivre retrouvée dans l'eau distribuée (685 µg.l⁻¹ Cu).

L'utilisation d'escargots terrestres en tant que bioindicateurs de la contamination métallique des sols a été proposée (Gomot, 1997 ; Gomot et Pihan, 2000) et deux tests normalisés en laboratoire existent (AFNOR, 2001). Pour caractériser la capacité physiologique que possèdent ces animaux à accumuler (et à éliminer), à des degrés variés, les métaux présents dans leur biotope (sol, débris végétaux, eau météorique, air), Bohac et Pospisil (1989), puis Dallinger (1993), ont proposé une classification basée sur un facteur de bioaccumulation (FB) qui est obtenu par le rapport de la concentration du contaminant dans l'organisme sur la concentration du contaminant dans l'environnement, notamment dans la nourriture. Ainsi, selon ces auteurs, *Helix aspersa* est un macroconcentreur (FB > 2) pour Cu et Cd, un microconcentreur (1 < FB ≤ 2) pour Zn et un déconcentreur pour Pb.

Dans la présente étude, afin de calculer les facteurs de bioaccumulation des différents métaux, les équations proposées par Pihan (2001), mettant en relation la concentration dans la nourriture (x) avec celle mesurée dans le pied ou les viscères (y), ont été utilisées.

- pour le cuivre dans le pied, $y = 8.665x - 31.819$ ($R^2 = 0.9049$)
- pour le cuivre dans les viscères, $y = 5.5923x - 13.812$ ($R^2 = 0.901$)
- pour le zinc, $y = 1.1099x + 58.99$ pour les viscères ($R^2 = 0.67047$)

avec y : concentration dans les pieds ou les viscères, selon les cas

x : concentration dans l'aliment

A partir de ces équations et connaissant « y », les concentrations moyennes en Cu et Zn, présentes dans « l'aliment composite » (associant les végétaux, le sol, la farine et l'eau), peuvent être déterminées. Ainsi, la ration alimentaire des escargots leur apporte, pour le cuivre, en moyenne 15.54 mg Cu.kg⁻¹ d'aliment dans le cas de E1, 9.53 mg Cu.kg⁻¹ d'aliment dans le cas de E2 et 38.59 mg Cu.kg⁻¹ d'aliment dans le cas de E3, avec dans les trois cas vérification de la capacité de macroconcentreur de *Helix aspersa* vis-à-vis du cuivre. Rapportées aux concentrations en cuivre mesurées dans les organismes, les facteurs de bioaccumulation FB peuvent être calculés et sont de 6.6 dans le cas des escargots de E1, 5.3 dans le cas des escargots de E2 et 5.2 dans le cas de E3. Les mêmes calculs sont réalisés pour le zinc ; les concentrations moyennes en zinc dans la ration alimentaire sont de 65.16 mg Zn.kg⁻¹ PS pour E1, 208.98 mg Zn.kg⁻¹ PS pour E2 et 162.96 mg Zn.kg⁻¹ PS pour E3. Les facteurs de bioaccumulation sont de 2.01 pour E1, de 1.25 pour E2 et de 1.5 pour E3, avec vérification de la capacité de microconcentreur de *Helix aspersa* vis-à-vis du zinc. Les escargots des trois élevages montrent une capacité de déconcentration pour le plomb, avec des teneurs inférieures à 0.8 mg Pb.kg⁻¹ PS dans les viscères, et une capacité de macroconcentration du cadmium dans leurs viscères. Ces résultats sont bien en accord avec la classification proposée par Dallinger (1993).

Ces résultats sont à mettre en rapport avec les préférences alimentaires de l'escargot, qui bien qu'ayant un comportement alimentaire opportuniste (débris organiques divers en décomposition, sol, ...), n'en demeure pas moins essentiellement phytophage. Il semble dans ce cas, que les quantités de végétaux absorbées soient davantage sous l'influence directe de l'appétence (texture, composition minérale et organique) des différents constituants de la ration alimentaire (Chevalier *et al.*, 2001). Pour l'élevage E1, les végétaux proposés aux escargots sont assez appétants pour représenter la deuxième source de nourriture (5% du cuivre et 25% du zinc accumulés proviennent des différents végétaux), après le sol (à hauteur de 90% pour le cuivre et 70 % pour le zinc), la farine étant la dernière source avec seulement 5% (5% du cuivre et zinc accumulés dans les escargots proviennent de la farine). Par contre, les graminées de l'élevage E2 présentent moins d'appétence pour les escargots, qui préfèrent se nourrir en majorité de farine (50% du cuivre accumulé dans les escargots provient de la farine), suivi des végétaux à hauteur de 40%, le sol ne représentant que 10% du cuivre accumulé. Pour le zinc, ce sont les escargots de l'élevage E2 qui concentrent significativement plus de zinc, en corrélation avec une concentration significativement supérieure dans la farine. De plus, la concentration en zinc dans l'eau de l'élevage E2 est si élevée (1920 µg.l⁻¹) que l'on peut supposer que cette source joue un rôle prépondérant dans l'accumulation du zinc par les escargots. De même pour l'élevage E3, la forte concentration en cuivre (685 µg.l⁻¹) dans l'eau doit jouer un rôle important dans l'accumulation du cuivre par les escargots.

Les concentrations significativement plus faibles en cuivre, en zinc et en plomb dans le sol de l'élevage E1 peuvent s'expliquer par l'application d'un système de rotation permettant l'utilisation de parcs d'élevage moins âgés, mais aussi par la pratique annuelle d'un labour profond des sols. Par contre, l'élevage E2 recourt plutôt à un labour superficiel, sans rotation des parcs.

Pihan (2001) définit, par rapport à Berger et Dallinger (1993), une nouvelle grille de contamination des viscères, pour *Helix aspersa aspersa*, avec des classes allant de la classe I à la classe V, où la classe I révèle une absence de contamination et la classe V une contamination excessive (Tableau 24, Synthèse Bibliographique). Selon cette classification, les trois élevages se situent en classe I pour le plomb ($\leq 5 \text{ mg Pb.kg}^{-1}$ PS) et le cadmium ($\leq 5 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$ PS). Dans le cas du cuivre et du zinc, des différences apparaissent selon l'élevage concerné. Les escargots des élevages E1 et E2 appartiennent à la classe I de contamination pour le cuivre ($\leq 130 \text{ mg Cu.kg}^{-1}$ PS) alors que les escargots de l'élevage E3 appartiennent à la classe III ($200 < \text{Cu} \leq 300 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS). En ce qui concerne le zinc, les escargots de l'élevage E1 âgés de 1 et 3 mois appartiennent à la classe II de contamination alors que ceux âgés de 5 mois appartiennent à la classe I, les escargots de l'élevage E2 âgés de 1 et 3 mois appartiennent à la classe III ($300 < \text{Zn} \leq 600 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS) et les animaux les plus âgés à la classe II ($150 < \text{Zn} \leq 300 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS) et les escargots de l'élevage E3 appartiennent à la classe III quelque soit leur âge. Ces résultats sont à interpréter en tenant compte du fait qu'en conditions normales, les escargots sont en présence d'un mélange variable de divers métaux qui peuvent induire chez l'animal soit des effets simples additifs, soit des synergies, soit enfin des antagonismes. Ces aspects sont encore peu étudiés chez les gastéropodes mais ne doivent pas être oubliés (Dallinger et Wieser, 1984).

Le cuivre et le zinc sont deux oligo-éléments essentiels pour les gastéropodes. Le zinc est impliqué dans la synthèse et la fonction de nombreuses enzymes (Kabata-Pendias et Adriano, 1995). Le cuivre participe à la constitution de l'hémocyanine, pigment respiratoire des gastéropodes. Ces différents rôles justifiaient l'adjonction de sulfate de Cu à l'aliment escargot, à la concentration de 75 mg Cu.kg^{-1} d'aliment en poids sec selon la formule proposée par l'INRA (Daguzan, 1985). Ces deux éléments ne sont pas toxiques pour les escargots aux concentrations susceptibles d'être rencontrées dans le milieu naturel ; les escargots tolèrent d'ailleurs des concentrations élevées en laboratoire (Marigomez *et al.*, 1986). Les expériences menées sur des escargots *Helix aspersa* âgés de 1 mois par Gomot (2000) ne rapportent pas de mortalité liée aux concentrations en cuivre et en zinc dans la nourriture, les concentrations maximales de cuivre et de zinc testées étant de 4000 et $10\,000 \text{ }\mu\text{g.g}^{-1}$ respectivement. Seules des CE50 concernant la croissance ont pu être calculées à partir de cette étude : elles sont de $1180 \text{ }\mu\text{g Cu.g}^{-1}$ et $5800 \text{ }\mu\text{g Zn.g}^{-1}$ d'aliment.

Les mortalités rapportées par certains héliciculteurs suite à l'ingestion de farines contenant une supplémentation de sulfate de cuivre seraient davantage dues à l'hétérogénéité du mélange des différents constituants de l'aliment qu'à la concentration moyenne en cuivre de l'aliment. On a pu constater, dans certains cas, une action létale lorsque l'animal est en contact direct par la bouche avec un grain de sulfate de Cu (Pihan 2001). De précédentes analyses réalisées à la demande des gestionnaires de l'élevage E1, lors d'un épisode de grande mortalité en 1993 (perte de 70 000 escargots soit 20% de l'élevage), avaient mis en évidence des concentrations de $73 \pm 24 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ PS}$ et $186.2 \pm 38.1 \text{ mg Zn.kg}^{-1} \text{ PS}$ dans la farine, corrélées à des teneurs dans les viscères des escargots de $447.04 \pm 73.44 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ PS}$ et $318.7 \pm 115.3 \text{ mg Zn.kg}^{-1} \text{ PS}$, soit les classes IV pour le cuivre et III pour le zinc. L'arrêt de la supplémentation en cuivre a supprimée la mortalité. Partant de la corrélation établie entre les concentrations en métaux dans l'aliment et leurs concentrations dans les viscères, Pihan (2001) propose de retenir la somme des concentrations en ces deux métaux dans l'aliment, avec une valeur à ne pas dépasser de $30 \text{ mg Cu.kg}^{-1} \text{ PS}$ d'aliment et de $170 \text{ mg Zn.kg}^{-1} \text{ PS}$ avec, compte tenu des mélanges peu reproductibles dans la fabrication des aliments, une variabilité entre 180 et $200 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PS}$ pour l'ensemble Cu + Zn. Les résultats de la présente étude sont en deçà de ces recommandations pour la nourriture dans les trois élevages (101 à $132 \text{ mg Cu+Zn.kg}^{-1} \text{ PS}$ de l'aliment prélevé) et aucune mortalité n'a été constatée.

Le cadmium et le plomb sont des micropolluants toxiques pour l'escargot. Leur présence peut être le signe d'une pollution par l'atmosphère (essence, rejets industriels), ou par les ingrédients entrant dans la fabrication de la farine (céréales). Le cadmium et le plomb ont un organotropisme presque exclusif pour la glande digestive (Berger *et al.*, 1993, Dallinger, 1993), ce qui explique leur absence dans le pied des escargots. Aux concentrations habituellement rencontrées dans la nature, ces métaux n'ont pas d'effets significatifs sur la mortalité des escargots. Cependant, une exposition prolongée à de fortes concentrations ($> 100 \text{ ppm}$) perturbe le métabolisme du calcium (Russel *et al.*, 1981 ; Marigomez *et al.*, 1986). Pihan (2001) propose une concentration maximale de $0,7 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PS}$ d'aliment pour le Cd, et il fixe, pour le plomb et par extrapolation, une concentration acceptable de $2,5 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ PS}$ d'aliment. Les concentrations en Cd et Pb des aliments de la présente étude sont inférieures aux concentrations acceptables.

A partir des concentrations mesurées dans les escargots de l'élevage E1, il est possible de proposer des concentrations de référence en plomb et en cadmium dans les viscères des escargots non contaminés :

concentration de référence en plomb **$0.56 \pm 0.20 \text{ mg Pb.kg}^{-1} \text{ PS}$**
concentration de référence en cadmium **$1.11 \pm 0.20 \text{ mg Cd.kg}^{-1} \text{ PS}$**

La validité de ces valeurs proposées est confirmée, dans un premier temps, par leur appartenance à la classe I de contamination des viscères définie par Pihan (2001) et à la classe 1 définie par Berger et Dallinger (1993) correspondant aux témoins et, dans un deuxième temps, par les concentrations mesurées chez les escargots provenant d'un troisième élevage, ne présentant de contamination ni en plomb ni en cadmium ($0.54 \pm 0.27 \text{ mg Pb.kg}^{-1} \text{ PS}$ et $0.88 \pm 0.25 \text{ mg Cd.kg}^{-1} \text{ PS}$).

IV.4.3. Existe-t-il une relation entre la flore bactérienne et l'accumulation des EM ?

Notre étude avait pour but d'étudier la composition et l'évolution de la flore bactérienne à Gram négatif parallèlement à la contamination polymétallique chez *Helix aspersa* en conditions d'élevage. Peu de travaux ont porté sur une possible association entre contamination métallique et flore bactérienne chez l'escargot. La plupart des travaux de cette nature se sont intéressés aux poissons d'élevage. Ainsi, chez les anguilles hébergeant fréquemment *Vibrio anguillarum*, l'exposition au Cu n'entraîne ni une augmentation de la charge bactérienne, ni l'apparition d'infections bactériennes ; à des concentrations 25 fois supérieures aux doses limites couramment rapportées, les mortalités observées semblent être davantage causées par l'effet toxique direct du cuivre que par la présence de bactéries. Chez la carpe japonaise *Puntius gonionotus*, l'exposition à de faibles concentrations de cuivre (0.05 mg.l^{-1} d'eau), suivie d'une infection par *Aeromonas hydrophila* n'entraîne pas de réponse immunitaire spécifique (Shariff *et al.*, 2001). Par contre, Khangarot *et al.* (1999), rapportent que chez le poisson d'eau douce *Saccobranhus fossilis* (Bloch), une exposition au chrome entraîne une plus grande sensibilité aux infections dues à *Aeromonas hydrophila*. Dans le cadre de notre étude, il ne nous est pas possible d'établir une relation de causalité entre le profil bactérien des escargots et le niveau de bioaccumulation en un métal donné, d'autant plus qu'aucun des troubles habituellement observés e été ne se sont déclarés l'année de notre étude.

Cependant, nous pouvons dégager les observations suivantes :

- * le profil de la flore basale à Gram négatif chez l'escargot d'élevage semble être polymicrobien (au moins 4 genres bactériens), avec une dominance des Entérobactéries et des *Aeromonas*, à la fois en terme de fréquence et d'intensité sur l'ensemble des deux élevages.

- * l'élevage E1 se caractérise par des escargots hébergeant une population bactérienne à Gram négatif dominée par les *Aeromonas* et pouvant être classés en niveau de contamination de classe II aussi bien pour le Cu que pour le Zn. Durant la période d'élevage, la flore bactérienne change pour présenter, à 5 mois, une dominance des Entérobactéries. L'augmentation régulière des concentrations en cuivre dans les escargots pourrait être à l'origine de cette modification de flore

bactérienne, avec sélection d'une famille de bactéries comprenant de nombreux pathogènes possibles.

* l'élevage E2 se caractérise par des animaux hébergeant une population bactérienne à Gram négatif dominée par les Entérobactéries d'origine hydro-telluriques, durant toute la durée de l'élevage, et présentant des concentrations en cuivre stables dans le pied et les viscères des escargots, pendant cette période.

* l'élevage E3 se caractérise par des animaux hébergeant une population bactérienne à Gram négatif dominée par les Entérobactéries, jusqu'au 5^{ème} mois d'élevage, puis dominée par des *Aeromonas* à 9 mois. Mais, étant donné qu'il manque les concentrations en éléments métalliques dans le naissain et les escargots au début de l'élevage, faute de prélèvements, il est difficile d'émettre des hypothèses concernant l'origine de la modification de la flore bactérienne.

Des travaux préliminaires effectués sur la mortalité estivale chez l'escargot d'élevage (Kodjo *et al.*, 1997), ont montré qu'au cours de cet épisode, il interviendrait une nette modification de la flore bactérienne au profit des espèces bactériennes du genre *Aeromonas*. Il semble qu'une modification du profil microbien « normal » intervienne au cours du processus pathologique sans que l'on puisse affirmer avec certitude quelle en est la cause. Des conclusions similaires avaient déjà été rapportées lors des travaux de Degez (1992) et Rous (1993) sur la pathologie des « pontes roses » et/ou « transparentes » chez *Helix aspersa*. La présence de Cu, Zn, Cd et Pb chez les escargots et dans leur biotope, dans les concentrations relevant de notre étude, ne nous permet pas d'établir une relation de cause à effet quant à l'apparition des troubles signalés par les fermes hélicicoles, dans des contextes différents.

IV.4.4. Evaluation des risques sanitaires

Les concentrations mesurées dans le pied et les viscères des escargots, âgés de 5 mois pour les élevages E1 et E2, et âgés de 9 mois pour l'élevage E3, ont été comparées aux doses hebdomadaires tolérables, rapportées à un escargot (Tableau 40), en cuivre ($6488.9 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS), en plomb (324 mg.kg^{-1} PS) et en cadmium (90.73 mg.kg^{-1} PS) et à la dose journalière recommandée en zinc ($2511.11 \text{ mg.kg}^{-1}$ PS).

Pour tous les élevages, les concentrations en zinc mesurées dans le pied et les viscères sont inférieures à la DJR du zinc aux DHT du cuivre, du cadmium et du plomb.

La consommation de escargots provenant de ces élevages ne présente donc pas de risques quant à l'apport d'éléments métalliques à l'homme.

RESUME

L'escargot d'élevage héberge de façon permanente une population bactérienne dont le faciès évolue dans le temps et l'espace. Cette population endogène, essentiellement composée de bactéries à Gram négatif, comprend majoritairement des *Aeromonas* et des Entérobactéries d'origine hydro tellurique. La présence de Cu, Zn, Pb et Cd aussi bien dans l'escargot que dans son environnement, est le reflet d'une contamination polymétallique d'origines variées. Les concentrations en cuivre et en zinc, dans le pied des escargots, augmentent linéairement de l'éclosion à l'âge de un mois ; dans le cas du zinc, cette augmentation dans le pied précède une diminution linéaire dans les viscères, à partir du 2^{ème} mois, avant stabilisation. Dans le cas du plomb et du cadmium, il est possible de définir un niveau de référence dans les viscères : 0.56 +/- 0.20 mg Pb.kg⁻¹ PS et 1.11 +/- 0.20 mg Cd.kg⁻¹ PS.

Des études complémentaires doivent être menées sur d'autres élevages afin de vérifier l'existence ou non d'une relation entre la modification du profil microbien et la survenue de pathologies au sein d'un élevage. Dans un contexte expérimental bien délimité, on pourrait étudier l'effet d'une supplémentation en éléments métalliques sur une flore (fabriquée à partir de souches isolées d'escargots) que nous aurions nous-mêmes administré aux animaux.

CHAPITRE V LOCALISATION INTRACELLULAIRE DU CUIVRE DANS LA SOLE PÉDIEUSE DES ESCARGOTS

Des escargots âgés de 1 mois ont été intoxiqués, en laboratoire, par de la farine Hélixir contaminée par de la poudre de cuivre, à hauteur de 5%. Le cuivre est un métal essentiel pour les gastéropodes. Il intervient dans l'hémocyanine, protéine cuprique responsable du transport de l'oxygène dans l'hémolymphe. Le cuivre possède, en outre, la capacité à se lier à deux métallothionéines (Dallinger *et al.*, 1997-1999), une au niveau du pied et du manteau, et l'autre au niveau de la glande digestive. Lors d'une contamination au cuivre d'escargots en laboratoire, le cuivre révélé peut donc, soit être présent dans des cellules intervenant dans la biogenèse de l'hémocyanine, soit être associé à des métallothionéines dans un but de détoxification du métal. C'est dans cette optique que la microanalyse a été utilisée, afin de localiser le cuivre au niveau cellulaire, bien que ce métal soit très difficile à détecter (coloration rouge-rosée).

Le tissu conjonctif du pied se caractérise par la présence de plusieurs types cellulaires distincts pouvant intervenir dans l'accumulation des métaux :

- ❖ **les cellules sanguines** ou hémocytes, comprenant les granulocytes et les hyalinocytes (Marigomez *et al.*, 2002). Les granulocytes ont un profil circulaire, avec un réticulum endoplasmique lisse organisé en petites vésicules. Les hyalinocytes présentent eux de nombreux pseudopodes et d'abondants lysosomes. Marigomez *et al.* (1995) les classent dans les cellules phagocytaires à pseudopodes car elles sont, entre autre, capables de phagocyter les métaux particuliers ainsi que les métaux liés aux protéines.

La Figure 55 présente des photographies de cellules sanguines réalisées en microscopie optique, à partir de coupes semi-fines, non contrastées, colorées au bleu de Toluidine.

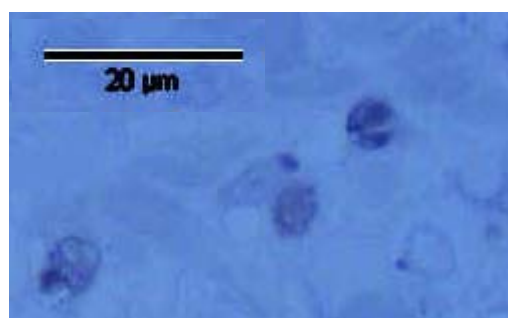
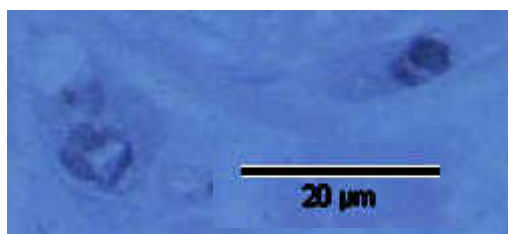


Figure 55 : Photographies (microscopie optique) de cellules sanguines, circulant dans les lacunes sanguines de la sole pédieuse d'un escargot contaminé par 5 % de poudre de cuivre dans la nourriture.

Les Figures 56 a, b, c et d représentent des photographies de cellules sanguines, en microscopie électronique à transmission (MET) réalisées à partir de coupes du même escargot contaminé par 5% de poudre de cuivre dans sa nourriture. La microanalyse nous a alors permis de préciser la composition de particules très électrodenses visibles dans les cellules sanguines.

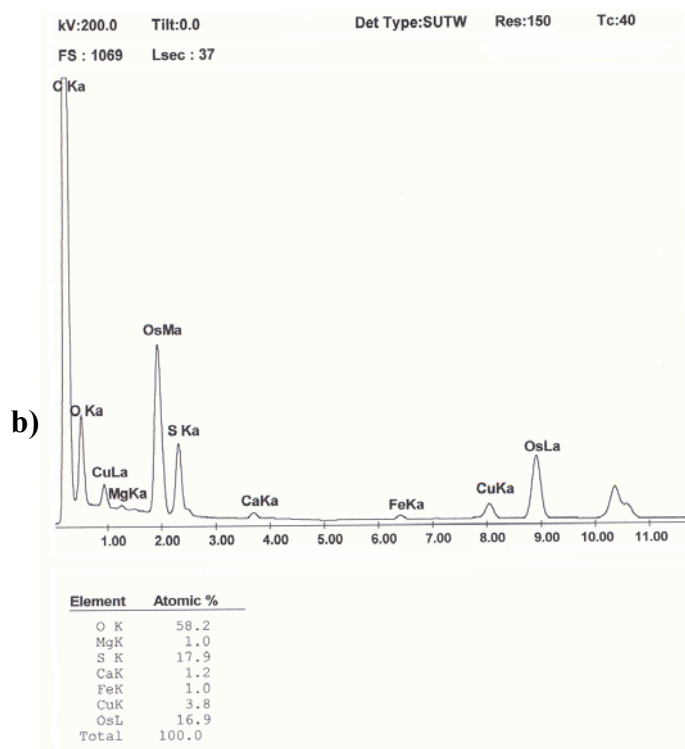
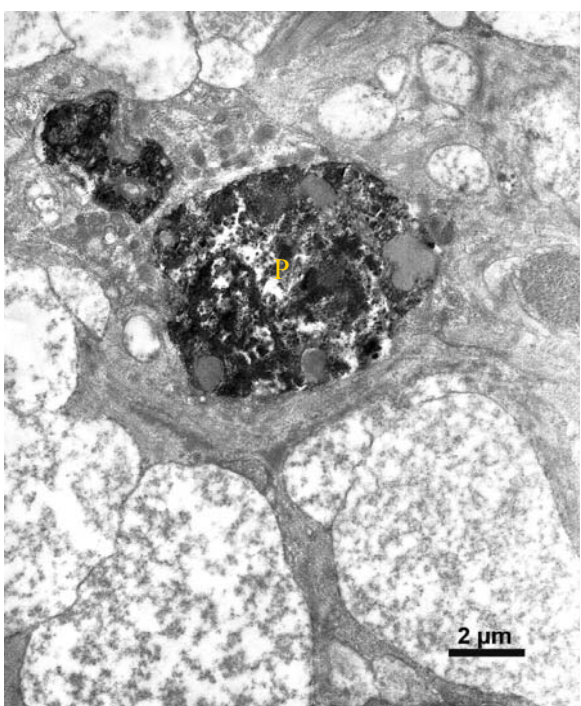
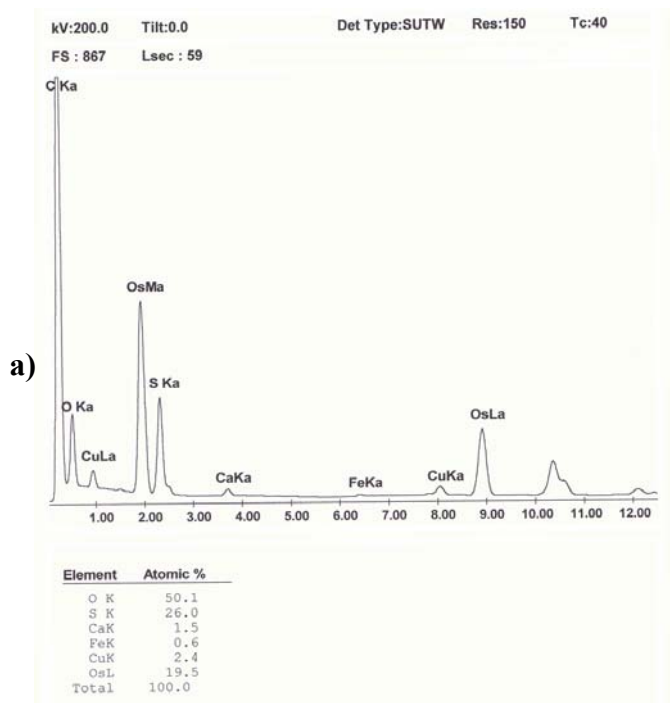
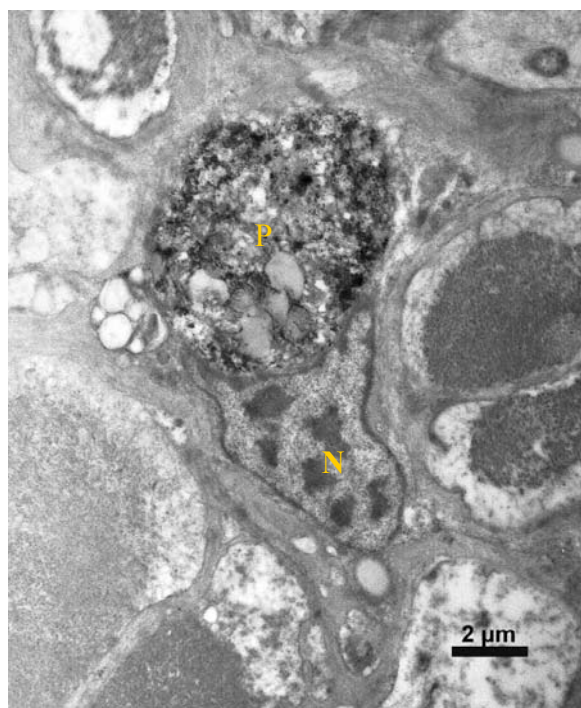
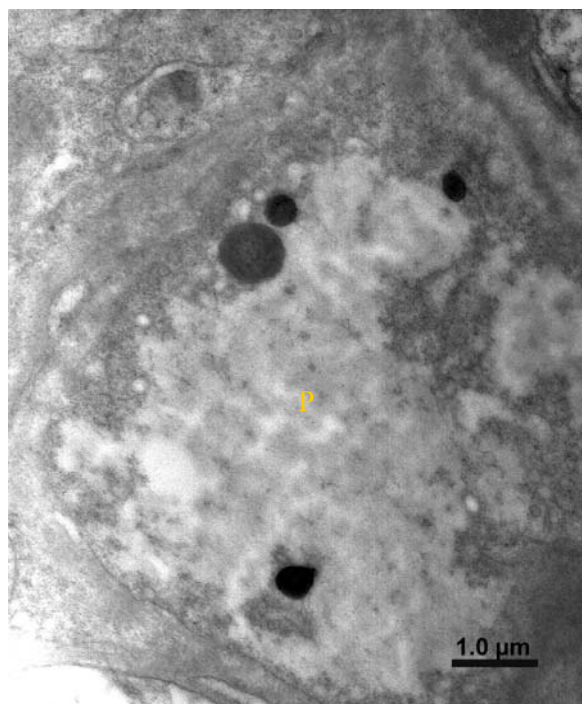
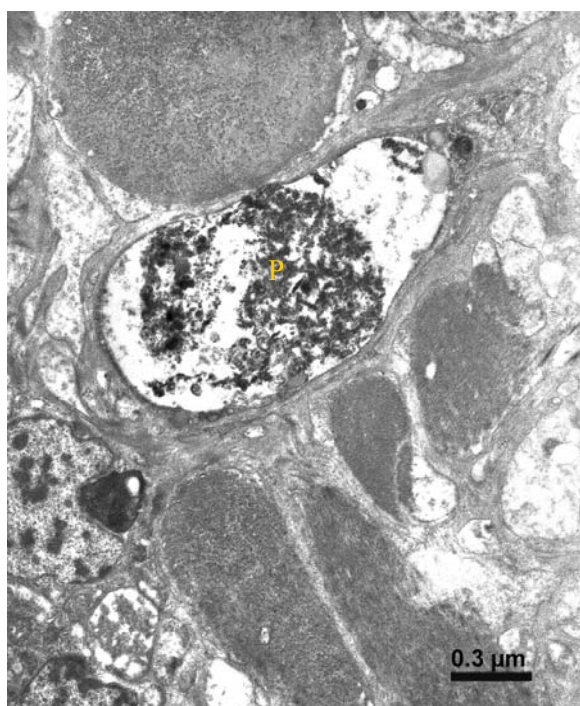
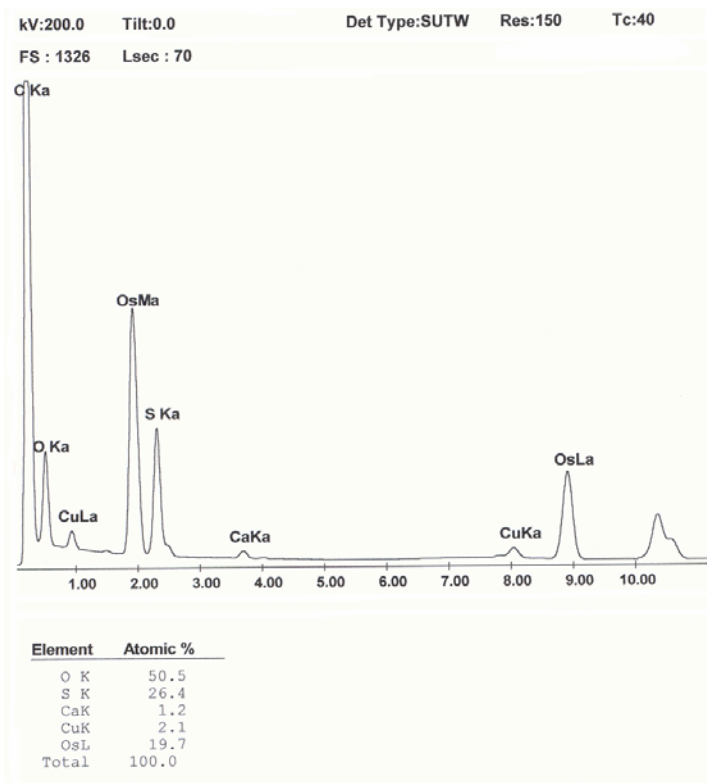


Figure 56 : Photographies et microanalyse de cellules sanguines circulantes, ou macrophages, dans les lacunes sanguines du pied d'*Helix aspersa aspersa* contaminé par l'ajout de poudre de cuivre (5%) à la farine Helixal (N : noyau ; P : phagolysosome ou « corps résiduel »)



c)



d)

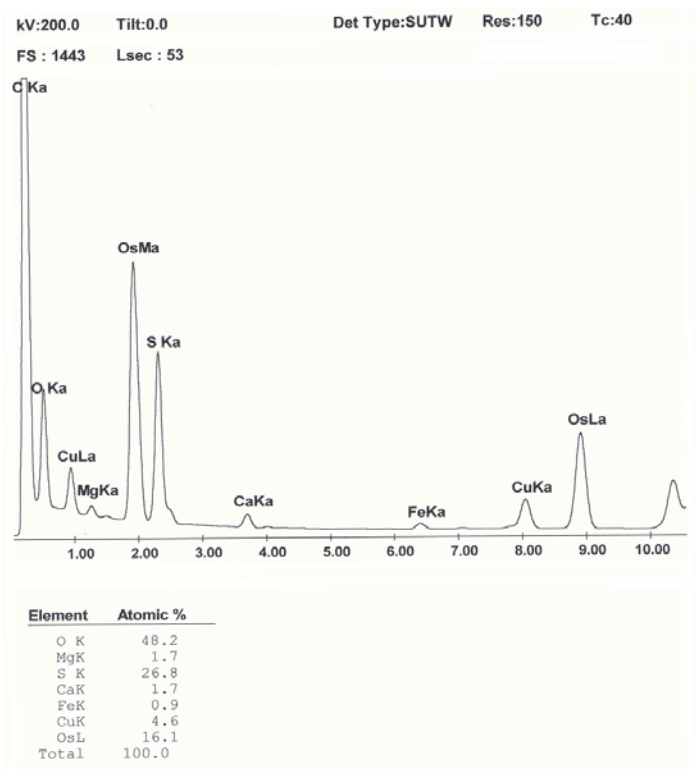


Figure 56 (suite) : Photographies (MET) et microanalyse de cellules sanguines circulantes, ou macrophages dans les lacunes sanguines du pied d'*Helix aspersa aspersa* contaminé par l'ajout de poudre de cuivre (5%) à la farine Helixal (N : noyau ; P : phagolysosome ou « corps résiduel »).

La microanalyse réalisée sur ces cellules sanguines, à partir de lames non contrastées, révèle la présence de O, Mg, Ca, S, Fe et Cu, l'osmium détecté provenant de l'étape de post fixation réalisée au tétraoxyde d'osmium.

Les hémocytes sont impliqués dans la compartimentation et la régulation des éléments métalliques (George *et al.* 1979 ; Mason, 1983). Ainsi, le cuivre et le zinc sont transportés par les hyalinocytes, immobilisés dans des lysosomes séparés, le cuivre étant associé au soufre (Ruddell et Reins, 1975 ; George *et al.* 1978) ce que nous confirmons très nettement. L'association du cuivre avec les sulfures est citée par Martoja et Martoja (1984) dans les viscères du murex de Méditerranée, avec une concentration pouvant atteindre $400 \mu\text{g.g}^{-1}$. Ces granules correspondent aux granules de type B (Dallinger, 1993).

La présence de fer, en faible quantité, est également souvent observée et la présence de calcium a été signalée par Fournié et Chetail (1982-1984) dans les amœbocytes.

❖ **les cellules à calcium** contenant des granules de carbonate de calcium (Marigomez *et al.*, 2002) (Figure 57).

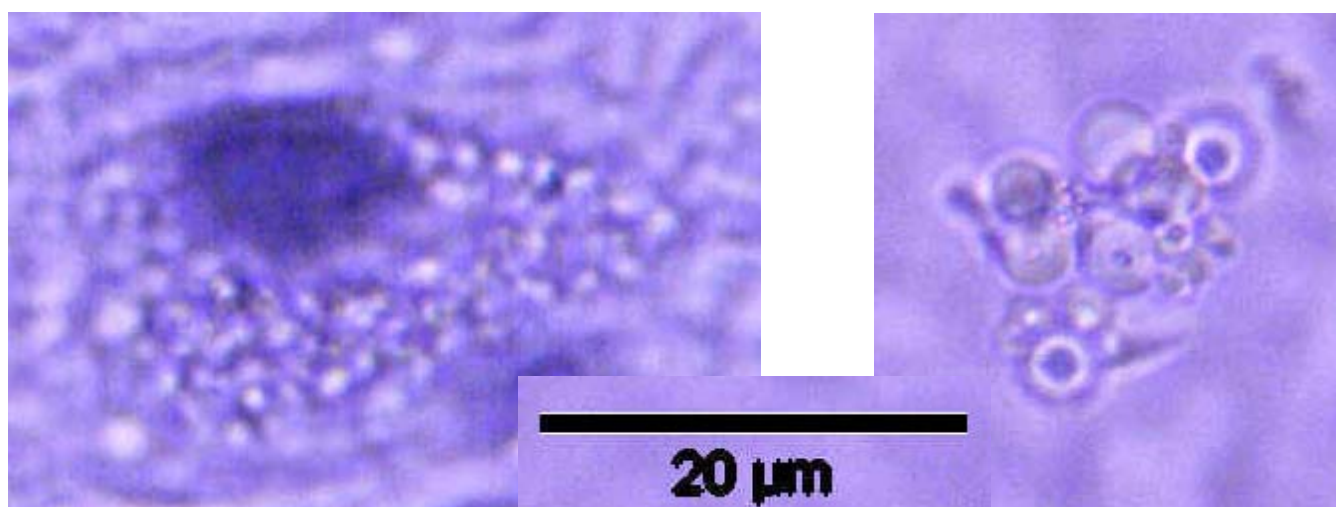


Figure 57 : Photographie (microscopie optique) d'une cellule à calcium dans le tissu conjonctif de la sole pédieuse d'un escargot (photo de gauche) et d'un amas de granules de carbonate de calcium (photo de droite).

Les cellules à calcium, présentes dans le tissu conjonctif du pied, contiennent des granules de carbonates de calcium, à différents stades de biogenèse, dont la taille est inférieure à $2\mu\text{m}$.

A partir de coupes fines du pied du même escargot, des photographies de cellules à calcium ont été réalisées en microscopie électronique (Figure 58). La microanalyse des concrétions présentes dans la cellule nous renseigne sur leur composition.

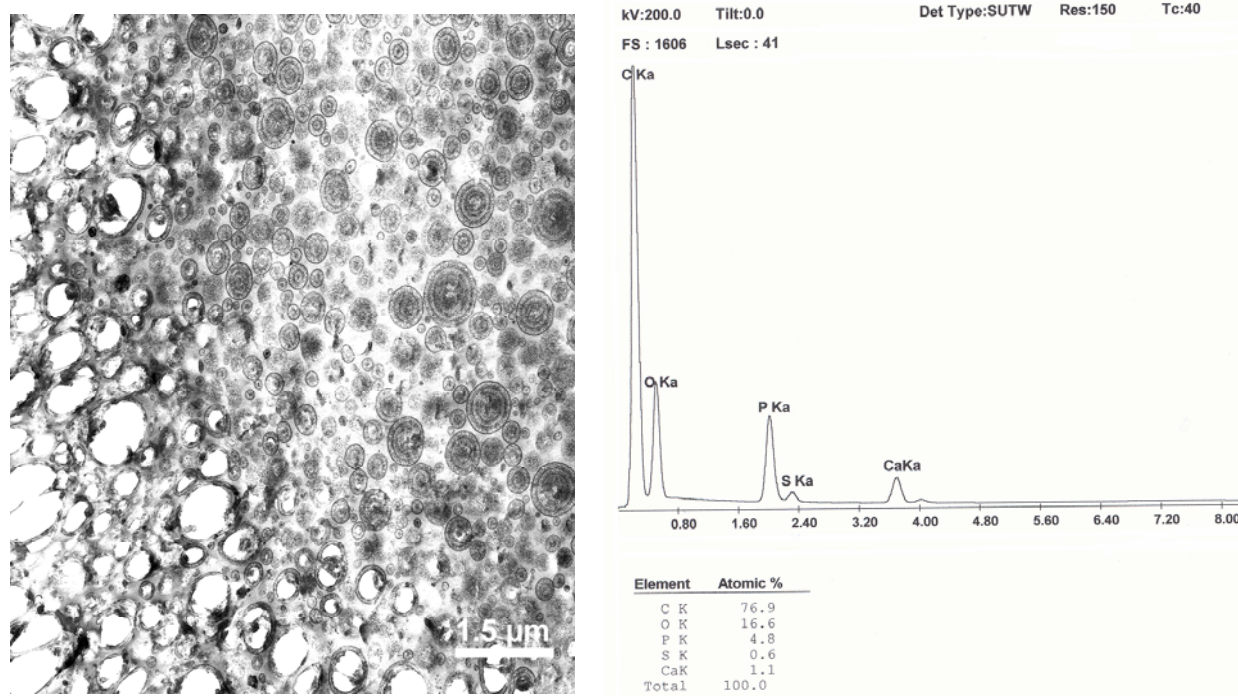


Figure 58 : Concrétions de carbonate de calcium (MET, grossissement : X 3800), à différents stades de biogenèse, présentes dans une cellule à calcium du tissu conjonctif du pied d'*Helix aspersa aspersa*, et microanalyse de ces concrétions.

A partir de coupes fines contrastées que nous avons réalisées, le cuivre n'est pas détecté dans les concrétions du tissu conjonctif du pied (Figure 58). La microanalyse réalisée sur ces concrétions nous indique leur composition : C, O, P, Ca et S (Figure 58). Les couches minérales, composées de carbonate de calcium, alternent avec des couches organiques moins épaisses, avec présence de phosphate et de soufre.

Charrier (1995) désigne ces cellules « granulocytes à pores ». Les granules sont considérés, par les auteurs, comme des réserves d'ions qui peuvent être mobilisés pour la réparation de la coquille (Watabe *et al.*, 1976) ou la calcification de la coquilles et des œufs (Tompa et Wilbur, 1997). Jusqu'aux travaux de Pihan en 2001, la fonction de détoxification de métaux chez *Helix aspersa aspersa*, par ces granules, n'avait pas été mise en évidence. En effet, après avoir nourri des escargots *Helix aspersa aspersa* avec de la farine contaminée par de la poudre de plomb ou de zinc, ces éléments ont été mis en évidence par microanalyse dans les concrétions des cellules à calcium du conjonctif pédieux, suggérant dans certains cas une fonction de détoxification.

Par contre, la fonction de détoxification des concrétions de phosphate de calcium des cellules basophiles de la glande digestive a été démontrée chez *Arion ater* par Marigomez *et al.* (1986a, b).

❖ **les cellules à pore ou « pore cells »** sont des cellules phagocytaires par percolation. Elles sont caractérisées par un réticulum endoplasmique granuleux très développé et par la présence de granules non concrétionnaires, d'électrodensités différentes, d'une autre nature que les granules concrétionnaires de carbonates de calcium des cellules à calcium du pied. Du matériel fibrillaire électrodense recouvre la membrane périphérique des pores ; il est riche en soufre et en cuivre (Cajaraville, 1995). Nous avons réalisé plusieurs photographies en microscopie optique (Figure 59) et en microscopie électronique (Figure 60), à partir de tissus pédieux provenant de l'escargot contaminé en présence de 5 % de poudre de cuivre dans l'aliment.

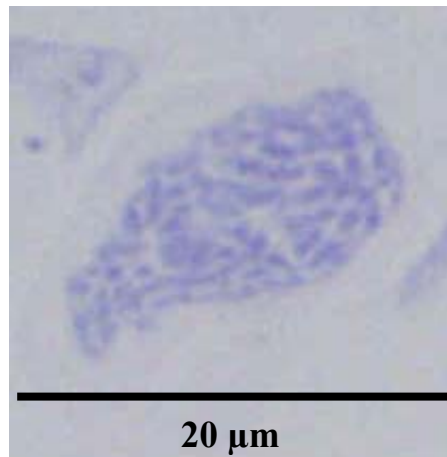


Figure 59 : Photographies, en microscopie optique, de cellules à pores dans le tissu conjonctif de la sole pédieuse d'un escargot contaminé, à partir de lames colorées à l'acide rubéanhydrique.

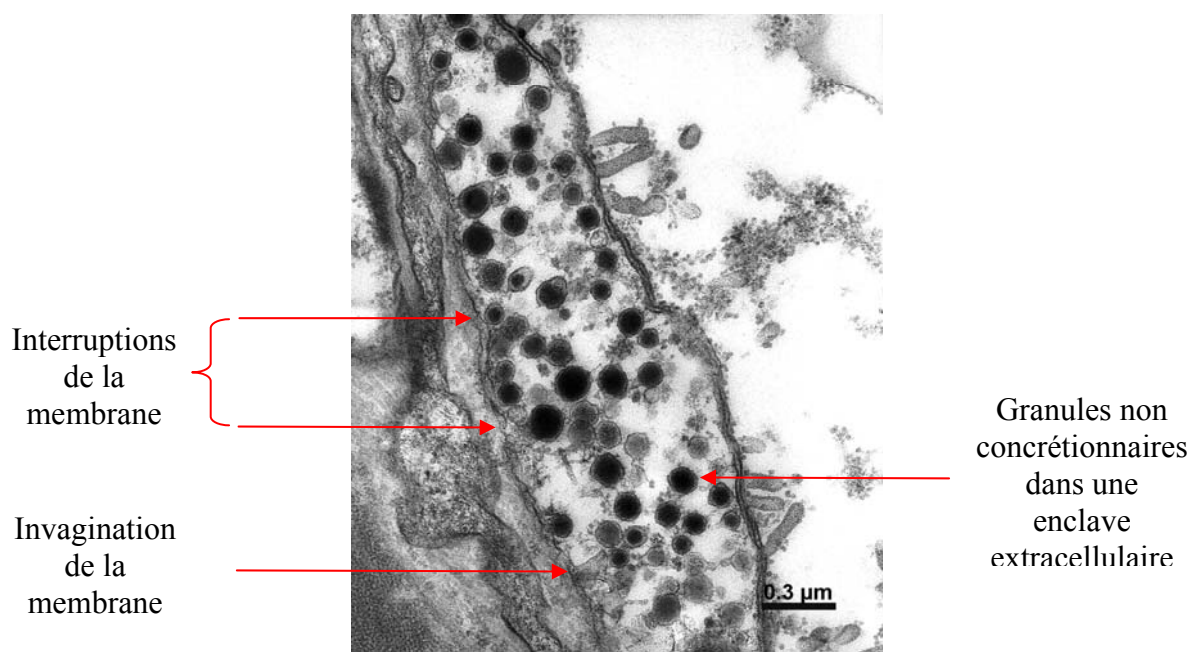


Figure 60 : Photographie de granules non concrétionnaires présents dans une cellule à pores du pied d'*Helix aspersa aspersa*, contaminé par l'ajout de poudre de cuivre (5%) à la farine Helixal (MET, grossissement : X 27500).

La microanalyse, réalisée sur ces granules, à partir de coupes contrastées, n'a pas permis de mettre en évidence la présence de cuivre.

Pourtant, Dallinger (1993) a localisé dans ce type de cellules, du soufre ou des sulfures mixtes de fer et de cuivre (avec $\text{Cu} > \text{Fe}$), impliqués dans une métallothionéine. Cette métalloprotéine (notée MT-Cu) n'a pas de rôle de détoxification mais un rôle de réserve de cuivre pour la synthèse de l'hémocyanine. De même, Sminia (1972) a mis en évidence, dans les cellules à pores de la limnée *Lymnaea stagnalis*, la présence d'hémocyanine sous forme cristalline dans les citernes du réticulum endoplasmique granuleux. Il est donc fort probable que la coloration des lames entraîne une impossibilité à mettre en évidence le cuivre dans ces cellules, du fait de sa disparition lors de l'emploi de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb.

Au cours de notre expérience, les viscères des escargots contaminés, en présence de 5% de poudre de cuivre dans l'aliment, ont aussi été préparés pour une observation en microscopie optique avec coloration à l'acide rubéanhydrique. Ainsi, la présence de cuivre a pu être mise en évidence dans le liquide de la vacuole apicale des néphrocytes (Figure 61) mais non associé directement à la concrétion rénale.

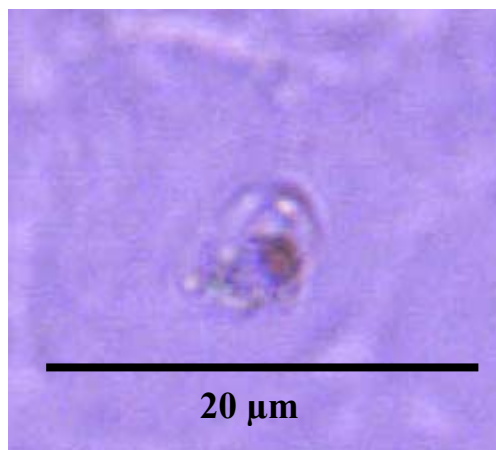


Figure 61 : Mise en évidence du cuivre (coloration à l'acide rubéanhydrique) dans la vacuole apicale d'un néphrocyte d'un escargot contaminé en présence de 5% de poudre de cuivre dans l'aliment.

De même, la détection positive de cuivre a également été effectuée dans les vacuoles des cellules digestives (Figure 62). Selon Dallinger, une MT-Cu, localisée dans le cytosol des cellules basophiles de la glande digestive, aurait un rôle dans la détoxification du cuivre.

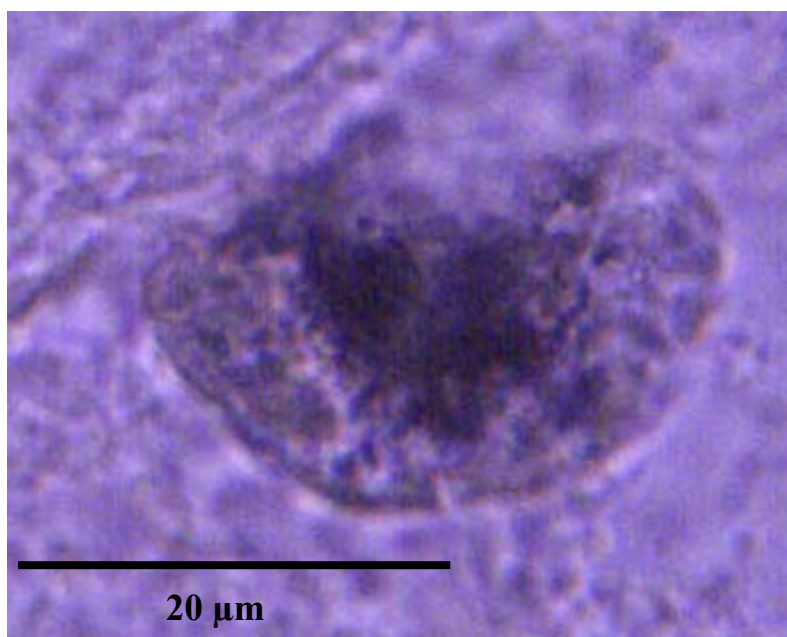


Figure 62 : Mise en évidence de cuivre dans une cellule basophile de la glande digestive, en microscopie optique, après coloration à l'acide rubéanhydrique.

Ces observations sont conformes à celles réalisées par Pihan (2001), avec mise en évidence d'une des voies d'entrée du cuivre (les cellules digestives) et deux des voies de sorties (concrétions des cellules à calcium de la glande digestive et les produits d'excrétion des néphrocytes) du cuivre dans

l'escargot *Helix aspersa aspersa*. Les concrétions de la cellule à calcium, expulsées par la lumière digestive, représentent en effet une voie importante d'élimination du cuivre. En complément à ces observations, nous avons mis en évidence le rôle des cellules sanguines dans le transport du cuivre, confirmant les données de la littérature. En effet, comme pour d'autres éléments métalliques, il y a dans l'organisme pénétration, assimilation, transport, stockage et excrétion de l'élément métallique. Dallinger et Weiser (1984) ont montré que, chez *Helix pomatia* contaminé par du cuivre, une accumulation permanente du cuivre dans la glande digestive, le manteau et le pied de l'escargot, pendant la phase de contamination de 32 jours, puis une phase de détoxification après l'arrêt de la contamination. Ces auteurs soulignent l'existence d'une certaine rythmicité dans les phénomènes d'accumulation et d'excrétion du cuivre, en liaison avec un rythme naturel de digestion et de désorption. Selon Marigomez *et al.* (1995), divers types cellulaires collaborent dans le métabolisme des métaux. Par exemple chez le gastéropode prosobranche marin *Littorina littorea* et dans le cas du cadmium, la pénétration s'effectue par les épithéliums de la branchie, du manteau et du pied ainsi que par le tractus digestif. L'accumulation s'effectue dans les cellules à pores, les cellules stockant le calcium et le rein. Le transport est assuré par l'hémolymphe (60%) et ses éléments figurés (40%). L'élimination est limitée aux concrétions des néphrocytes, à l'incorporation à la coquille et aux hémocytes qui, par diapédèse, quittent l'organisme à partir des épithéliums branchiaux, digestifs et rénaux. Chez les hélicidés, l'intervention des cellules accumulant le calcium dans l'accumulation, le transport et la détoxification des métaux est prépondérante par rapport aux autres voies métaboliques (Charrier, 2000).

*En ce qui concerne notre expérimentation, nous avons montré que, dans le cas d'une contamination par du cuivre particulaire sous forme de poudre dont la taille moyenne des particules varie entre 0.7 et 1 μ m, il y a pénétration pour partie au niveau des cellules digestives de la glande digestive, un transport par certaines cellules sanguines (hyalinocytes ou amoebocytes) avec phagocytose et vraisemblablement formation de sulfures, puis excrétion au niveau des vacuoles apicales des néphrocytes. Cette recherche a été effectuée en complément aux études de Pihan (2001) qui n'avaient pas concerné le rôle des hémocytes dans le transport du cuivre particulaire. Notre recherche par microanalyse de la présence de cuivre dans les cellules à pores et les cellules à calcium du pied d'*Helix aspersa aspersa* demeure à compléter en utilisant des coupes non contrastées au citrate de plomb et l'acétate d'uranyle car nous avons observé, en ce qui concerne les hémocytes, que cette étape, nécessaire à l'observation des ultrastructures, libère le cuivre.*

CHAPITRE VI DISCUSSION GENERALE

Les résultats obtenus lors des expériences de biosurveillance active menées sur sites nous permettent de définir plus précisément l'influence de certains paramètres, tels que la température et les concentrations en éléments métalliques sur la croissance ou tels que les caractéristiques physico-chimiques du sol sur la bioaccumulation, mais aussi de préciser les capacités bioindicatrices par bioaccumulation d'*Helix aspersa aspersa*.

VI.1. Influence des facteurs externes sur la croissance des escargots

A partir des données de croissance obtenues sur l'ensemble des sites de cette étude (site témoin, CEDILOR 2001-2002-2003, SOTRENOR, Homécourt et Hargarten aux Mines), des régressions, linéaires ou multiples, ont été réalisées afin de définir les paramètres environnementaux ayant le plus d'influence sur la croissance. Les paramètres environnementaux pris en compte sont : la température, l'hygrométrie, les caractéristiques physico-chimiques des sols (pH, matière organique, carbone, azote, CEC) et les concentrations en éléments métalliques dans le sol et la végétation.

VI.1.1. Influence des teneurs en éléments métalliques dans le sol et la végétation

Tout d'abord, une régression ascendante pas à pas a été réalisée en ne tenant compte que des concentrations en éléments métalliques présents dans le sol, afin d'observer les métaux ayant le plus d'influence sur la croissance (Tableau 42).

Tableau 42 : Variables ajoutées pas à pas au modèle de la régression multiple réalisée, à partir des concentrations en éléments métalliques dans le sol, et pourcentage d'explication apporté par chacune d'elles (R^2).

1. Ajout de la variable Cd $R^2 = 35,10\%$	3. Ajout de la variable Mn $R^2 = 57,47\%$	5. Ajout de la variable Pb $R^2 = 68,57\%$
2. Ajout de la variable Cu $R^2 = 50,97\%$	4. Ajout de la variable Zn $R^2 = 63,74\%$	

En intégrant les 8 métaux, le coefficient de corrélation R^2 atteint 71,29%, mais dès les cinq premiers métaux intégrés, le R^2 est proche avec une valeur de 68,57%. Le modèle, comportant les cinq métaux retenus, possède l'équation suivante :

$$\text{Croissance} = 0,6518 - 0,7256*\text{Cd} + 0,0794*\text{Cu} + 0,0029*\text{Mn} + 0,0174*\text{Pb} - 0,0130*\text{Zn}$$

Le cadmium présent dans le sol est le métal possédant la plus forte influence sur la croissance des escargots car le coefficient inscrit devant cette variable dans le modèle est le plus élevé (0.7256). Viennent ensuite le cuivre, le plomb, le zinc et le cadmium. Toutefois, alors que le cuivre, le manganèse et le plomb ne semblent pas avoir d'impact négatif sur la croissance (signe « + » devant le coefficient), du moins pour les concentrations présentes sur les sites étudiés, les concentrations en cadmium et zinc présentes dans le sol peuvent limiter la croissance des escargots, si elles sont trop fortes.

Par la suite, une nouvelle régression ascendante pas à pas a été réalisée en ne tenant compte que des concentrations en éléments métalliques présents dans les végétaux, afin de mettre en évidence les métaux ayant le plus d'influence sur la croissance (Tableau 43).

Tableau 43 : Variables ajoutées pas à pas au modèle de la régression multiple réalisée, à partir des concentrations en éléments métalliques dans les végétaux des sites, et pourcentage d'explication apporté par chacune d'elles (R^2).

1. Ajout de la variable Mn $R^2 = 20,33\%$	3. Ajout de la variable Zn $R^2 = 43,28\%$	5. Ajout de la variable Cd $R^2 = 63,07\%$	7. Ajout de la variable Ni $R^2 = 65,84\%$
2. Ajout de la variable Fe $R^2 = 36,51\%$	4. Ajout de la variable Pb $R^2 = 56,91\%$	6. Ajout de la variable Cu $R^2 = 64,57\%$	8. Ajout de la variable Cr $R^2 = 71,35\%$

En intégrant les 8 métaux, le coefficient de corrélation R^2 atteint 71,35% et on remarque une influence non négligeable de tous les métaux présents dans les végétaux sur la croissance des escargots.

Le modèle obtenu possède l'équation suivante :

$$\text{Croissance} = -4,3989 - 64,4389*\text{Cd} + 6,1475*\text{Cr} + 1,2758*\text{Cu} - 0,0090*\text{Fe} - 0,0407*\text{Mn} + 2,0484*\text{Ni} - 0,7118*\text{Pb} - 0,0432*\text{Zn}$$

Comme pour le sol, le cadmium possède l'influence la plus importante, suivi du chrome, du nickel, du cuivre, du plomb, du zinc, du manganèse et du fer. Les influences semblent positives dans le cas du chrome et du cuivre et négatives pour tous les autres métaux.

VI.1.2. Influence de la température

A l'issue d'une régression simple réalisée entre les taux de croissance observés sur les différents sites et les températures moyennes enregistrées durant les différentes expériences, le coefficient de corrélation R^2 obtenu est de 62.23% (Figure 63).

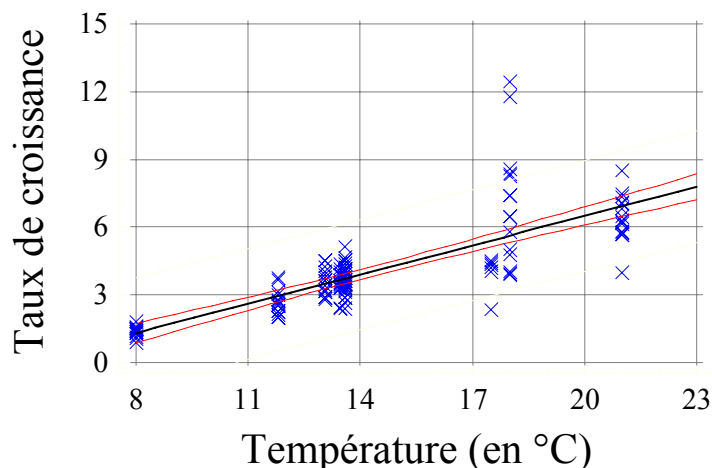


Figure 63 : Relation linéaire existant entre le taux de croissance observé sur les sites et les températures moyennes mesurées, avec les limites de l'intervalle de confiance à 5%.

Pour confirmer l'importance de la température sur la croissance des escargots, par rapport à tous les autres facteurs étudiés précédemment (concentrations en éléments métalliques dans le sol et la végétation), une régression multiple pas à pas ascendante a été réalisée afin d'évaluer l'importance relative des autres variables (concentrations en éléments métalliques dans le sol, les plantes, les escargots) dans l'explication des variations de la croissance (Tableau 44).

Tableau 44 : Variables ajoutées pas à pas au modèle de la régression multiple réalisée et pourcentage d'explication R^2 apporté par chacune d'elles ([m]esc-plante-sol : concentration en un métal donné dans les viscères des escargots, les plantes ou le sol du site étudié).

1 Ajout de la variable température $R^2 = 62,23\%$	5 Ajout de la variable [Zn] esc $R^2 = 71,61\%$	9 Ajout de la variable [Ni] plante $R^2 = 72,76\%$
2 Ajout de la variable [Pb] sol $R^2 = 69,52\%$	6 Ajout de la variable [Cd] esc $R^2 = 71,93\%$	10 Ajout de la variable [Pb] esc $R^2 = 72,81\%$
3 Ajout de la variable hygrométrie $R^2 = 70,44\%$	7 Ajout de la variable [Cu] plante $R^2 = 72,28\%$	11 Ajout de la variable [Cr] esc $R^2 = 72,88\%$
4 Ajout de la variable [Cr] plante $R^2 = 70,91\%$	8 Ajout de la variable [Mn] esc $R^2 = 72,52\%$	12 Ajout de la variable [Ni] esc $R^2 = 72,91\%$

Il est important de remarquer que l'intégration de toutes les variables, utilisées pour faire le modèle, n'est pas nécessaire car après seulement cinq variables, le R^2 n'évolue déjà presque plus (ajout variable 6 : 71.93%, ajout des 6 variables suivantes : 72.91%).

L'équation de régression multiple obtenue, correspondant au modèle déterminé est la suivante :

$$\begin{aligned} \text{Croissance} = & -5,4067 - 0,0555*[\text{Cd}] \text{ esc} - 0,0737*[\text{Cr}] \text{ esc} + 0,1646*[\text{Cr}] \text{ plante} - 0,0660*[\text{Cu}] \\ & \text{plante} + 0,0543*\text{hygrométrie} - 0,0009*[\text{Mn}] \text{ esc} + 0,0273*[\text{Ni}] \text{ esc} + 0,1377*[\text{Ni}] \text{ plante} + \\ & 0,0320*[\text{Pb}] \text{ esc} + 0,0121*[\text{Pb}] \text{ sol} + 0,3691*\text{température} - 0,0023*[\text{Zn}] \text{ esc} \end{aligned}$$

avec un coefficient de corrélation de : $R^2 = 72,91 \%$.

La variable température explique à elle seule 62.23% de la variation de la croissance des escargots, lors de leur transfert sur sites et présente, de plus, le coefficient le plus important dans l'équation du modèle (0.3691). La température est donc le facteur influençant principalement la croissance des escargots, et de manière positive (coefficient positif).

VI.1.3. Intérêt du paramètre croissance lors de la réalisation de diagnostic de sites contaminés

Les escargots transférés apparaissent assez sensibles aux conditions de température extérieure lors des transferts : des températures trop faibles inhibent la croissance des escargots sans pour autant limiter l'accumulation des éléments métalliques dans leurs organes. Toutefois, l'étude de la croissance ne semble pas permettre la mise en évidence de contamination dans les sols, sauf dans les cas extrêmes où la contamination du sol entraîne une répulsion des escargots. Ainsi, sur le site d'Hargarten aux Mines, c'est l'extrême concentration en plomb dans le sol, détectée par les escargots, qui limite leur taux de consommation et donc inhibe partiellement leur croissance.

Ainsi, Simkiss et Watkins (1990) suggéraient déjà qu'*Helix aspersa* est capable de détecter de fortes concentrations en zinc dans sa nourriture, ce qui entraîne une diminution du taux de consommation de la nourriture fortement contaminée. Toutefois, cette inhibition de croissance peut aussi être due à un phénomène de toxicité. Swaileh et Ezzughayyar (2000) ont montré, chez *Helix engaddensis*, que si pendant quatre semaines, les escargots réduisaient ou refusaient totalement de se nourrir avec une nourriture contaminée en cuivre et cadmium, dès qu'ils disposaient de nourriture saine la cinquième et la sixième semaine, les escargots intoxiqués au cadmium continuaient de refuser la nourriture. Mais à l'opposé, les escargots intoxiqués au cuivre ont tout de suite recommencé à se nourrir normalement et ont rattrapé leur poids normal. Il apparaît donc évident que, selon le métal considéré, le refus de se nourrir provient d'un phénomène soit de toxicité soit de répulsion (Swaileh et Ezzughayyar, 2001).

Selon Gomot (1997), le mécanisme impliqué dans l'inhibition de croissance des escargots nourris avec de la nourriture contaminée est difficile à identifier. Il pourrait s'agir d'une inhibition de synthèse d'une hormone de croissance essentielle à la croissance des escargots.

L'étude des variations de la croissance d'Helix aspersa aspersa seule ne traduit pas les niveaux de contamination des sols en éléments métalliques. Elle est influencée majoritairement par la température extérieure. Le paramètre de croissance ne pourrait donc être pris en compte que dans une gamme de température (et d'hygrométrie) proche de l'optimum. Par contre, les mesures de bioaccumulation permettent d'évaluer au plus juste le niveau de contamination d'un sol.

VI.2. Capacité bioindicatrice de l'escargot *Helix aspersa aspersa*

VI.2.1. Influence des paramètres physico-chimiques du sol

Afin d'interpréter au mieux les résultats de bioaccumulation des éléments métalliques dans les escargots, il est nécessaire de connaître les caractéristiques physico-chimiques des sols sur lesquels sont transférés les organismes bioindicateurs. En effet, à concentrations équivalentes en métal total dans les sols, les escargots peuvent ne pas accumuler les mêmes quantités de métaux dans leurs organes. Ces différences proviennent des caractéristiques physico-chimiques différentes des sols en question et donc de la concentration réellement disponible pour les organismes.

Le laboratoire d'analyses de sols de l'INRA (Arras) a procédé à la détermination des principales propriétés des différents sols : les résultats sont présentés dans le Tableau 45.

Tableau 45 : Principales caractéristiques physico-chimiques des sols d'Homécourt (site A), SOTRENOR (site B) et Hargarten aux Mines (site C).

Site	pH eau	Argile %	Limon %	Sable %	C org g.kg ⁻¹	C/N	MO g.kg ⁻¹	CEC cmol.kg ⁻¹
A	7.9	9.1	16	74.9	181.31	54.61	311.9	8.5
B	8.3	13.5	49.8	36.7	73.33	35.95	126.1	8.2
C	5	11.6	14.2	74.2	27.14	14.06	46.7	7.2

Le site d'Homécourt se différencie des deux autres par une forte teneur en matières organiques (carbone et azote), expliquée en partie par les fortes teneurs en HAP présentes dans ce sol. Le site de SOTRENOR ne présente pas de particularité par rapport aux deux autres sites, mise à part une plus faible proportion de sable et une plus forte de limon. Quant au site d'Hargarten aux Mines, il

est caractérisé par un pH acide de 5 et une capacité d'échange cationique inférieure à celle des autres sites.

Les concentrations en éléments métalliques considérées comme biodisponibles (extraction à l'EDTA) sont présentées dans le Tableau 46.

Tableau 46 : Concentrations totales et biodisponibles en éléments métalliques dans les sols d'Homécourt, de SOTRENOR et d'Hargarten aux Mines, en mg.kg⁻¹ PS.

	Homécourt		SOTRENOR		Hargarten aux Mines	
	total	<i>disponible</i>	total	<i>disponible</i>	total	<i>disponible</i>
Cu	40.36	8.50	36.44	7.10	82	7.09
Zn	296.46	24.99	155.80	17.20	119	11.29
Fe	59701.91	71.97	25339.89	48.97	54000	233.71
Mn	1290.2	135.95	461.64	57.74	2690	269.67
Ni	17.53	0.65	24.26	0.90	15.4	0.86
Pb	241.56	9.70	37.44	14.30	2481	1691.94
Cd	1.46	0.24	1	0.27	0.8	0.13
Cr	94.23	0.60	23.32	0.15	95	0.10

Pour évaluer les capacités bioindicatrices des éléments métalliques par H.a.a., il est nécessaire d'établir s'il existe ou non des relations linéaires significatives entre les concentrations totales ou biodisponibles dans le sol, et les concentrations mesurées dans les viscères des escargots. Les coefficients de corrélation linéaire obtenus, à partir des résultats de ces trois sites, sont présentés dans le Tableau 47.

Tableau 47 : Coefficient de corrélation linéaire R² correspondant aux relations entre les concentrations totales ou biodisponibles dans le sol des trois sites (Homécourt, SOTRENOR et Hargarten aux Mines) et les concentrations dans les viscères des escargots transférés ([M] : concentration en métal)

[M] sol	Cu	Zn	Fe	Mn	Ni	Pb	Cd	Cr
[M] total	0.8278	0.9753	0.9955	0.6544	0.1402	0.9831	0.9258	0.0429
[M] disponible	0.5941	0.9921	0.2728	0.6574	0.9968	0.9972	0.1129	0.9546

Excepté pour le nickel et le chrome, les concentrations en éléments métalliques dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* sont significativement corrélées aux concentrations en métal total dans le sol : les R² obtenus sont compris entre 0.6544 et 0.9955. En tenant compte des concentrations en

métal biodisponible dans le sol, la corrélation sol-escargot se retrouve pour tous les éléments métalliques excepté le fer et le cadmium.

Dans le cas du cuivre, les concentrations mesurées dans les viscères sont corrélées aux concentrations totales dans le sol, sans influence du pH ou du taux de matières organiques.

En ce qui concerne le zinc, alors que les concentrations dans le sol des sites de SOTRENOR et d'Hargarten aux Mines sont proches (respectivement 155.80 et 119 mg.kg⁻¹ PS), les concentrations trouvées dans les viscères des escargots transférés sont significativement différentes (respectivement de 357.62 et 435.8 mg.kg⁻¹ PS). L'accumulation supérieure du zinc par les escargots transférés à Hargarten aux Mines peut s'expliquer par une biodisponibilité du zinc supérieure au niveau de ce site, due à un pH relativement acide de 5. Cette influence du pH sur la mobilité du zinc a déjà été mise en évidence par plusieurs auteurs ainsi que ses effets sur sa biodisponibilité pour les organismes terrestres (Amrani *et al.*, 1999 ; Speir *et al.*, 2003). De même pour le nickel, alors que les concentrations dans le sol des sites d'Homécourt et d'Hargarten aux Mines sont proches (respectivement de 17.53 et 15.4 mg.kg⁻¹ PS), les concentrations trouvées dans les viscères des escargots transférés sont significativement différentes (respectivement de 2.25 et 4.28 mg.kg⁻¹ PS). L'accumulation supérieure de nickel par les escargots transférés à Hargarten aux Mines peut s'expliquer par une biodisponibilité du nickel supérieure au niveau de ce site, due au pH relativement acide du sol. Cette influence du pH du sol sur la mobilité et la disponibilité pour les organismes a été mise en évidence par Speir *et al.* (2003).

Dans le cas des concentrations en fer, les concentrations mesurées dans les viscères sont corrélées aux concentrations totales dans le sol, avec une légère influence de la matière organique sur son accumulation dans les escargots. En effet, alors que la concentration en fer dans le sol d'Homécourt est la plus importante, les escargots transférés sur ce site accumulent le moins de fer dans leurs viscères. La présence de matière organique peut expliquer ce résultat car elle intervient dans la fixation des éléments métalliques et diminue donc leur disponibilité pour les organismes (Singh *et al.*, 2000 ; Hui, 2002). La même observation est réalisée pour le manganèse.

Dans le cas du plomb et du cadmium, alors que les concentrations mesurées dans le sol d'Homécourt sont supérieures à celles du sol de SOTRENOR, les escargots transférés sur le site d'Homécourt accumulent des quantités inférieures. Le fort taux de matières organiques présent dans ce sol limite la disponibilité du plomb et du cadmium pour les organismes (Ge *et al.*, 2000 ; Lehoczky *et al.*, 2000a ; Hui, 2002).

En ce qui concerne le chrome, les concentrations présentes dans les escargots ne sont pas liées aux concentrations totales dans le sol ($R^2 = 0.0429$) mais elles sont en relation avec les teneurs disponibles ($R^2 = 0.9546$). Comme pour le cadmium et le plomb, le fort taux de matières organiques limite l'accumulation du chrome sur le site d'Homécourt, avec pour conséquence que, pour des

concentrations totales dans le sol équivalentes sur les sites d'Homécourt et d'Hargarten aux Mines, les escargots transférés sur le site d'Homécourt accumulent deux fois moins de chrome.

Le fait que H.a.a. se présente comme un déconcentreur de plomb, chrome, nickel, fer et manganèse, ne limite en rien sa capacité à indiquer la contamination du sol, les coefficients de corrélation linéaire pour ces métaux étant élevés.

*En tenant compte des teneurs en métal total dans le sol pour le cuivre, le zinc, le fer, le manganèse, le plomb et le cadmium, et des concentrations en métal biodisponible pour le nickel et le chrome, l'escargot *Helix aspersa aspersa* se présente comme un bioindicateur pertinent des niveaux de contamination en éléments métalliques dans les sols. L'accumulation de ces éléments dans ses viscères dépend en partie des caractéristiques physico-chimiques du sol, conditionnant leur disponibilité vis-à-vis des escargots. Ainsi, le pH du sol influence la biodisponibilité du zinc et du nickel, la matière organique influence la biodisponibilité du fer, du manganèse, du plomb, du cadmium et du chrome. L'accumulation du cuivre, métal essentiel pour les escargots, ne semble pas régir par des facteurs édaphiques.*

VI.2.2. Validation des grilles de contamination existantes

A partir des résultats obtenus au cours de ces études, les niveaux définis par Pihan (2001) et Berger et Dallinger (1993), pour délimiter les classes de contamination des viscères des escargots, ont été testés (Tableau 48)

Tableau 48 : Correspondances entre les concentrations (en mg.kg⁻¹ PS) en plomb, cuivre, cadmium et zinc dans les viscères des escargots transférés sur les sites, et les grilles de contamination définies par Pihan (2001) et Berger et Dallinger (1993).

Site/Etude	Pb	Cu	Cd	Zn	Pihan, 2001	Berger et Dallinger, 1993
Hargarten	48-65	180-230	2-3	400-460	Classes III-IV Site contaminé en plomb	Classe 3 Faciès minier
SOTRENOR	3.5-6	150	1-2.2	300-400	Classes I- II, III pour le zinc Faible contamination	Classes 1-2 Faible contamination
Homécourt	1.2-3.8	100-110	1-1.8	200-250	Classes I-II Faible contamination	Classes 1-2 Faible contamination

CEDILOR	1.2-5.7	110-190	0.8-3	230-330	Classes I- II, III pour le zinc Faible contamination	Classes 2-1 Faible contamination
---------	---------	---------	-------	---------	---	--

Hargarten aux Mines est un site minier : les concentrations métalliques dans les escargots transférés sur ce site sont en accord avec la classe 3 proposée par Dallinger, sauf pour le cadmium pour lequel les concentrations mesurées sont inférieures. Ce site est très contaminé en plomb et les concentrations trouvées dans les escargots transférés sur le site appartiennent aux classes III et IV de contamination définies par Pihan (2001).

Les concentrations trouvées dans les escargots transférés sur le site de SOTRENOR sont en accord avec les niveaux proposés par Dallinger dans le cas d'un environnement de ville ou de trafic routier, sauf pour le plomb et le cadmium. Le site de SOTRENOR est un site faiblement contaminé, avec des classes de contamination variant entre I et II pour le plomb, I pour le cadmium, II pour le cuivre et III pour le zinc. Les grilles de contamination définies par Pihan (2001) traduisent donc bien le faible niveau de contamination du site.

Dans le cas de Homécourt et de CEDILOR, les sites présentent une faible contamination en éléments métalliques, en adéquation avec les classes I et II selon Pihan (2001) et les classes 1 et 2 de Berger et Dallinger (1993).

VI.3. Evaluation des capacités de bioindication des HAP par l'escargot H.a.a.

La parcelle expérimentale mise en place par le LIMOS sur le site d'Homécourt, nous a permis de tester la réponse de l'escargot face à une pollution mixte, majoritairement dominée par les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Aucune étude n'ayant été menée à ce jour sur l'étude de la bioaccumulation des HAP par les gastéropodes terrestres, il nous a semblé pertinent de commencer à explorer cette voie. Les dosages ont été réalisés dans le sol et les animaux transférés. La Figure 64 met en relation les concentrations en HAP significatives (phénanthrène, acénaphène, anthracène, fluoranthène, pyrène, chrysène, Baa et Ip) mesurées dans les viscères des escargots, par rapport à celles correspondantes dans le sol.

Il existe une relation linéaire significative entre les concentrations en HAP dans les viscères et dans le sol, avec un coefficient de régression linéaire de 0.6069.

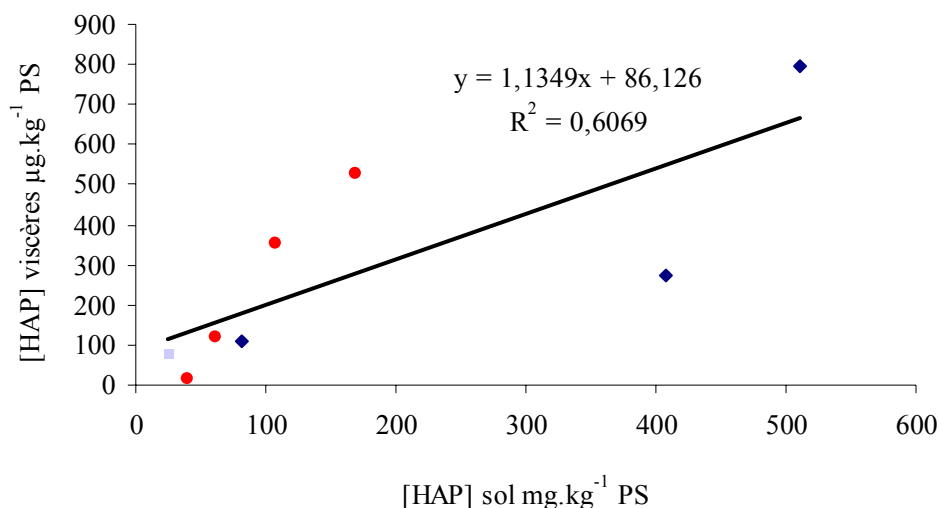


Figure 64 : Relation entre les concentrations en HAP dans le sol et celles dans les viscères des escargots transférés sur le site d'Homécourt (HAP à 3 cycles, HAP à 4 cycles, HAP à 6 cycles).

Toutefois, il semble exister une différence de comportement entre les différents HAP étudiés en fonction de leur nombre de noyaux aromatiques : les facteurs d'accumulation calculés pour les HAP à 4 cycles et plus sont supérieurs à ceux déterminés pour les HAP à 3 cycles. Une nouvelle recherche de relation entre les concentrations dans le sol et dans les escargots a donc été réalisée en tenant compte du nombre de cycles : la Figure 65 présente ces résultats dans le cas des HAP à trois (a) et quatre (b) cycles.

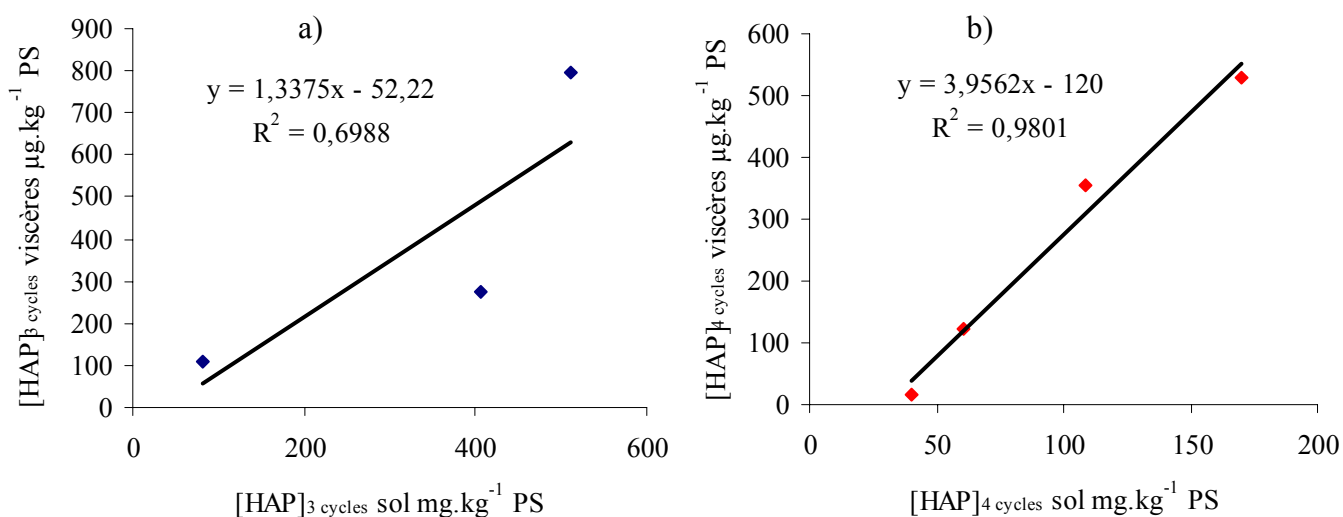


Figure 65 : Relation entre les concentrations en HAP dans le sol et les viscères des escargots transférés pour les HAP à 3 cycles (a : phénanthrène, acénaphthène, anthracène et Baa) et pour les HAP à 4 cycles (b : fluoranthène, pyrène et chrysène).

Les escargots terrestres semblent être de bons bioindicateurs de la contamination des sols par les hydrocarbures : en effet, les coefficients de corrélation linéaire entre la concentration dans le sol et celle dans les viscères sont significatifs et supérieurs dans le cas des HAP à quatre cycles ($R^2 = 0.9801$) par rapport aux HAP à 3 cycles.

Les HAP sont des molécules relativement non volatiles (sauf dans le cas des HAP les plus légers) et peu solubles, adsorbées le plus souvent sur les particules du sol. De plus, lorsque leur masse moléculaire augmente, c'est-à-dire que leur nombre de cycles aromatiques les constituant augmente, leur solubilité dans les tissus gras s'accroît aussi. La présence de HAP dans les viscères des escargots transférés confirme donc l'ingestion de particules de sol par ces organismes, dans leur régime alimentaire. L'accumulation des HAP à 4 cycles, avec un coefficient de corrélation linéaire de 0.9801, renseigne sur l'affinité de ces molécules lipophiles vis-à-vis des lipides des viscères des escargots.

Compte tenu de ces premiers résultats, il serait intéressant de poursuivre les recherches dans cette optique, avec, tout d'abord, une confirmation des capacités de bioindication des polluants organiques par *Helix aspersa aspersa*, et par la suite des études de bioaccumulation en différenciant les organes au sein des viscères.

- **La température est le facteur prépondérant de la variation du taux de croissance des escargots transférés : il est donc nécessaire de bien définir les conditions climatiques (saison) de réalisation des tests de croissance *in situ*.**
- **Les corrélations linéaires positives entre les concentrations en éléments métalliques dans le sol et les concentrations mesurées dans les viscères des escargots transférés confirment la capacité de bioindication d'H.a.a. pour les éléments métalliques dans les sols.**
- **Le pH influence la mobilité et la biodisponibilité du zinc, et du nickel, alors que le taux de matières organiques influence lui la mobilité et la biodisponibilité du fer, du manganèse, du plomb, du cadmium et du chrome.**
- **L'existence d'une relation linéaire significative entre les concentrations en HAP dans le sol et celles dans les viscères des escargots transférés pourrait amener à une bioindication possible des molécules organiques par H.a.a.**

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le premier objectif fixé en début de recherche était la mise au point du transfert d'escargots provenant d'un élevage sur les sites à diagnostiquer, du point de vue d'une éventuelle contamination polymétallique. Tout d'abord, le microcosme précédemment utilisé a été amélioré afin de permettre un transfert d'organismes dans les meilleures conditions possibles : cylindre en PVC n'accumulant pas la chaleur, apport régulier d'eau à l'intérieur du microcosme pour maintenir une hygrométrie supérieure à 80% et ainsi stimuler au maximum les escargots, même en cas de fortes chaleurs, et enregistrement de la température et de l'hygrométrie durant toute la durée du transfert afin de tenir compte de leur influence sur la croissance. Ensuite, nous nous sommes attachés à déterminer la combinaison de nourriture à apporter aux escargots offrant le meilleur rapport croissance-accumulation des éléments métalliques. Toute la difficulté résidait dans le fait de répondre à la question : doit-on supplémenter la végétation par de la farine Helixal, au risque de diminuer l'ingestion de végétaux et de sol ? En gardant à l'esprit cette préoccupation, un plan expérimental a été réalisé et nous a permis choisir la combinaison de nourriture suivante : trèfle autochtone ou préalablement semé sur les parcelles du site, associé à de la farine Helixal, apportant tous les minéraux essentiels au développement des escargots.

Dans un deuxième temps, une fois arrêtée la combinaison de nourriture offerte aux escargots lors des transferts, nous avons réalisé plusieurs expériences de biosurveillance active sur différents sites afin de tester l'efficacité du nouveau protocole de transfert en conditions de terrain. Cette phase de validation s'est effectuée sur trois sites présentant des profils de contamination différents. A l'issue de ces expérimentations, nous avons pu conclure que le microcosme et la combinaison de nourriture offerte aux escargots permettaient un transfert efficace des escargots sur les sites : les taux de croissance sont significatifs et l'accumulation des métaux lourds à partir de leur environnement est effective. L'analyse des données de bioaccumulation obtenues a confirmé le fort potentiel bioindicateur d'*Helix aspersa aspersa* en ce qui concerne les éléments métalliques, avec des relations linéaires entre les concentrations en éléments métalliques dans le sol et celles retrouvées dans les viscères des escargots. De plus, *Helix aspersa aspersa* semble aussi posséder des dispositions intéressantes pour la bioindication de pollutions organiques par les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Toutefois, il apparaît essentiel de coupler la biosurveillance active des sites avec une biosurveillance passive afin d'intégrer au mieux le contexte historique de

contamination du site et de réaliser un diagnostic le plus fiable possible. En effet, pour certains métaux comme le plomb, un transfert d'un mois des escargots sous-estime le niveau de contamination du site sur du long terme. *Helix aspersa aspersa* permet ainsi de suivre l'évolution temporelle des niveaux de contamination en éléments métalliques d'un site mais aussi de caractériser au niveau spatial une contamination en éléments métalliques.

Enfin, en complément à ces expérimentations sur le terrain, une étude écotoxicologique appliquée a été réalisée concernant le cuivre. Les résultats obtenus dans les différents élevages hélicoles français étudiés soulignent l'importance de limiter la supplémentation de la nourriture en éléments métalliques, dont le cuivre, mais ne nous ont pas permis de conclure quant à une éventuelle relation entre les concentrations en éléments métalliques dans les viscères des escargots, l'évolution des profils bactériologiques des escargots et leur mortalité. Au niveau cellulaire, le cuivre pénètre pour partie au niveau des cellules digestives de la glande digestive, puis est transporté par certaines cellules sanguines (hyalinocytes ou amoebocytes) avec phagocytose et vraisemblablement formation de sulfures, avant excrétion au niveau des vacuoles apicales des néphrocytes.

Pourtant, même si le dispositif expérimental a déjà subi une première série de modifications, de nouvelles améliorations pourraient être apportées aux microcosmes, surtout au niveau de la mesure de paramètres environnementaux. Ainsi, un dispositif recueillant les dépôts secs et les eaux de pluie, à l'intérieur des microcosmes, permettrait d'évaluer au plus juste la part des différentes sources de contamination pour les escargots transférés.

Après sa validation sur les sites industriels, ce test devrait être réalisé sur une gamme plus diversifiée de sites (en milieu agricole ou autoroutier) présentant des contaminations en éléments métalliques et en hydrocarbures aromatiques polycycliques importantes.

C'est d'ailleurs dans la voie de la bioindication des HAP que devraient se concentrer les futures études, domaine totalement vierge de toute étude et pourtant important du point de vue de la biomagnification des HAP dans la chaîne alimentaire, jusqu'à l'homme.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Abollino, O., Aceto, M., Malandrino, M., Mentastia, E., Sarzanini, C. et Barberis, R. (2002). Distribution and mobility of metals in contaminated sites. Chemometric investigation of pollutant profiles. *Environmental Pollution*, **119**: 177-193.
- Aldenberg, T. et Slob, W. (1993). Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **25**: 48-53.
- Aldenberg, T. et Jaworska, J.S. (2000). Uncertainty of the hazardous concentration and fraction affected for normal species sensitivity distributions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **46**(1): 1-18.
- Alexander, M. (2000). Aging, bioavailability and overestimation of risk from environmental pollutants. *Environmental Science and Technology*, **34**(20): 4259-4265.
- Alloway, B. J. (1990). *Heavy metals in soil*. Blackie and Son, Glasgow, UK.
- Amrani, M., Westfall, D.G. et Peterson, G.A. (1999). Influence of water solubility of granular zinc fertilizers on plant uptake and growth, *Journal of Plant Nutrition*, **26**(11): 2162-2174.
- Ansart, A., Vernon, P., Charrier, M. et Daguzan, J. (2002). The effect of antibiotic treatment on the supercooling ability of the land snail *Helix aspersa* (Gastropoda : Pulmonata). *Cryobiology*, **44**: 189-192.
- Atanassova, I. et Brümmer, G.W. (2003). Polycyclic aromatic hydrocarbons of anthropogenic and biopedogenic origin in a colluviated hydromorphic soil in Western Europe. *Geoderma* sous presse.
- Athar, R. et Ahmad, M. (2002). Heavy metal toxicity: effect on plant growth and metal uptake by wheat and on free living *Azotobacter*. *Water, air and soil pollution*, **138**: 165-180.
- Aubert, C. (1998). Mémento de l'éleveur d'escargots, Ed ITAVI, 3^{ème} réédition, 216p.
- Baize, D. (1997). *Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France)*. INRA, Paris, 408p.
- Baize, D. (2000). Teneurs totales en "métaux lourds" dans les sols français, résultats généraux du programme ASPITET. *Le Courier de l'Environnement*, n° 39.
- Bak, J., Jensen, J., Larsen, M.M., Pritzl, G. et Scott-Fordsmand, J. (1997). A heavy metal monitoring-programme in Denmark. *The Science of the Total Environment*, **207**(2-3): 179-86.
- Baker, A.J.M. (1981). Accumulators and excluders – strategies in the response of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition*, **3**(1-4): 643-654.
- Bakker, M.I., Casado, B., Koerselman, W., Tolls, J. et Kollöffel, C. (2000). Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and plant samples from the vicinity of an oil refinery. *The Science of the Total Environment*, **263**: 91-100.

- Banuelos, G.S. et Ajwa, H.A. (1999). Trace elements in soils and plants: an overview. *Journal of Environmental Science and Health Part a- Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, **34**(4): 951-974.
- BASOL : <http://basol.environnement.gouv.fr/>
- Baumann, P.C. et Harshbarger, J.C. (1995). Decline in liver neoplasms in wild brown bullhead catfish after coking plant closes and environmental PAHs plummet. *Environmental Health and Perspectives*, **103**: 168-170.
- Beeby, A. et Richmond, L. (2001). Intraspecific competition in populations of *Helix aspersa* with different histories of exposure to lead. *Environmental Pollution*, **114**: 337-344.
- Beeby, A. et Richmond, L. (2002). Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators*, **24**: 1-10.
- Belfroid, A., Seinen, W., van Gestel, K., Hermens, J. et van Leeuwen, K. (1995). Modelling the accumulation of hydrophobic organic chemicals in earthworms: application to the equilibrium partitioning theory. *Environmental Science and Pollution Research*, **2**: 5-15.
- Berger, B. et Dallinger, R. (1993). Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental pollution. *Environmental Monitoring Assessment*, **25**: 65-84.
- Berger, B., Dallinger, R., Felder, E. et Moser, J. (1993). Budgeting the flow of cadmium and zinc through the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L., In *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, Ed Dallinger R. and Rainbow P.S., 291-313.
- Berger, B., Dallinger, R., Gehrig, P. et Hunziker, P.E. (1997). Primary structure of a copper-binding metallothionein from mantle tissue of terrestrial gastropod *Helix pomatia* L. *Biochemical Journal*, **328**: 219-224.
- Boháč, J. et Pospíšil, J. (1989). Accumulation of heavy metals in invertebrates and its ecological aspects. In *Heavy metals in environments Vol 1*, Eds Vernet J.P., CEP Consultants Ltd, Edinburgh, 354p.
- Bonnefoy, D. et Bourg, A. (1985). Fonds géochimiques régionaux et contamination des sols : l'exemple du bassin versant de l'Orne. *Hydrogéologie*, **1**: 45-53.
- Boyd, R.S., Davis, M.A., Wall, M.A. et Balkwill, K. (2002). Nickel defends the South African hyperaccumulator *Senecio coronatus* (Asteraceae) against *Helix aspersa* (Mollusca: Pulmonidae). *Chemoecology*, **12**(2): 91-97.
- BRGM (2002). Gestion des sites (potentiellement) pollués : valeurs guides en matière de pollution des eaux et des sols. Version 2, BRGM Edition.
- Bulla, L.A. et Cheng, T.C. (1997). Biochemical and ultrastructural evidence for the double role of phagocytosis in molluscs: defense and nutrition. *Comparative pathobiology*, **3**: 21-30.

- Buszewski, B., Jastrzebska, A., Kowalkowski, T. et Gorna-Binkul, A. (2000). Monitoring of selected heavy metals uptake by plants and soils in the area of Torun, Poland. *Polish Journal of Environmental Studies*, **9**(6): 511-515.
- Cajaraville, M.P. (1995). Cell biology in environmental toxicology, Environmental Toxicology, Ed Cajaraville MP, University of the Basque Country Press Service, Bilbao, 299p.
- Chander, K., Dyckmans, J., Joergensen, R.G., Meyer, B. et Raubuch, M. (2001). Different sources of heavy metals and their long-term effects on soil microbial properties. *Biology and fertility of soils*, **34**: 241-247.
- Charrier, M. (1995). Particularités du métabolisme digestif d'un gastéropode pulmoné phytophage *Helix aspersa* Müller. Recherches histologiques, histochimiques, enzymologiques et microbiologiques, Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques, Université de Rennes, 344p.
- Charrier, M. (2000). Recherches sur la nutrition des escargots. *Journée Nationale de l'Escargot*, La Motte Servolex, 11p.
- Cheng, T.C. et Sullivan, J.T. (1984). Effects of heavy metals on phagocytosis by molluscan hemocytes. *Marine Environmental Research*, **14**: 305-315.
- Chevalier, L., Desbuquois, C., Le Lannic, J. et Charrier, M. (2001). Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata). *Compte rendu Académie des Sciences de Paris*, **324**: 974-987.
- Citterio, S., Aina, R., Labra, M., Ghiani, A., Fumagalli, P., Sgorbati, S. et Santagostino, A. (2002). Soil genotoxicity assessment: a new strategy based on biomolecular tools and plant bioindicators. *Environmental Science and Technology*, **36**: 2748-2753.
- Coeurdassier, M., Gomot-de-Vaufleury, A. et Badot, P.M. (2000). Dose-dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa aspersa*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **19**(10): 2571-2578.
- Coeurdassier, M., Saint-Denis, M., Gomot de Vaufleury, A., Ribera, D. et Badot, P.M. (2001). The garden snail (*Helix aspersa*) as a bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterase activity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **20**(9): 1951-1957.
- Cooper, P.A. (1991). Leaching of Wood Preservatives from Treated Wood in Service, Travaux publics Canada, Ottawa, Ont., 79 p.
- Cortet, J., Gomot-de-Vaufleury, A., Poinot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C. et Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology*, **35**(3): 115-134.
- Coughtrey P.J. et Martin, M.H., 1976, The distribution of Pb, Zn, Cd and Cu within the pulmonate mollusc *Helix aspersa* Müller, *Oecologia*, **23**: 315-322.

- Crommentuijn, T., Doodeman, C.J.A.M., Van Der Pool, J.J.C., Doornekamp, A., Rademaker, M.C.J. et Van Gestel, C.A.M. (1995a). Sublethal sensitivity index as an ecotoxicity parameter measuring energy allocation under toxicant stress: application to cadmium in soil arthropods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **31**: 192-200.
- Crommentuijn, T., Ståb, J.A., Doornekamp, A., Estoppey, O. et Van Gestel, C.A.M. (1995b). Comparative ecotoxicity of cadmium, chlorpyrifos and triphenyltin hydroxyde for four clones of the parthenogenic collembolan *Folsomia candida* in an artificial soil. *Functional Ecology*, **9**: 734-742.
- Daguzan, J. (1985). Essais d'utilisation de divers aliments composés pour l'élevage d'escargots Petit Gris (*Helix aspersa* Müller). *Bulletin d'Informations Technologiques ITAVI sur l'élevage de l'escargot*, Paris.
- Dallinger, R. (1993). Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, Lewis Publishers, 245-289.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P.E. et Kägi, J. (1997). Metallothionein in snail: Cd and Cu metabolism. *Nature*, **388**: 237-238.
- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P.E. et Kägi, J. (1999). Structure and function of metallothionein isoforms in terrestrial snails. *Metallothionein IV*, 173-178.
- Dallinger, R., Berger, B., Gruber, C., Hunziker, P.E. et Stürzenbaum, S. (2000). Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cellular and Molecular biology*, **46**(2): 331-346.
- Dallinger, R. et Wieser, W. (1984). Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comparative biochemistry and physiology Part C*, **79**(1): 117-124.
- Degez, P. (1992). Contribution à l'étude de la pathologie des pontes associée aux pontes anormales chez *Helix aspersa*. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, 131p.
- Denaix, L., Semlali, R.M. et Douay, F. (2001). Dissolved and colloidal transport of Cd, Pb and Zn in a silt loam soil affected by atmospheric industrial deposition. *Environmental Pollution*, **113**: 29-38.
- Dudka, S., Piotrowska, M., Chlopecka, A. et Witek, T. (1995). Trace metal contamination of soils and crop plants by the mining and smelting industry in Upper Silesia, South Poland. *Journal of Geochemical Exploration*, **52**: 237-250.
- Edwards, N.T. (1986). Uptake, Translocation and Metabolism of Anthracene in Bush Bean *Phaseolus vulgaris*, *Environmental Toxicology and Chemistry*, **5**: 659-665.
- Facchinelli, A., Sacchi, E. et Mallen, L. (2001). Multivariate statistical and GIS-based approach to identify heavy metal sources in soils. *Environmental Pollution*, **114**: 313-324.

- Fakayode, S.O. et Onianwa, P.C. (2002). Heavy metal contamination of soil, and bioaccumulation in Guinea grass (*Panicum maximum*) around Ikeja Industrial Estata, Lagos, Nigeria. *Environmental Geology*, **43**: 145-150.
- Fent, K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites. *Toxicology Letters*, **140-141**: 353-365.
- Förstner, U. (1985). Chemicals forms and reactivities of metals in sediments. In *Cemical methods for assessing bio-available metals in sludges and soil*, Leschberg R., Davis R.D., L'Hermite P. Elsevier Applied Science Publishers, 1-30.
- Fournie, J. et Chetail, M. (1982). Accumulation calcique au niveau cellulaire chez les mollusques. *Malacologia*, **22**(1-2): 265-284.
- Fournie, J. et Chetail, M. (1984). Calcium dynamics in land gastropods. *American Zoology*, **24**: 857-870.
- Frias-Espericueta, M.G., Voltolina, D. et Osuna-Lopez, J.I. (2003). Acute toxicity of copper, zinc, iron and manganese and the mixtures copper-zinc and iron-manganese to whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei* Postlarvae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **71**: 68-74.
- Fytianos, K., Katsianis, G., Triantafyllou, P. et Zachariadis, G. (2001). Accumulation of heavy metals in vegetables grown in an industrial area in relation to soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **67**: 423-430.
- Gabe, M. (1968). Techniques histologiques, Masson et Cie Editeurs, Paris, 1113p.
- Garcia, R. et Millan, E. (1998). Assessment of Cd, Pb and Zn contamination in roadside soils and grasses from Gipuzkoa (Spain). *Chemosphere*, **37**(8): 1615-1625.
- Garrett, R.G. (2000). Natural sources of metals to the environment. *Human and ecological risk assessment*, **6**(6): 945-963.
- Gauglhofer, J. et Bianchi, V. (1991). Chromium. In *Metals and their compounds in the Environment Vol 1*, Merian E. Ed, VHC, Weinheim, Germany, 853-878.
- Ge, Y., Murray, P. et Hendershot, W. (2000). Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environmental Pollution*, **107**: 137-144.
- George, S.G., Carpene, E., Coombs, T.L., Overnell, S. et Youngson, A. (1979). Characterization of cadmium-binding proteins from mussels *Mytilus edulis* (L.) exposed to cadmium. *Biochemistry and Biophysic acta*, **580**: 225-233.
- Godin, P.M. (1982). Sources de contamination et enjeux. Eléments traces et pollution des sols, Paris.
- Godin, P.M. (1984). Analyse et traitement des sols pollués. Projet de cahier technique, Secrétariat chargé de l'environnement, 155p.

- Gomot, A. (1994). *Contribution à l'étude de la croissance d'escargots du genre Helix : influence des facteurs de l'environnement. Nutrition et composition biochimique. Contrôle neuro-endocrine*. Theses en Sciences de la Vie, Université de Besançon, 258p.
- Gomot, A. (1997). Dose-dependant effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **33**: 209-216.
- Gomot-de-Vaufleury, A. (2000). Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **46**: 41-50.
- Gomot-de-Vaufleury, A. et Kerhoas, I. (2000). Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **64**: 434-442.
- Gomot-de-Vaufleury, A. and Pihan, F. (2000). Growing snails used as sentinels for the evaluation of terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere*. **40**, 275-284.
- Gorree, M., Tamis, W.L.M., Traas, T.P. et Elbers, M.A. (1995). BIOMAG: a model for biomagnification in terrestrial food chains. The case of cadmium in the Kempen, The Netherlands. *The Science of the Total Environment*, **168**: 215-223.
- Hamelink, J.L., Landrum, P.F., Bergman, H.L. et Benson, W.H. (1994). Bioavailability. Physical, Chemical and biological interactions. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Hamza-Chaffai, A., Amiard, J.C., Pellerin, J., Joux, L. et Berthet, B. (2000). The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of *in situ* metal exposure. *Comparative biochemistry and physiology Part C*, **127**: 185-197.
- Hatzinger, P.B. et Alexander, M. (1995). Effects of aging of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environmental Science and Technology*, **29**(2): 537-545.
- Heikens, A., Peijnenburg, W.J.G.M. et Hendriks, A.J. (2001). Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution*, **113**: 385-393.
- Herbes, S.E. et Schwall, L.R. (1978). Microbial Transformation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Pristine and Petroleum-contaminated Sediments. *Applied Environmental Microbiology*, **35**: 306-316.
- Hopkin, S.P. (1989). *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier, New York, 366p.
- Hopkin, S.P., Hames, C.A.C. et Dray, A. (1989). X-ray microanalytical mapping of the intracellular distribution of pollutant metals. *Microscopy and Analysis*, **14**: 23-27.
- Hui, C.A. (2002). Lead distribution throughout soil, flora and an invertebrate at a wetland skeet range. *Journal of Toxicology and Environmental Health – Part A*, **65**(15): 1093-1107.

- Hugon, F. (1993). Ecologie microbienne de l'appareil reproducteur de l'escargot, caractérisation de 38 souches de Vibrionaceae isolées dans un élevage d'*Helix aspersa* à pontes roses. Diplôme d'Etudes Approfondies, Université Claude Bernard de Lyon, 71p.
- Hund-Rinke, K. et Kördel, W. (2003). Underlying issues in bioaccessibility and bioavailability: experimental methods. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56** : 52-62.
- Iglesias, J., Santos, M. et Castillejo, J. (1996). Annual activity cycles of the land snail *Helix aspersa* Müller in natural populations in north-western Spain. *Journal of Molluscan Studies*, **62**: 495-505.
- INERIS, Fiches toxicologiques www.ineris.fr
- Imperato, M., Adamo, P., Naimo, D., Arienzo, M., Stanzione, D. et Violante, P. (2003). Spatial distribution of heavy metals in urban soils of Naples city (Italy). *Environmental Pollution*, **124**: 247-256.
- ISO/DIS 11267 (1999). Qualité du sol – Inhibition de la reproduction de Collembole (*Folsomia candida*) par des polluants du sol, 16p.
- ISO/DIS 11268-1 (1993). Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*), Partie 1 : détermination de la toxicité aiguë en utilisant des substrats de sol artificiel, 7p.
- ISO/DIS 11268-2 (1998). Qualité du sol – Effets des polluants vis-à-vis des vers de terre (*Eisenia fetida*), Partie 2 : Détermination des effets sur la reproduction, 18p.
- Jess, S. et Marks, R.J. (1998). Effect of temperature and photoperiod on growth and reproduction of *Helix aspersa* var. *maxima*. *Journal of Agricultural Science*, **130**: 367-372.
- Johnson, D.L., Jones, K.C., Langdon, C.J., Pearce, T.G. et Semple, K.T. (2002). Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, **34**: 1363-1370.
- Jones, D.T. (1991). Biological Monitoring of metal pollution in terrestrial ecosystems, Thèse de l'Université de Reading.
- Jones, K.C., Alcock, R.E., Johnson, D.L., Nothcott, G.J., Semple, K.T. et Woolgar, P.J. (1996). Organic chemicals in contaminated land: analysis, significance and research priorities. *Land contaminated reclamation*, **3**: 189-197.
- Juste, C. (1995). Les micro-polluants dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. Convention ADEME-INRA, ADEME, 209p.
- Kaasalainen, M. et Yli-Halla, M. (2003). Use of sequential extraction to assess metal partitioning in soils. *Environmental Pollution*, **126**: 225-233.
- Kabata-Pendias, A. et Pendias, H. (1986-1992-2002). Trace elements in soils and plants, Boca Raton, Floride, CRC Press.

- Kabata-Pendias, A. et Adriano, D.C. (1995). Trace metals. In Soil amendments and environmental quality. *Agriculture and Environment Series*, Chapter, 139-167.
- Kabata-Pendias, A. (2004). Soil-plant transfer of trace elements - an environmental issue. *Geoderma*, 7 p.
- Keddy, C., Greene, J.C. and Bonnel, M.A. (1994). A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment and freshwater in Canada. **Etude n°198** Série Scientifique, Environnement Canada, Ontario, 139p.
- Khargarot, B.S. et Rathore, R.S. (1999). Copper exposure reduced the resistance of the catfish *Saccobranchus fossilis* to *Aeromonas hydrophila* infection. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **62**(4): 490-495.
- Kim, E.-J., Oh, J.-E. et Chang, Y.-S. (2003). Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. *The Science of the Total Environment*, **311**: 177-189.
- Knight, B.P., Chaudri, A.M., McGrath, S.P. et Giller, K.E. (1998). Determination of chemical availability of cadmium and zinc in soils using inert soil moisture samplers. *Environmental Pollution*, **99**: 293-298.
- Kodjo, A., Borges, E., Maurin, F. et Richard, Y. (1996). Contribution à l'étude de la flore aérobie de l'appareil génital de l'escargot Petit Gris (*Helix aspersa*). *Revue de Médecine Vétérinaire*, **147**: 825-830.
- Kodjo, A., Haond, F. et Richard, Y. (1997). Molecular and phenotypic feature of *Aeromonas* isolated from snails (*Helix aspersa*) affected with a summer disease, *Journal of Veterinary Medicine B*, **44**: 245-252.
- Krauss, M., Wilcke, W. et Zech, W. (2000). Availability of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) to earthworms in urban soils. *Environmental Sciences and Technology*, **34**: 4335-4440.
- Krauss, M., Wilcke, W., Kobza, J. et Zech, W. (2002). Predicting heavy metal transfer from soil to plant: potential use of Freundlich-type functions. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **165**: 3-8.
- Krauss, M. et Wilke, W. (2003). Polychlorinated naphthalenes in urban soils: analysis, concentrations, and relations to other persistent organic pollutants. *Environmental Pollution*, **122**: 75-89.
- Kugonic, N. et Kopusar, N. (2000). Garden soil and vegetable pollution assessment of the Upper Meza Valley (Slovenia). *Phyton-Annales Rei Botanicae*, **40**(4): 117-121.
- Laskowski, R. et Hopkin, S.P. (1996a). Effect of Zn, Cu, Pb and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **34**(1): 59-69.

- Laskowski, R. et Hopkin, S.P. (1996b). Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): implications for predators. *Environmental Pollution*, **91**(3): 289-297.
- Lehoczky, E., Szabo, L., Horvath, S., Marth, P. et Szabados, I. (1998). Cadmium uptake by lettuce in different soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **29**(11-14): 1903-1912.
- Lehoczky, E., Marth, P., Szabados, I., Palkovics, M. et Lukacs, P. (2000a). Influence of soil factors on the accumulation of cadmium by lettuce. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **31**(11-14): 2425-2431.
- Lehoczky, E., Marth, P., Szabados, I. et Szomolanyi, A. (2000b). The cadmium uptake by lettuce on contaminated soils as influenced by liming. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **31**(11-14): 243-2438.
- Lehoczky, E., Németh, T., Kiss, Z. et Szalai, T. (2002). Cadmium and lead uptake by Ryegrass, Lettuce and White Mustard plants on different soils. *Aktlau*, **51**(1-2): 201-210.
- Lock, K. et Janssen, C.R. (2001). Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: Taking soil parameters affecting bioavailability into account. *Ecotoxicology*, **10**: 315-322.
- Lock, K. et Janssen, C.R. (2002a). Multi-generation toxicity of zinc, cadmium, copper and lead to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Environmental Pollution*, **117**: 89-92.
- Lock, K. et Janssen, C.R. (2002b). Ecotoxicity of Chromium (III) to *Eisania fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **51**: 203-205.
- Lock, K. et Janssen, C.R. (2002c). Ecotoxicity of nickel to *Eisania fetida*, *Enchytraeus albidus* and *Folsomia candida*. *Chemosphere*, **46**: 197-200.
- Loi Canadienne sur la Protection de l'Environnement LCPE, Hydrocarbures aromatiques polycycliques, 1994.
- Lorenz, S.E., Hamon, R.E., Holm, P.E., Domingues, H.C., Sequeira, E.M., Christensen, T.H. et McGrath, S.P. (1997). Cadmium and zinc in plants and soil solutions from contaminated soils. *Plant and Soil*, **189**: 21-31.
- Maliszewska-Kordybach, B. (1996). Polycyclic aromatic hydrocarbons in agricultural soils in Poland: preliminary proposals for criteria to evaluate the level of soil contamination. *Applied Geochemistry*, **11**: 121-127.
- Marigomez J. A., Angulo, E. et Saez, V. (1986). Feeding and growth responses to copper, zinc, mercury and lead in the terrestrial gastropod *Arion ater* (Linné). *Journal of Molluscan Studies*, **52**: 68-78.
- Marigomez J. A., Angulo, E. et Moya, J. (1986a). Copper treatment of the digestive gland of the slug *Arion ater* L. 1. Bioassay condustion and histochemical analysis. *Bulletin of Environmental Toxicology*, **36**: 600-608.

- Marigomez J. A., Angulo, E. et Moya, J. (1986b). Copper treatment of the digestive gland of the slug *Arion ater* L. 2. Morphometrics and Histophysiology. *Bulletin of Environmental Toxicology*, **36**: 608-615.
- Marigomez, I., Soto, M. et Cajaraville, M.P. (1995). Morphofunctional patterns of cell and tissue systems involved in metal handling and metabolism, In Cell biology, Ed Cajaraville M.P., University of the Basque Country Press Service, Bilbao, 89-134.
- Marigomez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E. et Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microscopy Research and Technique*, **56**(5): 358-392.
- Markert, B., Oehlmann, J. et Roth, M. (1997). General aspects of heavy metal monitoring by plants and animals. *Environmental Biomonitoring*, **654**: 19-29.
- Martoja, M. et Martoja, R. (1984). La bioaccumulation de métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution. *Le courrier du CNRS*, **54**: 32-37.
- Martoja, R. et Martoja-Pierson, M. (1967). Initiation aux techniques de l'histologie animale, Masson et Cie Editeurs, Paris, 345p.
- Mason, A.Z. (1983). The uptake, accumulation and excretion of metals by the marine prosobranch gastropod mollusc *Littorina littorea* (L.), Thèse, University College of Wales, Gwynedd, 575p.
- McBride, M.B. (1994). Environmental Chemistry of soils. Oxford University Press. New York.
- Meador, J.P., Stein, J.E., Reichert, W.L. et Varanasi, U. (1995). Bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by marine organisms. *Review of Environmental Contamination and Toxicology*, **143**: 79-165.
- Meharg, A.A., Wright, J., Dyke, H. et Osborn, D. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dispersion and deposition to vegetation and soil following a large scale chemical fire. *Environmental Pollution*, **99**: 29-36.
- Menta, C. et Parisi, V. (2001). Metal concentrations in *Helix pomatia*, *Helix aspersa* and *Arion rufus*: a comparative study. *Environmental Pollution*, **115**: 205-208.
- Morel, J.L. (1996). Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. In Soil Ecotoxicology, J. Taradellas, G. Bitton and D. Rossel Eds, Boca Raton, FL, Lewis Publisher.
- Moser, H. et Wieser, W. (1979). Copper and nutrition in *Helix pomatia* (L.), *Oecologia*, **42**: 241-251.
- Motelay-Massei, A., Ollivon, D., Garban, B., Teil, M.J., Blanchard, M. et Chevreuil, M. (2004). Distribution and spatial trends of PAHs and PCBs in soils in the Seine river basin, France. *Chemosphere*, **55**: 555-565.

- Murray, P., Ge, Y. and Hendershot, W.H. (2000). Evaluating three trace metal contaminated sites : a field and laboratory investigation. *Environmental Pollution*. **107**, 127-135.
- Neuhauser, E.F., Loehr, R.C., Milligan, D.L. et Malecki, M.R. (1985). Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. *Biology and Fertility of Soils*, **1**: 149-152.
- NF U44-041. (1985). Matières fertilisantes - Boues des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines - Dénominations et spécifications. AFNOR, 20 pages.
- NF ISO 10 390 (1994). Qualité du sol - Détermination du pH, Paris.
- NF ISO 10 694 (1995). Qualité du sol - Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire)
- NF ISO 13 878 (1998). Qualité du sol - Détermination de la teneur totale en azote par combustion sèche ("analyse élémentaire")
- NF X 31-107 (2003). Qualité du sol - Détermination de la distribution granulométrique des particules du sol - Méthode à la pipette, Paris.
- NF X 31-120 (2003). Qualité du sol - Détermination du cuivre, du fer, du manganèse et du zinc. Extraction par l'acétate d'ammonium en présence d'EDTA, 7p.
- NF X 31-130 (1999). Qualité des sols - Méthodes chimiques - Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC) et des cations extractibles, Paris.
- NF X 31-147 (1996). Qualité des sols - Sols, sédiments: Mise en solution totale par attaque acide, Paris.
- NF X 31-255-1 (2001). Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (*Helix aspersa*), Partie 1 : Détermination des effets sur la croissance par contamination alimentaire, 27p.
- NF X 31-255-2 (2001). Qualité du sol - Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (*Helix aspersa*), Partie 2 : Détermination des effets sur la croissance par contamination par le sol, 27p.
- Nieboer, E. et Richardson, D.H.S. (1980). The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution*, **1B**: 3-26.
- OECD 220 (2004). *Enchytraeidae* reproduction test.
- Olajire, A.A., Ayodele, E.T., Oyedirdan, G.O. et Oluyemi, E.A. (2002). Levels and speciation of heavy metals in soils of industrial southern Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*, **85**: 135-155.
- Ordóñez, A., Loredó, J., De Miguel, E. et Charlesworth, S. (2003). Distribution of heavy metals in the street dusts and soils of an industrial city in Northern Spain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**: 160-170.

- Peakall, D. et Burger, J. (2003). Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**: 110-121.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., Eijsackers, H.J.P et Allen, H.E. (1997). A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **37**: 163-172.
- Peijnenburg, W., Baerselman, R., de Groot, A., Jager, T., Leenders, D., Posthuma, L. et Van Veen, R. (2000). Quantification of metal bioavailability for Lettuce (*Lactuca sativa* L.) in field soils. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **39**: 420-430.
- Peijnenburg, W.J.G.M. et Jager, T. (2003). Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **56**(1): 63-77.
- Perrono, P. (1999). *Les micropolluants métalliques des boues de stations d'épuration urbaine et l'épandage agricole*. Thèse, Université de Picardie.
- Pihan, F. (2001). Caractérisation des Mollusques Gastéropodes terrestres en tant que Bioindicateurs de la Contamination Polymétallique (Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Cu, Cd et Pb). Thèse en Sciences de la Vie, Université de Metz, 493p.
- Piotrowska, M. et Kabata-Pendias, A. (1997). Impact of soils amended with Zn and Pb smelter dust on Cd concentrations in potatoes. *Journal of Geochemical Exploration*, **58**: 319-322.
- Popham, J.D. et d'Auria, J.M. (1980). *Arion ater* (Mollusca: Pulmonata) as an indicator of terrestrial environmental pollution. *Water, Air, Soil pollution*, **14**: 115-124.
- Posthuma, L., Baerselman, R., Van Veen, R.P.M. et Dirven van Breemen, E.M. (1997). Single and joint toxic effects of copper and zinc on reproduction of *Enchytraeus crypticus* in relation to sorption of metals in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**(2): 108-121.
- Promeyrat, S. (2001). Contribution à l'étude de la pollution atmosphérique autoroutière, caractérisation des flux de déposition et de la contamination métallique de l'environnement de proximité, Thèse en Sciences de la Vie, Université de Metz, 207p.
- Rabitsch, W.B. (1996). Metal accumulation in terrestrial pulmonates at a Lead/zinc smelter site in Arnoldstein, Austria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **56**: 734-741.
- Rainbow, P.S. (2002). Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, **120**(3): 497-507.
- Rainbow, P.S. et Dallinger, R. (1993). Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. In *Ecotoxicology of metals in invertebrates*, Eds Dallinger R. and Rainbow P.S., 119-131.

- Rainbow, P.S. et Phillips, D.J.H. (1993). Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Marine Pollution Bulletin*, **26**(11): 593-601.
- Ramade, F. (1992). Précis d'Ecotoxicologie, Ed Masson.
- Reynolds, E.S. (1963). The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, **17**: 208-212.
- Richards, B.K., Steenhuis, T.S., Peverly, J.H. et McBride, M.B. (2000). Effect of sludge-processing mode, soil texture and soil pH on metal mobility in undisturbed soil columns under accelerated loading. *Environmental Pollution*, **109**: 327-346.
- Römkens, P. et Salomon, W. (1998). Cd, Cu and Zn solubility in arable and forest soils: consequences of land use changes for metal mobility and risk assessment. *Soil Science*, **163**: 859-871.
- Rous, V. (1993). Contribution à l'étude de la flore bactérienne associée à une ponte anormale chez *Helix aspersa* : les pontes transparentes. Thèse de Doctorat Vétérinaire, Lyon, 113p.
- Russel, L.K., de Haven, J.I. et Botts, R.P. (1981). Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **26**: 634-640.
- Russell-Hunter, W.D. (1983). Overview: Planetary distribution and ecological constraints upon the Mollusca. In *The Mollusca Vol 6: Ecology*, Ed W.D. Russell-Hunter, Academic Press, London, 1-27.
- Saltiène, Z., Brukstiène, D. et Ruzgys, A. (2002). Contamination of soil by polycyclic aromatic hydrocarbons in some urban areas. *Polycyclic Aromatic Compounds*, **22**(1): 23-35.
- Samsøe-Petersen, L., Larsen, E., Larsen, P. et Bruun, P. (2002). Uptake of trace elements and PAHs by fruit and vegetables from contaminated soils. *Environmental Science and Technology*, **36**: 3057-3063.
- Scharenberg, W. et Ebeling, E. (1996). Distribution of heavy metals in a woodland food web. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **56**(5): 389-396.
- Scheifler, R. (2002). Evaluation de la biodisponibilité et des transferts de polluants métalliques dans des réseaux trophiques "sols-plantes-invertébrés", Thèse en Sciences de la Vie, Université de Franche-Comté, 187p.
- Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A. et Badot, P.M. (2002). Transfer of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: Bioaccumulation and effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **53**(1): 148-153.
- Scheifler, R., Gomot- de Vaufleury, A., Toussaint, M.L. et Badot, P.M. (2002a). Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere*, **48**(6): 571-579.

- Scheifler, R., Brahim, M.B., Gomot-de Vaufleury, A., Carnus, J.-M. et Badot, P.-M. (2003). A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails. *Environmental Pollution*, **122**(3): 343-350.
- Schwartz, C. (1997). Phytoextraction des métaux des sols pollués par la plante hyperaccumulatrice *Thlaspi caerulescens*. Thèse en Sciences Agronomiques, INPL.
- Senesi, G.S., Baldassarre, G., Senesi, N. et Radina, B. (1999). Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implications for human health. *Chemosphere*, **39**(2): 343-377.
- Shariff, M., Jayawardena, P.A.H.L., Yusoff, F.M. et Subasinghe, R. (2001). Immunological parameters of Javanese carp *Puntius gonionotus* (Bleeker) exposed to copper and challenged with *Aeromonas hydrophila*. *Fish and Shellfish Immunology*, **11**(4): 281-291.
- Siegel, S. (1956). The case of two Independent samples in nonparametric statistics, International Student Edition. McGraw-Hill, Auckland.
- Sijm, D.T.H.M., Seinen, W. et Opperhulzen, A. (1992). Life-cycle biomagnification study in fish. *Environmental Science and Technology*, **26**(11): 2162-2174.
- Sijm, D.T.H.M. et Opperhuizen. A. (1989). Biotransformation of organic chemicals by fish: enzyme activities and reactions. In Handbook of Environmental Chemistry Reactions and Processes, Vol2E, Springer, Berlin, 163-235 (Hutzinger, O.)
- Simkiss, K. et Watkins, B. (1990). The influence of gut microorganisms on zinc uptake in *Helix aspersa*. *Environmental Pollution*, **66**(3): 263-271.
- Sims, R. C. et Overcash, M. R. (1983). Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Research Review*, **88**: 1-67.
- Singh, S.P., Tack, F.M.G., Gabriels, D. et Verloo, M.G. (2000). Heavy metal transport from dredged sediment derived surface soils in a laboratory rainfall simulation experiment. *Water, air and soil pollution*, **118**: 73-86.
- Sminia, T. (1972). Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. *Z. Zellforsch*, **130**: 497-526.
- Song, J., Zhao, F.-J., Luo, Y.-M., McGrath, P. et Zhang, H. (2004). Copper uptake by *Elsholtzia splendens* and *Silen vulgaris* and assessment of copper phytoavailability in contaminated soils. *Environmental Pollution*, **128**: 307-315.
- Speir, T.W., Van Schaik, A.P., Percival, H.J., Close, M.E. et Pang, L. (2003). Heavy metals in soil, plants and groundwater following high-rate sewage sludge application to land. *Water, air and soil pollution*, **150**: 319-358.
- Storelli, M.M. et Marcotrigiano, G.O. (2001). Heavy metals (Hg, Pb, Cd and Cr) in edible snails. *Italian Journal of Food Science*, **13**(4): 399-404.

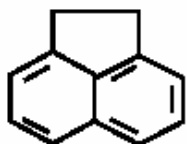
- Stuart, J.A., Ooi, E.L. et Ballantyne, J.S. (1998). Maximal activities of enzymes of intermediary metabolism in the estivating snail *Cepaea nemoralis*. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology*, **120**(2): 417-423.
- Suresh, K. et Mohandas, A. (1990). Effect of sublethal concentrations of copper on hemocyte number in bivalves. *Journal of Invertebrate Pathology*, **55**: 325-331.
- Swaileh, K.M. et Ezzughayyar, A. (2000). Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the land snail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **47**(3): 253-260.
- Swaileh, K.M., Rabay'a, N., Salim, R., Ezzughayyar, A. et Rabbo, A.A. (2001a). Concentrations of heavy metals in roadside soils, plants, and landsnails from the West Bank, Palestine. *Journal of Environmental Science and Health Part a- Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, **36**(5): 765-778.
- Swaileh, K.M. et Ezzughayyar, A. (2001b). Dose-dependant effects of dietary Pb and Zn on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **50**: 9-14.
- Swaileh, K.M., Rabay'a, N., Salim, A., Ezzughayyar, A. et Rabbo, A. (2001c). Levels of trace metals and effect of body size on metal content of the landsnail *Levantina hierosylima* from the west bank, Palestine. *Journal of environmental science and health, part A: toxic/hazardous substances and environmental engineering*.
- Swaileh, K., Hussein, R. et Halaweh, N. (2002). Metal accumulation from contaminated food and its effect on growth of juvenile landsnails *Helix engaddensis*. *Journal of environmental science and health, part B*. **37**(2): 151-159.
- Tack, F.M. et Verloo, M.G. (1996). Metal contents in tinging nettle (*Urtica dioica* L.) as affected by soil characteristics. *The Science of the Total Environment*, **192**: 31-39.
- Tack, F.M.G., Singh, S.P. et Verloo, M.G. (1999). Leaching behaviour of Cd, Cu, Pb and Zn in surface soils derived from dredged sediments. *Environmental Pollution*, **106**: 107-114.
- Tao, S., Cui, Y.H., Xu, F.L., Li, B.G., Cao, J., Liu, W.X., Schmitt, G., Wang, X.J., Shen, W.R., Qing, B.P. et Sun, R. (2004). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin. *The Science of the Total Environment*, **320**: 11-24.
- Terrés, C., Navarro, M., Martin-Lagos, F., Giménez, R., Olalla, M., Lopez, H. et Lopez, M.C. (2002). Influence of pH and industrial activity on total zinc concentrations in agricultural soils, sewage sludges and beach sands: Relationship with plant (*Saccharum officinarum*) availability. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **64**: 224-229.
- Thuy, H.T.T., Tobschall, H.J. et An, P.V. (2000). Distribution of heavy metals in urban soils – a case study of Danang-Hoian Area (Vietnam). *Environmental Geology*, **39**(6): 603-610.

- Tompa, A.S.a et Wilbur, K.M. (1997). Calcium mobilisation during reproduction in snail *Helix aspersa*, *Nature*, **270**: 53-54.
- Tracey, G.A. et Hansen, D.J. (1996). Use of biota-sediment accumulation factors to assess similarity of nonionic organic chemical exposure to benthically-coupled organisms of differing trophic mode. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **30**: 467-475.
- van der Oost, R., Beyer, J. et Vermuelen, N.P.E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13**: 57-149
- van Straalen, N.M. (1994). Biodiversity of Ecotoxicological Responses in Animals. *Netherlands Journal of Zoology*, **44**(1-2): 112-129.
- van Straalen, N.M., Butovsky, R.O., Pokarzhevskii, A.D., Zaitsev, A.S. et Verhoef, S.C. (2001). Metal concentrations in soil and invertebrates in the vicinity of a metallurgical factory near Tula (Russia). *Pedobiologia*, **45**(5): 451-466.
- Venditti, D., Durécu, S. et Berthelin, J. (2000). A multidisciplinary approach to assess history, environmental risks, activities. Part A : chemical and physical properties of metals and leaching ability. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **38**: 411-420.
- Viard, B., Pihan, F., Promeyrat, S. et Pihan, J.-C. (2004a). Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: bioaccumulation in soil, Graminaceae and land snails. *Chemosphere*, 1349-1359.
- Viard, B., Maul, A. et Pihan, J.-C. (2004). Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination. *Journal of Environmental Monitoring*, **6**: 103-107.
- VROM Ministry (1997). National Environmental Plan-3, The Hague.
- Watabe, N., Meennakshi, V.R., Blackwelder, P.L., Dunkulberger, D.G. et Kurt, E.M. (1976). Calcareous spherules in molluscs with special reference to *Pomacea paludosa*, In The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants, Ed Watabe N. and Wilbur K., University of South Carolina Press, Columbia, 283-308.
- Wetterhahn, K.E. et Hamilton, J.W. (1989). Molecular basis of hexavalent chromium carcinogenicity: effect on gene expression. *Science of the Total Environment*, **86**: 113-129.
- White, J.C., Kelsey, J.W., Hatzinger, P.B. et Alexander, M. (1997). Factors affecting sequestration and bioavailability of phenanthrene in soils. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**: 2040-2045.
- Wild, S. R., Berrow, M. L. et Jones, K. C. (1991). The persistence of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge-amended agricultural soils. *Environmental Pollution*, **72**: 141-57.

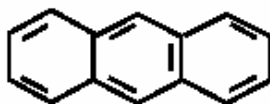
- Wild, S.R. et Jones, K.C. (1995). Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source and inventoring budget. *Environmental Pollution*, **88**: 91-108.
- Williamson, P. (1980). Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepaea hortensis* Müller. *Oecologia*, **44**: 213.
- Winder, L., Merrington, G. et Green, I. (1999). The tri-trophic transfer of Zn from the agricultural use of sewage sludge. *The Science of the Total Environment*, **229**: 73-81.
- Yang, S.Y.N., Connel, D.W., Hawker, D.W. et Kayal, S.I. (1991). Polycyclic aromatic hydrocarbons in air, soil and vegetation in the vicinity of an urban roadway. *The Science of the Total Environment*, **102**: 229-240.
- Yin, Y., Impellitteri, A., You, S.J. et Allen, H.E. (2002). The importance of organic matter distribution and extract soil: solution ratio on the desorption of heavy metals from soils. *The Science of the Total Environment*, 107-119.

ANNEXES

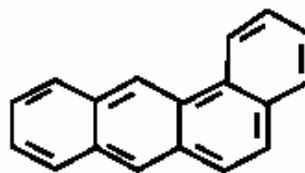
ANNEXE 1 :
Formules des principaux HAPs



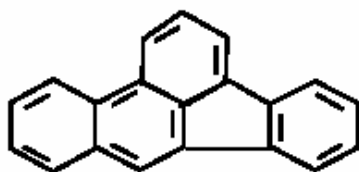
acénaphthène



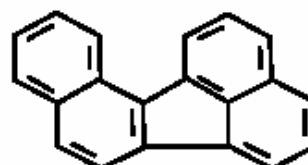
anthracène



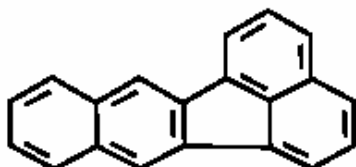
benz[a]anthracène



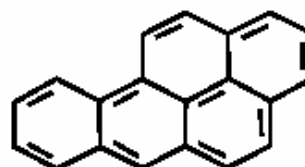
benzo[b]fluoranthène



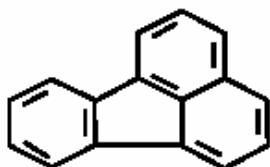
benzo[j]fluoranthène



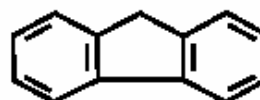
benzo[k]fluoranthène



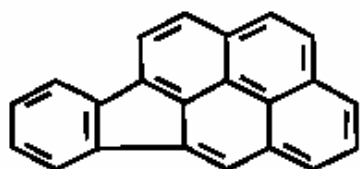
benzo[a]pyrène



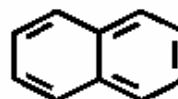
fluoranthène



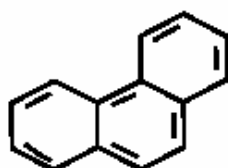
fluorène



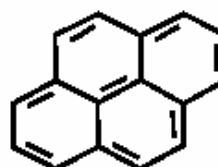
indéno[1,2,3-cd]pyrène



naphtalène



phénanthrène



pyrène

ANNEXE 2 : Classification des métaux selon Nieboer et Richardson (1980)

Classification des métaux abordés lors de nos travaux, selon Nieboer et Richardson, en classe A, B et intermédiaire, selon un degré croissant d'ionisation

Classe A	K ⁺ , Na ⁺ , Li ⁺ Ca ²⁺ , Mg ²⁺ Al ³⁺
Classe intermédiaire	Cd ²⁺ , Pb ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ²⁺ Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Ni ²⁺ Cr ³⁺ , Fe ³⁺
Classe B	Cu ⁺ Pb ²⁺

Métaux de classe A : liaison préférentielle avec les atomes O > N > S

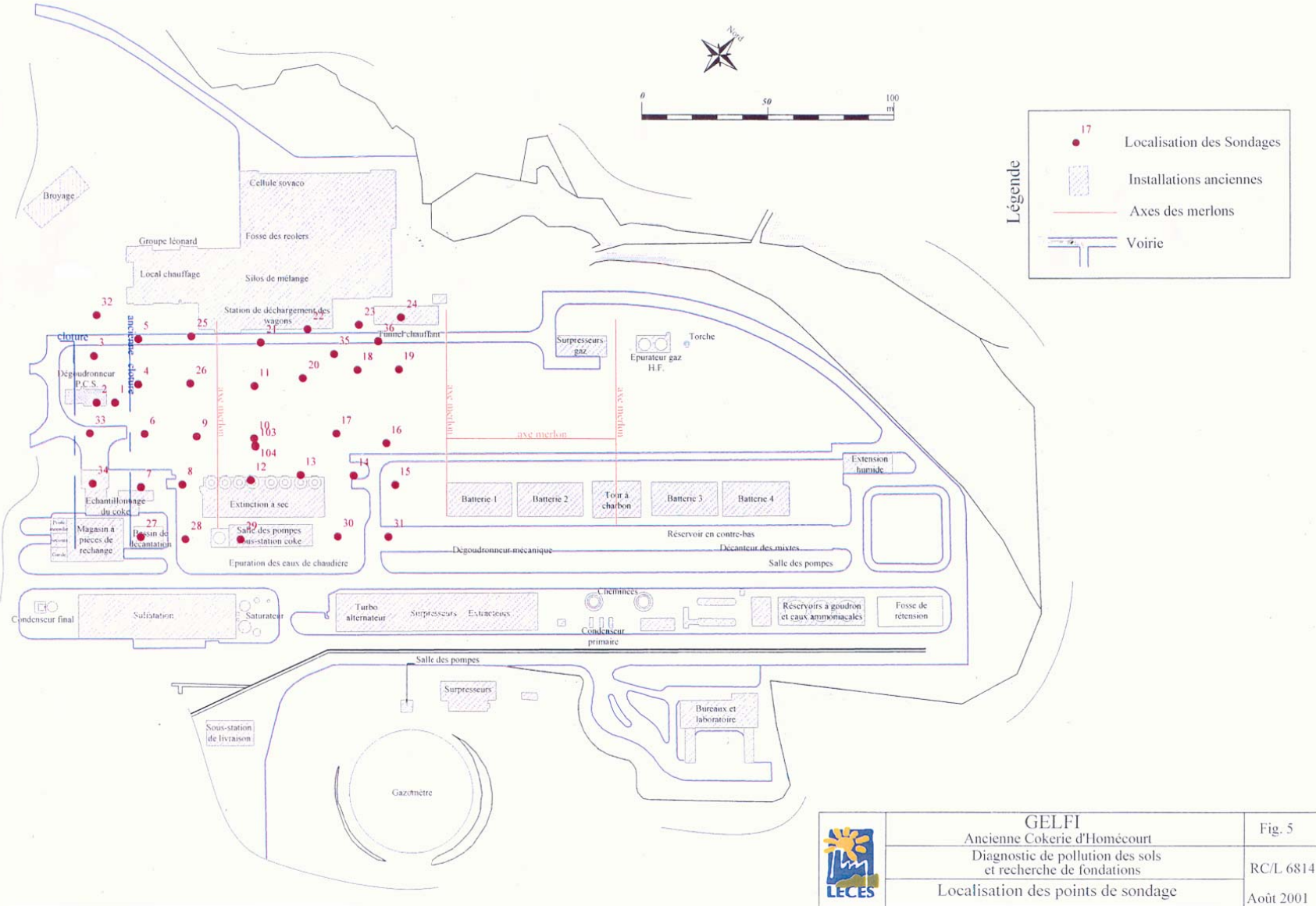
Métaux de classe B : liaison avec les atomes de préférence S > N > O

Métaux intermédiaires : métaux essentiels à la vie tels que Ni²⁺, Fe²⁺ ou Zn²⁺

ANNEXE 2' : Composition Farine Helixal®

Aliment	g/100g					Vitamines U.I/kg			Métaux mg/kg					
	Protéines	Matières grasses brutes	Cellulose brute	Cendres brutes	Ca	A	D3	E	Cu	Zn	Cd	Pb	Cr	Ni
1 ^{er} âge	13.4	4.3	2.5	34.6	12.1	15000	2000	20	13	65	0.09	1.27	6.2	0.12
2 ^e âge	15.7	7.38	1.8	31	10.3	20500	3900	39	30	137	0.16	0.94	9.3	0.12

**ANNEXE 3 :
Plan du site de l'ancienne cokerie d'Homécourt et localisation des différents points de prélèvements des échantillons de sol par le LECES**



	GELFI	Fig. 5
	Ancienne Cokerie d'Homécourt	RC/L 6814
	Diagnostic de pollution des sols et recherche de fondations	Août 2001
Localisation des points de sondage		

GELFI

Ancienne cokerie d'Homécourt
Diagnostic de pollution des sols

Elément analysé	Unité	S1		S2		S3		S4		S5		VDSS du guide mg/kg
		01 S 966	01 S 909	01 S 911	01 S 912	01 S 914	01 S 915	01 S 917	01 S 918	01 S 920	01 S 921	
Cadmium	mg/kg	0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	6
Chrome	mg/kg	48	120	90	140	18	120	60	140	41	34	65
Cuivre	mg/kg	12	7	31	1,5	12	35	35	13	20	14	113
Nickel	mg/kg	36	65	50	80	7	34	32	60	21	20	122
Plomb	mg/kg	170	210	280	160	19	50	130	280	65	95	305
Zinc	mg/kg	750	1000	1100	1100	95	150	420	1000	220	380	4500
Arsenic	mg/kg	55	130	110	150	6	60	70	120	33	44	19
Mercure	mg/kg	1	0,4	1	0,2	0,6	0,3	1,6	1,4	0,4	0,1	3,5
HCt	mg/kg	50	< 50	50	< 50	75	70	70	< 50	65	110	2500
CNt	mg/kg	37	65	320	45	25	4	4	7	6	5	10
HAP (10)	mg/kg	42,84	22,23	273,25	10,89	96,74	17,59	107,41	87,58	28,41	22,03	20
HAP (16)	mg/kg	66,7	32,17	387,53	16,06	140,05	24,34	157,44	138,58	43,62	29,38	pas de valeur

Teneurs dépassant la VDSS

Echantillons (0-0,50 m)

Echantillons (0,50-1,50 m)

Elément analysé	Unité	S6		S7		S8		S10	S11		S12		VDSS du guide mg/kg
		01 S 923	01 S 924	01 S 926	01 S 927	01 S 929	01 S 930	01 S 932	01 S 933	01 S 934	01 S 936	01 S 937	
Cadmium	mg/kg	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	0,1	< 0,1	0,2	0,1	<0,1	6
Chrome	mg/kg	47	22	24	23	28	35	13	16	23	24	27	65
Cuivre	mg/kg	26	26	17	12	100	6	20	17	47	25	9	113
Nickel	mg/kg	23	16	25	17	38	17	7	12	10	17	21	122
Plomb	mg/kg	41	44	34	26	140	23	31	22	1100	49	17	305
Zinc	mg/kg	110	90	90	80	600	95	100	46	220	110	60	4500
Arsenic	mg/kg	27	24	27	34	36	< 64	8	17	10	19	36	19
Mercure	mg/kg	0,7	0,4	1	0,3	15,5	< 0,1	0,9	0,3	0,2	7	<0,1	3,5
HCt	mg/kg	70	75	60	240	180	< 50	90	55	100	540	90	2500
CNt	mg/kg	8	4	3	2	9	< 1	8	1	< 1	1	<1	10
HAP (10)	mg/kg	23,84	38,9	25,08	10,05	3,58	0,11	17,4	69,57	33,56	24,31	0,04	20
HAP (16)	mg/kg	36,05	56,19	31,02	13,39	4,13	0,2	24,64	91,46	47,27	36,07	0,06	pas de valeur

LECES

ANNEXE 4 : Concentrations éléments métalliques et en HAPs dans le sol d'Homécourt, au niveau des prélèvements réalisés par le LECES

GELFI

Ancienne cokerie d'Homécourt
Diagnostic de pollution des sols

Elément analysé	Unité	S13		S14		S15		S16		S17	S18		VDSS du guide mg/kg
		01 S 939	01 S 940	01 S 942	01 S 943	01 S 945	01 S 946	01 S 948	01 S 949	01 S 951	01 S 952	01 S 953	
Cadmium	mg/kg	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,3	< 0,1	<0,1	0,1	6
Chrome	mg/kg	37	60	30	25	80	60	28	15	16	15	19	65
Cuivre	mg/kg	37	11	48	10	95	13	34	96	15	27	60	113
Nickel	mg/kg	27	35	29	19	45	37	25	17	10	60	14	122
Plomb	mg/kg	75	30	140	15	80	31	130	140	50	55	65	305
Zinc	mg/kg	130	120	410	48	270	120	500	960	130	120	140	4500
Arsenic	mg/kg	24	80	< 37	27	70	75	34	< 13	6	<10	18	19
Mercure	mg/kg	10	< 0,1	2,5	< 0,1	1,2	< 0,1	4,3	3,8	0,4	0,8	1	3,5
HCT	mg/kg	130	< 50	160	< 50	2600	< 50	140	95	< 50	110	220	2500
CNT	mg/kg	35	2	8	< 1	8	< 1	26	23	5	5	12	10
HAP (10)	mg/kg	30,67	0,24	6,12	0,05	17,1	0,2	354,35	174,58	19,02	6,62	27,99	20
HAP (16)	mg/kg	51,32	0,39	8,06	0,09	22,61	0,31	521,2	259,3	27,43	9,04	38,37	pas de valeur

Teneurs dépassant la VDSS

Echantillons (0-0,50 m)

Echantillons (0,50-1,50 m)

Elément analysé	Unité	S19		S20		S21	S22		S23		S24		VDSS du guide mg/kg
		01 S 954	01 S 955	01 S 957	01 S 958	01 S 960	01 S 963	01 S 964	01 S 967	01 S 968	01 S 970	01 S 971	
Cadmium	mg/kg	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,5	< 0,1	< 0,1	0,2	< 0,1	0,2	<0,1	6
Chrome	mg/kg	24	16	12	8	30	22	11	37	290	37	65	65
Cuivre	mg/kg	55	70	22	33	38	11	6	24	49	50	7	113
Nickel	mg/kg	16	11	11	8	6	10	2,5	13	42	24	19	122
Plomb	mg/kg	100	75	41	40	140	46	12	150	200	360	86	305
Zinc	mg/kg	310	130	75	95	80	140	13	160	440	1100	440	4500
Arsenic	mg/kg	55	16	15	10	16	20	< 5	19	46	28	42	19
Mercure	mg/kg	1,1	0,6	1,2	0,2	0,4	1,7	< 0,1	0,3	0,2	1,5	0,1	3,5
HCT	mg/kg	150	210	120	140	< 50	180	< 50	< 50	65	120	<50	2500
CNT	mg/kg	9	31	11	9	1	15	< 1	2	< 1	31	2	10
HAP (10)	mg/kg	10,78	63,43	10,73	8,29	17,61	38,1	141,82	72,38	51,35	42,16	41,27	20
HAP (16)	mg/kg	16,25	87,01	15,94	10,92	26,85	58,27	207,48	123,95	85,51	62,68	59,81	pas de valeur

LECES

GELFI

Ancienne cokerie d'Homécourt
Diagnostic de pollution des sols

Elément analysé	Unité	S25		S26		S27		S28		S29		S30		VDSS du guide mg/kg
		01 S 973	01 S 974	01 S 976	01 S 977	01 S 979	01 S 980	01 S 982	01 S 983	01 S 984	01 S 985	01 S 986	01 S 987	
Cadmium	mg/kg	< 0,1	< 0,1	2,5	1	< 0,1	0,1	0,4	2	2	0,5	<0,1	<0,1	6
Chrome	mg/kg	38	55	45	25	60	37	50	23	25	18	43	24	65
Cuivre	mg/kg	17	26	130	23	34	18	39	50	10	6	55	9	113
Nickel	mg/kg	14	36	33	14	35	34	41	14	9	4,5	40	23	122
Plomb	mg/kg	85	310	120	80	70	37	290	110	35	17	30	17	305
Zinc	mg/kg	200	280	240	130	150	140	130	620	100	85	110	55	4500
Arsenic	mg/kg	14	50	65	25	16	40	21	< 5	35	20	94	25	19
Mercure	mg/kg	4,5	0,5	0,4	1,8	12,3	1,3	27	10	2,4	34	1,7	0,9	3,5
HCT	mg/kg	68	60	200	180	170	100	250	210	440	110	<50	<50	2500
CNT	mg/kg	15	6	3	1	35	10	60	2	1050	1300	20	17	10
HAP (10)	mg/kg	36,94	9,28	243,6	18,74	72,13	35,19	96,89	43,66	540,52	197,02	27,08	0,04	20
HAP (16)	mg/kg	53,71	13,44	398,5	29,16	103,25	45,81	152,48	55,12	807,24	280,76	38,85	0,06	pas de valeur

Teneurs dépassant la VDSS

Echantillons (0-0,50 m)

Echantillons (0,50-1,50 m)

Elément analysé	Unité	S31		S32		S33	S34		S35		S36		VDSS du guide mg/kg
		01 S 988	01 S 989	01 S 991	01 S 992	01 S 994	01 S 995	01 S 996	01 S 998	01 S 999	01 S 1001	01 S 1002	
Cadmium	mg/kg	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	0,1	<1	6
Chrome	mg/kg	37	16	55	43	38	55	65	19	22	27	100	65
Cuivre	mg/kg	14	6	30	6	8	12	41	23	9	20	90	113
Nickel	mg/kg	18	14	39	23	4,5	28	55	4	7	11	50	122
Plomb	mg/kg	60	13	60	18	2,5	24	120	45	41	120	480	305
Zinc	mg/kg	130	39	140	80	20	130	110	75	55	220	1300	4500
Arsenic	mg/kg	27	27	70	60	12	55	35	19	11	19	80	19
Mercure	mg/kg	2,2	< 0,1	1,7	0,9	0,2	0,3	1	11,5	0,4	1,1	0,3	3,5
HCT	mg/kg	130	< 50	240	50	< 50	< 50	320	< 820	< 50	150	150	2500
CNT	mg/kg	12	1	7	1	< 1	< 1	3	3350	47	26	12	10
HAP (10)	mg/kg	31,07	0,4	98,83	1,9	28,3	3,1	35,91	47,1	819,42	97,25	38,73	20
HAP (16)	mg/kg	42,16	0,5	131,99	2,8	37,98	3,93	54,42	54,42	1009,98	130,84	51,57	pas de valeur

LECES

GELFI

Echantillon unités	Ancienne Cokerie d'Homécourt Diagnostic de pollution des sols																S9	
	S1		S2		S3		S4		S5		S6		S7		S8		mg/kg	mg/kg
	01 S 966 mg/kg	01 S 909 mg/kg	01 S 911 mg/kg	01 S 912 mg/kg	01 S 914 mg/kg	01 S 915 mg/kg	01 S 917 mg/kg	01 S 918 mg/kg	01 S 920 mg/kg	01 S 921 mg/kg	01 S 923 mg/kg	01 S 924 mg/kg	01 S 926 mg/kg	01 S 927 mg/kg	01 S 929 mg/kg	01 S 930 mg/kg		
Naphtalène	< 1,66	< 0,57	3,75	0,17	2,75	0,88	2,88	1,36	1,85	1,06	1,40	1,80	2,40	0,89	2,41	0,014		
Acénaphthène	< 1,72	0,58	0,58	< 0,15	0,75	0,31	1,57	1,03	1,03	0,85	0,85	0,97	0,97	0,17	0,17	< 0,050		
Fluorène	< 0,39	0,13	1,78	0,04	0,27	0,07	1,39	0,60	0,24	0,19	0,21	0,20	0,46	0,09	0,04	< 0,001		
Phénanthrène	3,31	0,84	28,90	0,44	5,44	1,38	13,40	8,44	3,31	3,12	3,17	4,40	10,00	2,23	0,58	0,043		
Anthracène	0,74	0,29	11,90	0,28	1,24	0,36	14,30	2,74	0,67	0,31	0,87	1,23	0,72	0,29	0,04	0,001		
Fluoranthène	7,34	3,42	73,60	3,14	14,00	2,08	21,80	21,70	4,98	1,00	5,52	9,22	7,24	3,19	0,31	0,014		
Pyrène	8,53	4,43	71,10	3,00	20,10	2,76	24,30	23,70	5,48	2,12	4,64	6,21	2,65	1,58	0,10	0,012		
Benzo(a)anthracène	6,46	3,55	36,70	1,56	13,50	2,48	13,70	12,70	3,29	1,92	2,66	5,47	1,60	1,04	0,05	0,005		
Chrysène	5,22	2,88	26,10	1,08	10,30	1,90	10,20	8,53	2,67	2,51	2,74	3,86	1,32	0,79	0,04	0,007		
Benzo(b)fluoranthène	4,21	2,78	21,10	1,00	9,98	1,85	7,56	7,50	2,93	2,23	3,49	0,71	0,54	< 0,03	0,008			
Benzo(k)fluoranthène	2,93	1,74	14,10	0,66	7,21	1,26	5,43	5,25	1,88	0,89	1,49	2,31	0,46	0,37	< 0,04	0,004		
Benzo(a)pyrène	5,46	2,98	29,90	1,31	13,30	2,48	9,75	9,95	2,98	3,10	2,40	4,12	0,69	0,49	< 0,04	0,007		
Benzo(e)pyrène	8,31	1,65	16,10	0,83	9,80	1,48	14,00	16,90	5,09	1,59	4,01	5,95	< 0,99	0,91	< 0,18	0,017		
Dibenzo(a,h)anthracène	0,70	0,37	3,62	0,15	2,41	0,28	1,21	1,27	0,44	0,27	0,27	0,47	< 0,16	0,05	< 0,03	0,001		
Benzo(g,h,i)pérylène	4,66	2,52	17,10	0,92	10,20	1,60	5,55	6,01	2,43	4,95	1,33	2,12	0,27	0,28	< 0,03	0,006		
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	5,06	3,44	31,20	1,33	18,80	3,17	10,40	10,90	4,35	3,17	2,26	4,37	0,38	0,48	< 0,04	0,011		
Somme des 10	42,84	22,23	273,25	10,89	96,74	17,59	107,41	87,58	28,41	22,03	23,84	38,90	25,08	10,05	3,58	0,11		
Somme des 16	66,70	32,17	387,53	16,06	140,05	24,34	157,44	138,58	43,62	29,38	36,05	56,19	31,02	13,39	4,13	0,20		

Echantillons de surface(0-0.50 m)

Echantillons de profondeur (0,50-1,50m)

Pas de prélèvement d'échantillon

HAP(10)

Echantillon unités	S10		S11		S12		S13		S14		S15		S16		S17		S18	
	01 S 932 mg/kg	mg/kg	01 S 933 mg/kg	01 S 934 mg/kg	01 S 936 mg/kg	01 S 937 mg/kg	01 S 939 mg/kg	01 S 940 mg/kg	01 S 942 mg/kg	01 S 943 mg/kg	01 S 945 mg/kg	01 S 946 mg/kg	01 S 948 mg/kg	01 S 949 mg/kg	01 S 951 mg/kg	mg/kg	01 S 952 mg/kg	01 S 953 mg/kg
Naphtalène	0,81		25,60	2,84	2,10	< 0,007	1,92	< 0,006	2,09	< 0,004	3,44	< 0,006	8,85	7,41	< 1,50		1,26	5,26
Acénaphthène	< 0,52		0,92	0,92	0,54	< 0,007	0,57	< 0,006	0,45	< 0,004	0,58	< 0,010	1,83	1,83	< 1,55		0,31	1,39
Fluorène	< 0,12		0,29	0,26	0,13	< 0,002	9,81	< 0,001	0,10	0,001	0,20	< 0,001	5,23	1,40	< 0,36		0,10	0,32
Phénanthrène	2,14		5,95	5,10	3,05	0,007	8,37	0,083	1,50	0,017	3,56	0,073	66,50	24,90	5,06		1,78	5,48
Anthracène	0,73		1,39	1,15	0,72	0,001	1,05	0,005	0,15	0,001	0,57	0,003	18,50	6,71	0,86		0,21	0,76
Fluoranthène	4,72		8,03	5,34	5,67	0,008	9,81	0,057	1,19	0,014	2,83	0,046	95,60	43,10	5,42		1,73	4,78
Pyrène	2,68		4,49	3,91	5,87	0,007	7,25	0,030	0,66	0,009	2,42	0,037	94,90	45,60	4,97		1,31	4,73
Benzo(a)anthracène	2,66		7,25	5,28	3,18	0,002	3,34	0,009	0,36	0,002	1,79	0,009	42,30	22,00	1,07		0,52	3,26
Chrysène	2,03		5,58	4,63	2,47	0,002	2,42	0,019	0,37	0,003	1,58	0,014	31,00	16,00	1,72		0,45	3,02
Benzo(b)fluoranthène	1,58		4,47	3,01	2,05	0,003	1,59	0,016	0,19	0,002	1,15	0,018	22,10	12,80	0,93		0,30	1,94
Benzo(k)fluoranthène	0,98		3,01	1,95	1,41	< 0,002	1,03	0,006	0,10	0,002	0,74	0,008	16,20	9,06	0,65		0,16	1,17
Benzo(a)pyrène	1,43		5,36	2,98	1,98	0,003	0,81	0,007	< 0,11	0,003	1,00	0,013	31,00	17,10	1,07		0,21	1,63
Benzo(e)pyrène	2,18		11,00	5,35	2,95	0,003	1,30	0,091	< 0,46	0,022	1,04	0,036	39,20	21,00	< 0,34		0,35	1,76
Dibenzo(a,h)anthracène	0,16		0,72	0,26	0,22	< 0,001	0,13	0,003	< 0,08	0,001	0,12	0,002	3,59	2,09	< 0,26		0,05	0,24
Benzo(g,h,i)pérylène	0,59		2,40	1,95	1,66	0,003	1,09	0,019	0,16	0,002	1,15	0,011	20,50	12,50	0,81		0,17	1,36
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	1,31		5,00	2,34	2,07	0,004	0,83	0,032	< 0,09	0,003	0,44	0,020	23,90	15,80	0,86		0,13	1,27
Somme des 10	17,40		69,57	33,56	24,31	0,04	30,67	0,24	6,12	0,05	17,10	0,20	354,35	174,58	19,02		6,62	27,99
Somme des 16	24,64		91,46	47,27	36,07	0,06	51,32	0,39	8,06	0,09	22,61	0,31	521,20	259,30	27,43		9,04	38,37

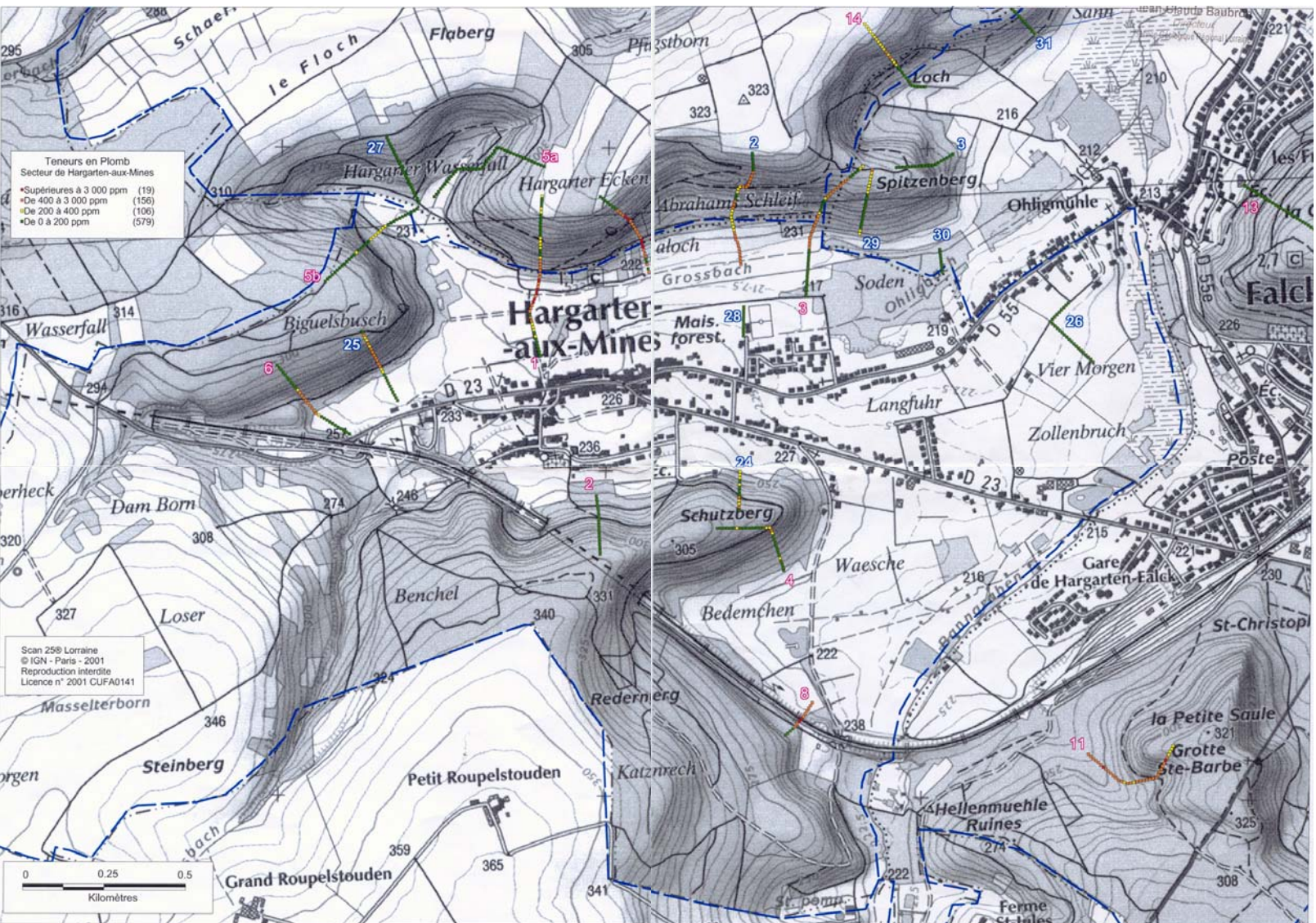
LECES

Echantillon unités	S19		S20		S21		S22		S 23		S24		S25		S26		S27	
	01 S 954 mg/kg	01 S 955 mg/kg	01 S 957 mg/kg	01 S 958 mg/kg	01 S 960 mg/kg	01 S 963 mg/kg	01 S 964 mg/kg	01 S 967 mg/kg	01 S 968 mg/kg	01 S 970 mg/kg	01 S 971 mg/kg	01 S 973 mg/kg	01 S 974 mg/kg	01 S 976 mg/kg	01 S 977 mg/kg	01 S 979 mg/kg	01 S 980 mg/kg	
Naphtalène	< 1,34	4,30	< 0,95	2,27	2,06	2,81	7,48	< 1,66	< 2,00	4,64	3,23	3,36	1,57	5,57	1,33	8,65	6,09	
Acénaphthène	< 1,39	< 0,98	< 0,98	< 0,42	< 2,08	< 1,58	< 1,58	< 1,72	< 2,06	< 2,06	< 1,38	< 1,38	< 0,25	< 1,27	< 0,44	< 2,19	< 1,87	
Fluorène	< 0,32	1,51	0,27	0,11	< 0,48	< 0,36	11,00	< 0,39	< 0,47	< 0,32	< 0,32	< 0,58	< 2,30	< 0,10	< 0,73	< 2,71		
Phénanthrène	1,78	19,30	2,54	2,27	2,37	4,14	43,40	2,89	1,98	6,89	4,09	4,09	1,60	22,10	1,78	12,20	15,50	
Anthracène	0,42	3,87	0,42	0,25	0,90	0,76	16,90	1,69	1,01	1,52	0,84	1,44	0,25	4,13	0,28	1,82	2,03	
Fluoranthène	2,20	15,40	2,21	1,12	3,51	7,43	25,40	15,30	8,47	8,48	7,07	7,08	1,26	37,40	3,06	14,30	2,86	
Pyrène	1,31	14,00	2,09	1,00	3,68	8,86	24,90	19,20	10,70	7,56	6,74	6,81	1,23	45,10	3,17	12,00	2,48	
Benzo(a)anthracène	1,39	7,09	1,27	0,72	1,89	5,22	14,60	14,10	8,98	5,33	6,05	4,55	1,14	40,10	2,64	7,87	2,23	
Chrysène	1,22	5,21	1,01	0,65	2,07	4,11	11,50	10,30	6,81	4,37	4,64	3,67	1,00	32,30	2,07	6,00	1,81	
Benzo(b)fluoranthène	0,78	3,09	0,69	0,46	1,30	3,47	5,96	6,80	5,03	3,25	3,54	3,09	0,84	21,90	1,90	5,12	1,31	
Benzo(k)fluoranthène	0,44	2,10	0,44	0,22	0,77	2,59	4,36	5,07	3,78	2,15	2,56	2,28	0,53	17,40	1,31	3,72	0,81	
Benzo(a)pyrène	0,75	2,76	0,77	0,32	1,89	3,88	7,68	8,98	7,12	3,49	4,55	3,61	0,69	33,00	2,27	5,76	1,48	
Benzo(c)pyrène	< 1,43	3,79	< 1,01	0,57	1,34	5,42	20,50	22,30	15,00	6,81	6,05	4,72	1,19	78,60	4,55	10,40	< 1,93	
Dibenzo(a,h)anthracène	< 0,24	0,21	< 0,17	< 0,07	< 0,36	0,48	1,72	1,16	0,90	0,37	0,51	0,45	0,07	5,73	0,26	0,68	< 0,32	
Benzo(g,h,i)peryène	0,63	1,46	0,52	0,29	0,98	2,51	3,50	6,46	5,71	2,72	4,22	3,13	0,46	21,60	1,41	5,04	1,54	
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	0,61	1,94	0,60	0,18	1,17	4,65	7,00	5,93	5,49	2,57	4,02	3,73	0,78	30,00	2,59	6,77	0,84	
Somme des 10	10,78	63,43	10,73	8,29	17,61	38,10	141,82	72,38	51,35	42,16	41,27	36,94	9,28	243,60	18,74	72,13	35,19	
Somme des 16	16,25	87,01	15,94	10,92	26,85	58,27	207,48	123,95	85,51	62,68	59,81	53,71	13,44	398,50	29,16	103,25	45,81	

Echantillons de surface(0-0.50 m)
 Echantillons de profondeur (0,50-1,50m)

Pas de prélèvement d'échantillon
 HAP(10)

Echantillon unités	S28		S29		S30		S31		S32		S 33		S 34		S35		S 36	
	01 S 982 mg/kg	01 S 983 mg/kg	01 S 984 mg/kg	01 S 985 mg/kg	01 S 986 mg/kg	01 S 987 mg/kg	01 S 988 mg/kg	01 S 989 mg/kg	01 S 991 mg/kg	01 S 992 mg/kg	01 S 994 mg/kg	01 S 995 mg/kg	01 S 996 mg/kg	01 S 999 mg/kg	01 S 998 mg/kg	01 S 1001 mg/kg	01 S 1002 mg/kg	
Naphtalène	8,03	< 2,52	9,52	1,79	1,27	0,008	7,11	0,09	9,32	0,09	< 1,23	0,55	9,00	1,57	27,5	6,90	2,08	
Acénaphthène	< 1,87	< 2,61	< 2,61	< 0,56	< 0,56	< 0,007	< 0,69	< 0,014	< 1,40	< 0,03	< 1,27	< 0,02	< 2,37	< 0,53	< 32,6	< 1,63	< 1,63	
Fluorène	1,39	< 0,60	5,74	1,85	0,31	< 0,002	0,16	< 0,003	0,51	0,01	< 0,29	0,02	< 0,54	0,45	< 7,5	0,84	< 0,37	
Phénanthrène	26,70	5,34	73,60	37,8	5,39	0,009	3,88	0,06	10,60	0,27	5,08	0,57	7,16	9,18	432,0	15,60	9,62	
Anthracène	3,30	0,84	13,60	4,03	0,99	0,001	0,79	0,01	1,48	0,04	1,39	0,07	1,16	2,44	5,5	2,74	1,05	
Fluoranthène	6,71	12,00	161,10	62,2	7,61	0,004	2,50	0,035	17,40	0,46	6,40	0,48	7,40	9,94	160,0	22,60	10,40	
Pyrène	33,70	0,44	146,00	49,6	6,17	0,003	2,13	0,03	13,30	0,47	4,51	0,40	4,05	8,29	107,9	14,70	7,07	
Benzo(a)anthracène	14,10	5,64	73,20	23,0	3,15	0,003	3,33	0,04	11,60	0,26	3,35	0,28	3,11	5,74	42,6	11,00	4,07	
Chrysène	10,40	4,50	52,20	18,3	2,31	0,002	2,92	0,04	9,97	0,26	3,00	0,24	2,67	5,14	41,4	9,22	3,61	
Benzo(b)fluoranthène	6,71	3,46	38,90	12,2	1,53	0,002	2,42	0,02	7,10	0,16	2,06	0,19	1,71	3,26	30,7	6,79	1,81	
Benzo(k)fluoranthène	5,31	2,30	32,50	10,0	1,16	< 0,002	1,64	0,02	6,00	0,11	1,53	0,14	1,18	2,52	23,1	4,82	1,35	
Benzo(a)pyrène	8,17	3,85	38,90	12,0	2,02	0,002	2,94	0,03	10,40	0,20	0,86	0,24	1,88	4,01	18,7	7,53	2,18	
Benzo(c)pyrène	11,00	3,91	67,90	17,8	2,97	< 0,007	5,33	0,03	9,26	0,20	< 1,31	0,17	< 2,44	1,38	8,7	9,35	< 1,68	
Dibenzo(a,h)anthracène	0,92	< 0,44	5,57	1,73	0,23	< 0,001	0,36	0,005	1,59	0,03	0,24	0,03	7,40	0,44	3,21	< 0,28	< 0,28	
Benzo(g,h,i)peryène	6,57	3,09	32,00	10,1	1,20	0,003	2,60	0,04	15,20	0,20	3,95	0,36	1,86	5,28	34,6	5,64	1,47	
Indéno(1,2,3-c,d)pyrène	7,60	3,58	53,90	17,8	1,98	0,003	3,36	0,03	6,86	< 0,006	1,51	0,17	< 0,49	1,28	34,0	11,20	2,90	
Somme des 10	96,89	43,66	540,52	197,02	27,08	0,04	31,07	0,40	98,83	1,90	28,30	3,10	35,91	47,10	819,42	97,25	38,73	
Somme des 16	152,48	55,12	807,24	280,76	38,85	0,06	42,16	0,50	131,99	2,80	37,98	3,93	54,42	61,45	1009,98	130,84	51,57	



ANNEXE 5 :

Cartographie de la région d'Hargarten aux Mines et concentrations en éléments métalliques dans cette région (dosages réalisés par le BRGM)

Niton723S
 Serial #XL700-U3401KY174
 BULK
 Header:109Cd
 Site: Hargarten

No	XLNo	Ssec	Date/Time	mg/kg U	mg/kg erU	mg/kg Pb	mg/kg erPb	mg/kg As	mg/kg erAs	mg/kg Zn	mg/kg erZn	mg/kg Cu	mg/kg erCu	% Fe	% erFe	mg/kg Co	mg/kg erCo
2	Hargar M2	573,3	21/06/2004 11:21	3,1	1,3	2497	19	49	16	104	10	69	17	0,54	0,03	36	17
4	Hargart M2	1620,2	21/06/2004 17:12	3,2	0,8	2654	12	39	10	118	6	86	10	0,57	0,03	29	11
5	Hargar M3	1035,4	21/06/2004 18:24	3,2	1,0	2236	14	21	17	105	7	77	13	0,50	0,02	22	19
6	Harga M1	1963,2	21/06/2004 19:09	4,0	0,8	2553	11	65	9	134	6	83	10	0,58	0,03	29	10

Serial #XL700-U3401E864LY
 BULK

No	XLNo	Ssec	Date/Time	Mo	Mo Err	Zr	Zr Err	Sr	Sr Err	Rb	Rb Err	Pb	Pb Err	Se	Se Err	As	As Err	Hg	Hg Err	Zn	Zn Err	Cu	Cu Err	Ni	Ni Err	Co	Co Err	Fe	Fe Err	Mn	Mn Err	Cr	Cr Error	
2	P1-0 Hargarten	26	317,9	11/12/2002 14:32	<LOD	3,9	103	3,1	43	2,6	97,4	5	1660	22,4	<LOD	4,8	<LOD	27,75	<LOD	7,2	76,7	10,3	35,9	16	<LOD	39,75	<LOD	63,45	6729	110	<LOD	144,3	85,8	56,8
3	blank#1, scuth H	27	333,9	11/12/2002 15:06	<LOD	2,85	154,5	2,1	30,5	1,7	81,1	3,9	170,2	6,7	<LOD	2,85	12,6	6,1	<LOD	3,3	72,3	7,6	<LOD	18	49,5	21,5	<LOD	55,95	6694,4	99,7	<LOD	126,15	102,5	46,4
4	P58-0 Konken	28	341,9	11/12/2002 16:10	<LOD	3,15	96	2,4	40,9	2	86,3	4,3	253	8,3	<LOD	3,15	12,2	7,4	<LOD	3,75	80	8,3	<LOD	19,5	38,3	22,1	<LOD	52,2	4908,8	89,6	<LOD	116,4	88,9	45,4
5	P58-20 Konken	29	336,0	11/12/2002 16:33	<LOD	3,3	47,2	2,5	47,2	2,7	104,5	5	2890	30	<LOD	5,25	135,4	23,9	<LOD	8,55	76	10,1	<LOD	22,5	<LOD	36,6	<LOD	53,4	4118,4	88,5	<LOD	121,2	98,6	51,9
6	P1-0 Hargarten	153,1	21/08/2002 11:59	<LOD		40,1		40,1		81,8		2080		<LOD		<LOD	27,75	<LOD		101,4		52,9		<LOD		<LOD		7686,4		883,4		<LOD		
7	P59-0 Konken	264,0	23/07/2002 17:41	5,8		95,5		52		105,8		277,4		<LOD		22,5		<LOD		86,4		32,8		<LOD		<LOD		6019,2		<LOD		<LOD		
8	P59-20 Konken	269,5	23/07/2002 17:59	7,9		36,5		47,4		81,3		2178,2		<LOD		173,3		<LOD		74,5		28,1		<LOD		<LOD		4258,2		192,4		<LOD		

<LOD : below limit of detection
 Errors : Function of signal/background ratios and acquiring periods

ANNEXE 6 :

Données brutes de croissance et de bioaccumulation des EM pour les escargots transférés sur le site de CEDILOR en 2003

escargot	T 0		T 1		T 2		T 3		T 4	
	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre
11 1	0.9	13.4	escargots morts							
11 2	1.1	14.1								
11 3	1.2	14.2								
11 4	0.9	14.2								
11 5	0.9	13.6								
11 6	1	14.2								
11 7	0.9	13.4								
11 8	1	14.2								
11 9	1.1	14.2								
11 10	0.9	13.3								
moyenne	0.99	13.88								
écart-type	0.11	0.40								
12 1	1.2	14.4	1.2	16.2	2.2	18.5	4.5	21.6	2.1	19.3
12 2	0.9	14.4	1.9	18.2	2.5	21.2	4.4	22.7	4.6	27.3
12 3	1	14.4	1.2	16.4	2.6	20.7	3.4	20	4.8	25.5
12 4	1.1	14.2	1.6	17	2.2	20	3.3	21	3.9	24.4
12 5	1	14.5	1.3	16.3	2.5	19.5	3.1	19.8	4	25.4
12 6	0.9	14.1	1.6	17.3	2.9	21.4			4.5	26.5
12 7	0.9	14	1.6	17.1	2.5	20.2				
12 8	1.1	14.6	1.6	18	2.5	20.1				
12 9	1	14.1	1.7	17.4	2.3	20.1				
12 10	1	13.5	1.1	15.5	2.5	20.1				
moyenne	1.01	14.22	1.48	16.94	2.47	20.18	3.74	21.02	3.98	24.73
écart-type	0.10	0.32	0.26	0.84	0.21	0.83	0.66	1.19	0.99	2.84
13 1	1.1	14.1	2	17.2	escargots morts					
13 2	1.1	14.2	1.4	17.2						
13 3	0.9	13.5	1.7	18.1						
13 4	1	14	1.4	17						
13 5	0.9	13	1.7	18.1						
13 6	0.9	14.2	1.3	16.4						
13 7	1	14.5	1.6	17.4						
13 8	1	14.3	1.1	16.3						
13 9	0.9	13.5	1.7	17.6						
13 10	0.9	14.2								
moyenne	0.97	13.95	1.54	17.26						
écart-type	0.08	0.46	0.27	0.64						

	Cuivre		Zinc		Fer		Manganèse		Nickel		Plomb		Cadmium		Chrome	
	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères
témoins	196.54	137.87	50.56	242.29	59.66	199.33	34.74	306.82	<ld	1.57	<ld	<ld	0.88	0.62	0.97	1.81
	58.01	16.80	6.65	29.98	2.88	30.53	10.06	108.20	<ld	0.33	<ld	<ld	0.35	0.06	0.40	0.18
transférés	97.71	183.12	48.86	257.74	63.33	312.79	45.24	266.74	<ld	2.12	<ld	1.06	<ld	0.74	1.27	2.28
	88.42	144.07	47.03	184.26	52.67	359.64	58.32	160.77	<ld	3.13	<ld	3.65	<ld	0.78	0.94	1.98
transférés	118.06	142.26	46.12	208.62	53.50	564.75	47.96	243.47	<ld	3.34	<ld	0.95	<ld	0.57	0.92	2.24
	182.02	134.46	46.30	270.09	59.08	240.86	25.55	312.18	<ld	2.34	<ld	1.17	<ld	0.70	0.96	1.87
transférés	129.42	189.28	38.55	195.02	60.58	187.13	41.30	85.32	<ld	1.43	<ld	0.72	<ld	0.65	0.55	1.43
	120.33	141.25	44.33	292.50	78.11	491.88	52.78	468.75	<ld	2.50	<ld	2.50	<ld	0.50	1.06	2.00
moyenne	122.66	155.74	45.20	234.71	61.21	359.51	45.19	256.21		2.48		1.68		0.89	0.95	1.97
écart-type	32.83	23.90	3.57	44.55	9.25	145.34	11.30	131.83		0.69		1.15		0.10	0.23	0.31

ANNEXE 7 :

Valeurs de Constat d'Impact, pour les sols, pour un usage sensible ou non sensible (usage industriel) et Valeur de Définition Source Sol (BRGM, 2002)

	<i>Valeur de Définition</i>	<i>Valeurs de Constat d'Impact sol (mg.kg⁻¹ PS)</i>	
	Source Sol (mg.kg⁻¹ PS)	<i>Usage sensible</i>	<i>Usage non sensible</i>
Cu	95	190	950
Zn	4500	9000	-
Ni	70	140	900
Pb	200	400	2000
Cd	10	20	60
Cr	65	130	7000
Benzo(a)anthracène	7	13.9	252
Benzo(k)fluoranthène	450	900	2520
Chrysène	5175	10350	25200
Benzo(a)pyrène	3.5	7	25
Fluoranthène	3050	6100	-
Indéno(1, 2, 3, c)pyrène	8	16.1	252
naphtanlène	23	46	-

ANNEXE 8 :
Données brutes de croissance et de bioaccumulation des EM pour les escargots transférés sur le site d'Hargarten aux Mines

escargot	T 0		T 1		T 2		T 3		T 4	
	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre
11 1	0.8	14.5	0.8	14.3	1	15	1.1	14.6	1.4	16.2
11 2	0.7	13.6	0.8	14.1	0.8	15.2	1.1	14.7	1.2	15.1
11 3	0.8	14.7	0.8	14.4	1.2	15	1.2	14.8	1.1	15.1
11 4	0.7	14.2	0.9	14.3	1.4	14.5	1.2	15	1.1	15.2
11 5	0.7	13.8	0.7	13.1	1.3	15.1	1.3	15.3	1.2	14
11 6	0.9	14.4	0.8	15	0.9	14	1	14.7	1.3	15.9
11 7	0.8	14.1	0.9	14.2			1	14.5	1.3	15.2
11 8	0.8	14	0.5	13.1					1.2	15.2
11 9	0.8	14.5	0.8	14.2						
11 10	0.9	14.9								
moyenne	0.79	14.27	0.78	14.08	1.1	14.8	1.13	14.80	1.23	15.24
écart type	0.07	0.41	0.12	0.61	0.24	0.46	0.11	0.27	0.10	0.65
12 1	0.7	14.2	0.6	14.1	1.2	14.3	0.9	14.2	1.1	14.6
12 2	0.8	15	0.9	15.8	1.2	14.1	1.2	14.5	1.3	15.3
12 3	0.7	14	0.5	14.2	1	15.2	1.2	14.7	1.1	14.5
12 4	0.7	14	0.6	13	1	14.4	1	13.3	1.2	15.3
12 5	0.8	14.2	0.8	14.1	0.8	14.7	0.9	14.2	1.1	14.6
12 6	0.9	15.2	0.8	14.2	1	14.3	1.3	15.2	1.1	14.4
12 7	0.8	14.3	0.8	14.5					1.2	15.1
12 8	0.8	14	0.8	14						
12 9	0.8	14.5	0.7	14.2						
12 10	0.7	13.8								
moyenne	0.77	14.32	0.72	14.23	1.03	14.5	1.08	14.35	1.16	14.83
écart type	0.07	0.46	0.13	0.72	0.15	0.39	0.17	0.63	0.08	0.39
13 1	0.8	14.3	0.9	14.6	1.1	14.3	0.7	14.1	1.2	15.2
13 2	0.7	13.8	0.8	14.1	0.5	14.2	1.2	15	1.1	15.1
13 3	0.7	14.4	0.6	14.2	0.8	14.1	0.9	14.6	0.8	14
13 4	0.9	14.9	0.8	14.1	0.8	14.3	1	14.2	0.9	14
13 5	0.7	14.1	0.9	14.3	0.8	14.2	1.2	15.2	1	14.4
13 6	0.8	14.1	0.9	15	0.8	15.1	0.6	13.5	1.2	15.2
13 7	0.8	14.2	0.8	14	0.9	14	0.9	14.1	1	14.3
13 8	0.8	14.4								
13 9	0.9	15.3								
13 10	0.7	14.2								
moyenne	0.78	14.37	0.81	14.33	0.81	14.31	0.93	14.39	1.03	14.60
écart type	0.08	0.43	0.11	0.35	0.18	0.36	0.23	0.59	0.15	0.55

	Cuivre		Zinc		Fer		Manganèse		Nickel		Plomb		Cadmium		Chrome	
	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères
	418	199.5	190	589	266	294.5	190	741	3.8	4.75	38	104.5	3.8	4.275	93.48	<ld
	443.33	224.55	126.67	424.42	205.83	681.04	126.67	616.88	1.58	4.94	1.58	56.75	1.58	1.48	33.72	4.94
	228.00	199.66	85.50	512.03	123.50	428.31	38.00	753.56	0.95	6.44	0.95	41.86	0.95	1.93	20.23	3.22
	323.00	186.83	133.00	421.17	190.00	262.83	95.00	604.83	1.90	3.17	1.90	34.83	1.90	1.90	38.76	3.17
	247.83	243.44	82.61	427.50	107.39	427.50	99.13	356.25	0.83	5.94	0.83	89.06	0.83	2.08	18.42	5.94
M1	332.03	210.80	123.56	474.82	178.54	418.84	109.76	614.51	1.81	5.05	8.65	65.40	1.81	2.33	40.92	4.31
écart type	97.18	22.81	43.70	74.30	64.45	164.86	55.24	159.79	1.20	1.26	16.41	30.21	1.20	1.11	30.63	1.36
	760.00	300.14	190.00	357.97	380.00	335.94	332.50	368.99	4.75	2.75	47.50	52.32	4.75	2.20	101.18	5.51
	380.00	215.76	126.67	463.73	190.00	441.19	84.44	544.24	2.11	3.22	2.11	70.85	2.11	1.61	90.36	3.22
	221.67	205.32	95.00	499.52	174.17	502.58	63.33	839.68	1.58	3.06	15.83	52.10	1.58	1.84	33.09	3.06
	431.82	240.00	138.18	453.33	172.73	256.67	138.18	540.00	1.73	3.33	17.27	20.00	1.73	1.67	36.10	3.33
	228.00	225.95	95.00	423.65	114.00	333.78	104.50	331.22	0.95	5.14	0.95	74.46	0.95	1.28	23.56	2.57
M2	404.30	237.44	128.97	439.64	206.18	374.03	144.59	524.82	2.22	3.50	16.73	53.94	2.22	1.72	56.86	3.54
écart type	219.26	37.32	39.12	53.10	101.39	97.31	108.60	200.94	1.47	0.94	18.78	21.59	1.47	0.34	36.02	1.14
	295.56	290.59	63.33	502.94	190.00	335.29	63.33	573.73	2.11	3.73	2.11	48.43	2.11	2.98	60.17	3.73
	332.50	173.90	142.50	392.88	237.50	280.17	190.00	437.97	2.38	3.22	2.38	51.53	2.38	2.25	47.50	3.22
	464.44	210.36	168.89	430.89	232.22	366.43	190.00	814.29	2.11	6.79	2.11	47.50	2.11	2.04	42.22	3.39
	244.29	117.17	108.57	323.00	217.14	190.00	81.43	433.83	2.71	3.17	2.71	57.00	2.71	1.90	49.94	3.17
	285.00	106.31	126.67	314.40	285.00	262.38	126.67	508.93	3.17	4.52	3.17	38.45	3.17	1.36	74.73	2.26
M3	324.36	179.66	121.99	392.82	232.37	286.85	130.29	553.75	2.50	4.28	2.50	48.58	2.50	2.11	54.91	3.15
écart type	84.38	75.11	39.57	78.42	34.73	68.38	59.19	156.58	0.45	1.50	0.45	6.77	0.45	0.59	12.86	0.54
moyenne	353.56	209.30	124.84	435.76	205.70	359.91	128.21	564.36	2.18	4.28	9.29	55.98	2.18	2.05	50.90	3.62
écart type	140.92	52.49	37.95	73.13	70.61	122.57	73.90	165.33	1.08	1.33	14.64	21.44	1.08	0.74	27.20	1.07
<i>témoins</i>	<i>196.54</i>	<i>137.87</i>	<i>50.56</i>	<i>242.29</i>	<i>59.66</i>	<i>199.33</i>	<i>34.74</i>	<i>306.82</i>	<i><ld</i>	<i>1.57</i>	<i><ld</i>	<i><ld</i>	<i>0.88</i>	<i>0.62</i>	<i>0.97</i>	<i>1.81</i>
	<i>58.01</i>	<i>16.80</i>	<i>6.65</i>	<i>29.98</i>	<i>2.88</i>	<i>30.53</i>	<i>10.06</i>	<i>108.20</i>	<i><ld</i>	<i>0.33</i>	<i><ld</i>	<i><ld</i>	<i>0.35</i>	<i>0.06</i>	<i>0.40</i>	<i>0.18</i>

ANNEXE 9 :
Données brutes de croissance pour les escargots transférés sur le site de
SOTRENOR, Stations 1 – 2 – 3 – 4

Station 1	T 0		T 1		T 2		T 3		T 4	
escargot	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre
11 1	0.9	15.1	1.6	16.1	2	17.3	2.1	18.2	2.9	20.5
11 2	0.8	14.1	1.5	18.1	2.1	17.1	2.4	20.2	2.7	22.5
11 3	0.9	14.1	1.9	16.85	2.4	19.1	2.2	18.3	2.5	20
11 4	0.8	14.2	1.6	15.65	2.3	19.9	3.2	21.1	3.6	24
11 5	0.8	14.2	1.7	14.8	2.1	17.8	4	21.6	3.8	24.3
11 6	0.9	14.3	1.6	16.8	1.7	15.8	3.1	20.2	3.5	23.2
11 7	0.8	13.4	1.6	16.3	1.6	16.4	2.8	21.3	4.5	24.6
11 8	1	14.2	1.6	15.8	1.6	16.4	2.7	20.2	3.4	22.3
11 9	0.8	14.2	1.6	15.7	2.4	19.4	1.9	21.7	3	22.3
11 10	0.8	14.4	1.4	16.1	2.3	18.7	2.9	21.05	2.2	20.1
moyenne	0.85	14.22	1.61	16.22	2.05	17.79	2.73	20.39	3.21	22.38
écart type	0.07	0.41	0.13	0.89	0.32	1.42	0.62	1.26	0.68	1.71
12 1	0.8	14.5	2.6	17.1	2.2	16.6	2.7	20.8	2.9	22
12 2	1	14.5	2	16.3	2.2	18.3	3.2	21.2	1.9	18.5
12 3	0.8	14.1	2	18.1	2.2	17.5	2.5	19.8	2.5	20.3
12 4	0.8	14	1.8	16.3	2.2	17.7	2.5	20.5	3.4	24.5
12 5	0.8	14.1	1.4	16.1	2.4	18.1	2.6	20.9	2.9	22.4
12 6	0.9	15.2	1.5	16	2.5	20.2	3.5	21.3	2.6	21
12 7	0.9	14.4	1.5	15.8	1.7	16.9	3.2	21.6	3.1	22.3
12 8	1	14.3	1.6	15.5	2.1	18.7	2.8	20.9	2.8	21.4
12 9	0.8	14.2	1.6	16.4	2.6	19.6	1.6	17.2	3	22
12 10	0.8	14.4	1.8	15.3	2.7	20.1	1.9	17.4	3.2	22.6
moyenne	0.86	14.37	1.78	16.29	2.28	18.37	2.65	20.16	2.83	21.70
écart type	0.08	0.34	0.36	0.81	0.29	1.27	0.58	1.58	0.42	1.58
13 1	0.8	14.1	1.6	17.4	2	16.6	2.6	20.9	3.2	22.4
13 2	0.8	14.2	2.1	18.1	2.1	16.8	2.7	20.85	3.2	22
13 3	0.8	14.2	1.6	16	2.8	20.2	4.1	22.2	3.6	23.1
13 4	0.8	14.2	2.1	17.2	2	18.3	2.8	21.2	2.5	19
13 5	0.8	14.1	1.6	15.7	2.5	19.9	2.8	20.1	2.3	19.6
13 6	0.8	14.2	1.6	15.8	2.3	19.9	2.1	19.1	4.4	24.6
13 7	0.8	14.2	1.7	17.1	1.9	18.2	2.7	20.9	2.9	23.5
13 8	0.8	14.2	2.1	16.4	2.2	18.3	2.7	20.2	3.2	23.3
13 9	0.8	14.1	1.5	15.8	1.7	17.8	2.6	20.2	3	22.2
13 10	0.9	15.2	1.7	17.4	2.1	18.4	2.7	20.3	2	19.4
moyenne	0.81	14.27	1.76	16.69	2.16	18.44	2.78	20.60	3.03	21.91
écart type	0.03	0.33	0.24	0.85	0.31	1.24	0.51	0.82	0.68	1.93

Station 2	T 0		T 1		T 2		T 3		T 4	
escargot	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre
11 1	0.8	14	1.8	16.3	2.5	19.7	3.3	21.7	2.8	22.2
11 2	0.8	14.1	1.7	16.1	1.9	18.1	2.2	19.2	2.5	19.3
11 3	0.8	13.9	1.4	15.7	2	17.5	2.9	19.5	3.6	24
11 4	0.8	14	1.6	17.1	2	17.2	3.4	21.2	3.3	23.2
11 5	0.8	14.2	1.6	15	2	18.1	3.2	20.6	3.3	21.5
11 6	0.8	14.4	1.9	17.2	2.5	19.1	2.9	20.1	3.2	22.3
11 7	0.8	15	1.2	15.25	2.2	19.6	2.9	20.2	2.9	21.8
11 8	0.8	14.1	1.5	14.8	2.2	19.7	2.8	20.2	2.9	23
11 9	0.9	15.2	1.6	16.7	2.4	18.6	2.9	20.6	2.5	21
11 10	0.8	14.3	1.6	15.3	2	18.4	3.4	22.3	3.2	23.3
moyenne	0.81	14.32	1.59	15.95	2.17	18.6	2.99	20.56	3.02	22.16
écart type	0.03	0.44	0.20	0.87	0.23	0.91	0.36	0.95	0.36	1.36
12 1	0.9	15.1	1.5	17.1	2.2	19.2	3	21.1	3.1	23
12 2	0.8	14.1	1.7	16.1	2.2	18.1	2.6	20.2	1.9	18.2
12 3	0.8	14.2	1.6	15.25	1.7	17.9	2.2	19.1	2.7	20.6
12 4	0.8	15.2	1.3	15.4	1.8	18.4	2.8	20.5	3.4	23.1
12 5	0.9	15.1	1.6	15	2	17.5	2.3	19.5	2.9	22.5
12 6	0.8	14.2	1.9	16.8	2.4	18.2	3.2	21.1	2.9	22.5
12 7	0.8	13.9	1.9	17.1	2.3	18.2	2.6	20.9	2.3	20.3
12 8	0.8	14	1.8	16.25	1.6	17.9	2.6	20.3	2.8	23
12 9	0.9	14.2	1	15.2	1.9	18.2	2.3	18.9	2.8	21.6
12 10	0.8	14.5	1.7	15.3	2.2	18.3	2.5	19.9	2.3	20
moyenne	0.83	14.45	1.60	15.95	2.03	18.19	2.61	20.15	2.71	21.48
écart type	0.05	0.50	0.28	0.83	0.27	0.44	0.32	0.79	0.44	1.65
13 1	0.8	14.2	1.9	17.45	2	17.2	2.3	20.9	2.9	22.3
13 2	0.8	14.1	1.4	15.5	1.7	16.7	3.3	21.7	3.7	22.5
13 3	0.9	14.5	1.8	16.15	2.3	19.2	2.9	21.2	3.2	23.1
13 4	0.8	14.2	2.1	16.4	2.4	19.6	2.8	20.5	3.3	22.4
13 5	0.8	14	1.7	17.05	2.8	20.7	3.1	20.3	2.7	22.2
13 6	0.8	14	1.7	16.4	2.3	18.2	3.1	21.1	2.1	19.2
13 7	0.7	14.2	1.4	15.3	2	18.7	1.8	18.2	2.9	21.6
13 8	0.8	15.2	1.7	16.55	2.3	18.3	3.1	21.4	3.2	22.4
13 9	0.8	15.2	1.7	16.85	2.5	18.6	2.2	19.1	3.6	22.7
13 10	0.8	14.6	1.4	15.1	2.5	19.1	2.7	21.1	3.7	24.5
moyenne	0.8	14.42	1.68	16.28	2.28	18.63	2.73	20.55	3.13	22.29
écart type	0.05	0.45	0.23	0.77	0.31	1.15	0.48	1.10	0.50	1.33

Station 3	T 0		T 1		T 2		T 3		T 4	
escargot	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre
11 1	0.8	14.3	1.7	15.3	2.6	19.6	2.5	20.1	3.1	21.3
11 2	0.9	15.1	1.6	16.1	2.2	18.3	2.7	20.7	2.6	18.2
11 3	0.8	14.2	1.8	14.3	2.2	19.1	2.7	20.2	3	21.7
11 4	0.8	14	1.6	15.1	3	20	2.6	20.1	3.2	22
11 5	0.8	14.2	1.6	18.5	2	18.2	2.6	20.1	2.4	20
11 6	0.8	14.6	1.4	15.3	2.2	17.4	2.9	20.6	3	22.1
11 7	0.8	15.2	1.5	14.7	1.6	17.5	1.9	18.7	3.5	22.4
11 8	0.9	14.2	1.6	15.3	2.2	18.9	3.4	21.5	3.5	23.2
11 9	0.8	14	2.1	16.6	1.7	17.5	3.3	21.7	2.7	19.6
11 10	0.8	14.1	1.4	15	1.6	16.4	2.5	20.1	3	21.5
moyenne	0.82	14.39	1.63	15.62	2.13	18.29	2.71	20.38	3.00	21.20
écart type	0.04	0.44	0.21	1.20	0.44	1.12	0.43	0.84	0.36	1.50
12 1	0.8	14	1.6	15.3	2.5	19.8	3.1	22.8	2.8	21.1
12 2	0.8	15.1	1.4	14.5	2.1	18.7	3.1	21.6	3.3	23.4
12 3	0.9	15.2	1.4	14.5	2.5	19.2	2.5	20.3	3.4	22.8
12 4	0.8	14	1.7	15.5	2.5	18.9	2.7	20.1	3	22.8
12 5	0.8	14.3	2.1	16	2.2	19.2	3	21.1	3	21.5
12 6	0.8	14.2	1.7	16.3	2.1	18.1	2.5	20.1	2.9	22.1
12 7	0.8	14.4	1.4	15.5	2	17.4	2.9	21.6	3.3	22.5
12 8	0.8	14	1.4	15.3	2	18.1	2.2	20.6	3	22.8
12 9	0.8	14	1.6	15.7	2.5	19.8	2.8	20.7	3.2	23.1
12 10	0.8	14.4	1.8	15.3	2.1	18.1	3	21.1	2.8	22.1
moyenne	0.81	14.36	1.61	15.39	2.25	18.73	2.78	21	3.07	22.42
écart type	0.03	0.45	0.23	0.57	0.22	0.80	0.30	0.84	0.22	0.72
13 1	0.8	14.1	1.7	14.8	2.3	18.1	2.5	19.1	3.2	22.2
13 2	0.9	15.6	1.5	14.8	2.4	19.2	2.9	21.1	3.1	22.1
13 3	0.8	14.1	1.6	14.1	2.3	19.7	2.8	21.2	3.2	22.7
13 4	0.8	14.4	1.9	17.1	2.3	20.2	2.8	21.1	4.1	24.5
13 5	0.8	14.1	1.6	15.2	1.9	18.7	2.5	20.3	2.6	20.2
13 6	0.9	14.2	1.5	15.5	2.3	19.2	3.4	22.1	2.4	20
13 7	0.8	14.2	1.6	16.6	1.9	17.2	2.7	20.6	3.6	23
13 8	0.9	14.3	1.7	16.7	2.5	20.3	3	22.5	3	22.4
13 9	0.8	14.3	2	16.3	2.1	17.5	2.2	19.1	3.2	21.7
13 10	0.9	15.2	1.5	16.1	2	18.8	2.9	21.6	2.9	22.4
moyenne	0.84	14.45	1.66	15.72	2.20	18.89	2.77	20.87	3.13	22.12
écart type	0.05	0.52	0.17	0.99	0.21	1.05	0.33	1.13	0.48	1.30

Station 4	T 0		T 1		T 2		T 3		T 4	
escargot	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre
11 1	0.8	14.2	1.6	14.8	2.7	18.3	2.6	20.15	3.2	22.4
11 2	0.9	15.3	2	15.3	2.3	18.8	2.5	19.7	3.2	22.5
11 3	0.8	14.2	2.1	16.4	2.5	19.2	3.1	21.25	3.3	23.1
11 4	0.8	14.6	2.1	17.8	2.6	19.2	2.9	21.1	2.9	22.6
11 5	0.8	15	2.4	16.8	2.1	18.5	2.6	20.9	2.6	21.7
11 6	0.8	14.1	1.5	15.7	2.2	18.3	3.4	21.4	2.8	22.1
11 7	0.8	15	1.5	16	2.8	19.3	3	21.1	3.2	22.5
11 8	0.9	15.1	1.4	16	2	18.1	2.5	20.6	2.8	22.1
11 9	0.8	14.3	1.3	15.7	2.5	19.2	2.8	21.3	3.1	23
11 10	0.8	14.2	1.6	15.7	2.2	18.3	2.5	20.3	2.6	21.7
moyenne	0.82	14.6	1.75	16.02	2.39	18.72	2.79	20.78	2.97	22.37
écart type	0.04	0.46	0.37	0.83	0.27	0.47	0.31	0.57	0.26	0.48
12 1	0.9	14.1	1.8	16.8	1.6	16.6	2.3	20.9	2.8	22.6
12 2	0.8	14.4	1.9	15.7	2.3	19.2	3	20.6	2.7	22.1
12 3	0.8	14.1	1.4	16.3	2	18.2	2.5	19.1	3.5	23
12 4	0.8	14.2	1.7	16	2.3	18.2	2.6	20.2	2.6	21.1
12 5	0.9	14	1.4	15.2	2.7	19.1	2.2	20.3	2.2	21.2
12 6	0.8	14.4	1.7	16.3	2.1	19.4	2.5	20.9	2.6	22
12 7	0.7	14	1.5	16.5	1.9	19.1	2.5	19.3	2.9	21.6
12 8	0.8	14.2	1.7	16.4	2.3	18.1	2.8	20.5	3.5	23.1
12 9	0.8	14.2	1.6	16.1	2.3	18.6	2.5	20.5	3	22
12 10	0.8	15.2	1.6	16.3	2	17.3	2.8	20.3	3.1	22.3
moyenne	0.81	14.28	1.63	16.16	2.15	18.38	2.57	20.26	2.89	22.10
écart type	0.06	0.35	0.16	0.45	0.30	0.90	0.24	0.61	0.41	0.68
13 1	0.9	14.3	1.9	17.1	2.4	19.1	2.2	20.3	3.5	23.2
13 2	0.8	14.2	2	16.3	2.6	20.1	3.2	20.1	3.5	23.3
13 3	0.9	15	1.6	16.1	2.4	19.1	2.8	21.4	3.1	23.2
13 4	0.9	14.9	0.9	14.8	1.1	16.1	1.6	17.2	1.7	18.1
13 5	0.8	14.3	1.6	16	2.5	19.6	1.4	16.6	2.8	22.4
13 6	0.8	14.3	1.7	16.3	2.6	19.4	3.1	21.15	3.8	23.4
13 7	0.8	14	1.6	16.4	2.4	19.3	2.9	21.2	1.5	17.6
13 8	0.8	14	1.6	16.1	2.5	19.8	2.8	21.3	1.9	18.3
13 9	0.8	13.2	1.1	14.4	1.4	16.25	2.9	21.7	3.1	23.5
13 10	0.7	13.2	0.9	13.5	1.3	15.4	1.8	17.8	3.5	23.5
moyenne	0.82	14.14	1.49	15.70	2.12	18.42	2.47	19.88	2.84	21.65
écart type	0.06	0.60	0.39	1.10	0.60	1.76	0.66	1.93	0.84	2.54

ANNEXE 9 suite :
Données brutes de bioaccumulation des EM pour les escargots transférés sur le site de SOTRENOR, Stations 1 – 2 – 3 – 4

	Cuivre		Zinc		Fer		Manganèse		Nickel		Plomb		Cadmium		Chrome	
Station 1	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères
S1 MI 1	106.52	97.53	63.33	304.14	54.70	515.82	60.45	271.63	0.92	3.61	0.60	3.61	0.86	0.86	0.29	0.29
S1 MI 2	180.38	108.66	69.75	424.25	67.34	1301.37	55.32	303.87	1.03	3.90	0.19	5.21	0.72	0.72	0.48	0.48
S1 MI 3	102.76	75.38	54.29	301.01	63.98	1254.62	48.47	258.15	< Id	4.13	< Id	3.61	0.19	0.19	0.78	0.78
S1 MI 4	121.16	77.90	57.83	357.20	63.33	212.80	63.33	238.45	< Id	1.90	< Id	6.65	1.10	1.10	0.55	0.55
S1 MI 5	81.85	105.56	58.46	356.88	67.23	384.02	73.08	221.16	< Id	2.01	< Id	2.01	0.88	0.88	0.29	0.29
S1 M2 1	132.32	121.13	61.07	456.00	98.39	818.19	47.50	257.69	0.75	5.94	0.37	5.94	0.68	0.68	0.34	0.34
S1 M2 2	136.48	98.18	53.52	369.09	72.25	359.09	48.17	320.00	0.94	2.73	0.40	3.64	1.34	1.34	1.34	1.34
S1 M2 3	139.59	102.56	54.29	345.45	65.92	400.51	50.41	374.60	< Id	2.16	< Id	4.32	1.16	1.16	0.39	0.39
S1 M2 4	98.65	107.60	54.81	325.71	62.12	485.66	69.42	235.56	< Id	1.94	< Id	3.88	0.37	0.37	1.83	1.83
S1 M2 5	171.00	158.84	57.00	392.06	80.75	635.34	80.75	321.69	< Id	3.02	< Id	3.02	0.95	0.95	1.43	1.43
S1 M3 1	183.87	114.00	52.10	304.00	64.35	440.94	61.29	152.72	1.90	3.58	0.25	2.15	0.31	0.31	0.61	0.61
S1 M3 2	195.94	127.20	53.44	306.86	68.28	975.44	68.28	283.01	1.57	4.77	0.21	3.18	0.89	0.89	1.48	1.48
S1 M3 3	138.65	102.43	56.49	377.52	69.32	502.26	53.92	317.22	< Id	3.30	< Id	3.30	0.51	0.51	0.26	0.26
S1 M3 4	198.51	125.88	51.04	349.92	59.55	297.67	51.04	262.04	< Id	4.75	< Id	2.38	0.85	0.85	1.42	1.42
S1 M3 5	183.77	141.52	46.72	369.52	56.07	280.41	74.75	248.97	< Id	1.31	< Id	5.24	0.31	0.31	1.56	1.56
moyenne	144.76	110.96	56.28	355.97	67.57	590.94	60.41	271.12	1.19	3.27	0.34	3.88	0.74	0.74	0.87	0.87
écart-type	38.43	21.90	5.50	45.26	10.64	343.51	10.85	52.62	0.45	1.30	0.16	1.37	0.34	0.34	0.57	0.57
	Cuivre		Zinc		Fer		Manganèse		Nickel		Plomb		Cadmium		Chrome	
Station 2	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères
S2 MI 1	174.17	140.79	52.02	258.52	49.76	391.21	67.86	398.69	1.24	3.11	0.25	1.87	0.68	1.31	0.68	2.12
S2 MI 2	184.65	167.94	53.52	300.30	50.85	252.62	53.52	277.53	1.20	2.13	0.40	1.42	0.80	1.42	0.54	1.64
S2 MI 3	165.08	130.89	49.84	271.63	56.07	1878.89	56.07	287.11	< Id	4.93	< Id	5.63	1.56	1.69	0.93	4.36
S2 MI 4	95.00	117.05	47.50	263.76	50.67	1673.12	66.50	257.34	< Id	4.01	< Id	1.60	0.63	1.60	0.32	2.41
S2 MI 5	157.34	109.02	50.47	259.30	56.41	383.89	56.41	208.69	< Id	2.34	< Id	2.34	1.48	1.25	0.59	1.71
S2 M2 1	221.19	176.99	59.55	276.76	62.39	396.48	39.70	166.58	0.68	1.74	0.37	3.47	0.28	1.30	0.28	1.74
S2 M2 2	132.64	156.96	53.77	346.96	60.94	426.47	46.60	200.33	2.22	1.03	0.72	6.20	0.36	1.86	0.36	1.96
S2 M2 3	132.64	133.97	53.77	455.51	57.36	476.22	50.19	282.56	< Id	2.44	< Id	2.44	0.36	1.46	0.36	2.07
S2 M2 4	135.19	154.85	51.15	339.15	62.12	428.45	36.54	241.30	< Id	2.85	< Id	6.65	0.37	2.00	0.37	1.62
S2 M2 5	120.68	118.44	59.05	275.54	66.76	250.04	35.95	185.89	< Id	2.47	< Id	2.47	0.26	1.40	0.26	1.65
S2 M3 1	181.56	203.95	46.44	371.41	59.11	232.94	54.89	355.31	1.44	2.15	0.63	4.29	0.42	2.15	0.42	1.93
S2 M3 2	134.49	147.71	53.37	276.96	51.24	179.87	49.10	0.00	1.07	2.38	0.30	1.79	0.43	1.13	1.71	1.91
S2 M3 3	121.21	135.84	52.41	308.97	55.69	336.50	62.24	274.35	< Id	2.66	< Id	2.66	0.33	1.51	2.95	2.40
S2 M3 4	158.33	156.00	45.24	376.00	63.33	259.00	45.24	257.00	< Id	3.00	< Id	1.00	1.81	2.50	3.17	2.30
S2 M3 5	136.67	143.60	46.67	310.78	56.67	942.64	66.67	310.04	< Id	3.68	< Id	3.68	0.33	1.77	1.33	3.09
moyenne	150.06	146.27	51.65	312.77	57.29	567.22	52.50	246.85	1.31	2.73	0.44	3.17	0.67	1.62	0.95	2.19
écart-type	31.80	24.75	4.21	55.88	5.18	523.39	10.55	91.95	0.51	0.95	0.19	1.79	0.52	0.38	0.95	0.72
	Cuivre		Zinc		Fer		Manganèse		Nickel		Plomb		Cadmium		Chrome	
Témoins	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères
1	194.42	141.23	55.23	274.19	57.44	162.40	44.19	243.83	1.46	1.38	0.18	0.17	0.88	0.60	1.10	1.75
2	192.44	122.88	48.72	238.36	58.46	183.58	38.97	216.16	2.00	1.97	0.10	0.13	0.73	0.54	0.73	1.88
3	119.36	122.02	41.41	194.46	58.46	195.01	21.92	224.55	0.31	1.67	0.20	0.17	1.46	0.61	1.22	1.56
4	193.49	163.10	48.81	246.08	59.27	243.22	26.15	429.22	1.09	1.72	< Id	< Id	0.52	0.69	1.39	2.06
5	282.98	140.12	58.62	258.38	64.68	212.42	42.45	420.35	< Id	1.12	< Id	< Id	0.81	0.67	0.40	1.79
moyenne	196.54	137.87	50.56	242.29	59.66	199.33	34.74	306.82	1.22	1.57	0.16	0.16	0.88	0.62	0.97	1.81
écart-type	58.01	16.80	6.65	29.98	2.88	30.53	10.06	108.20	0.71	0.33	0.05	0.02	0.35	0.06	0.40	0.18
	Cuivre		Zinc		Fer		Manganèse		Nickel		Plomb		Cadmium		Chrome	
H.a.a.	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères
H.a.a. 1	316.15	324.47	42.05	386.03	112.13	149.00	23.36	49.25	1.56	0.62	1.15	21.55	3.74	32.32	0.93	1.54
H.a.a. 2	216.29	172.19	48.99	279.74	95.60	169.25	26.29	20.57	1.19	1.76	1.02	14.69	1.67	31.85	0.84	1.00
H.a.a. 3	112.27	95.64	54.70	238.78	66.21	340.20	34.55	169.46	2.99	3.21	1.18	7.70	1.15	8.22	1.44	1.54
H.a.a. 4	332.85	350.26	48.54	192.17	131.75	206.87	26.35	29.97	1.39	0.59	1.86	8.23	4.16	40.96	0.14	0.88
H.a.a. 5	116.11	121.99	52.78	379.30	69.67	1335.61	42.22	89.74	1.14	3.51	2.05	16.83	1.48	13.95	0.21	2.87
H.a.a. 6	102.31	67.13	53.59	273.05	53.59	845.33	73.08	52.34	2.19	3.41	2.05	9.10	0.49	11.04	0.97	2.05
H.a.a. 7	136.41	160.09	58.46	575.28	68.21	256.85	43.85	119.63	4.87	1.76	1.90	19.35	0.49	16.54	1.46	2.11
H.a.a. 8	144.76	169.85	54.29	639.09	63.33	267.73	27.14	83.48	5.34	4.23	3.71	25.91	0.90	23.89	2.71	3.74
H.a.a. 9	172.73		51.82		86.36		69.09		6.56		2.42		1.73		3.45	
moyenne	183.32	182.70	51.69	370.43	82.98	446.35	40.66	76.81	3.03	2.39	1.93	15.42	1.76	22.35	1.35	1.97
écart-type	87.33	102.53	4.70	160.92	25.80	422.85	18.72	49.78	2.05	1.39	0.82	6.73	1.33	11.78	1.10	0.96

	Cuivre		Zinc		Fer		Manganèse		Nickel		Plomb		Cadmium		Chrome	
Station 3	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères
S3 MI 1	145.14	123.74	55.42	344.16	76.53	3076.51	68.61	439.50	1.48	10.82	0.45	13.52	1.85	1.96	3.96	6.09
S3 MI 2	185.96	151.81	52.55	340.85	76.81	1647.94	68.72	347.54	3.44	4.77	0.53	8.59	3.23	2.29	1.21	4.30
S3 MI 3	190.00	160.52	51.46	421.49	63.33	1973.16	59.38	518.68		5.46		8.74	0.40	2.95	0.79	3.49
S3 MI 4	120.49	126.07	50.98	255.70	69.51	356.03	74.15	316.07		2.66		5.33	0.46	1.69	1.39	1.78
S3 MI 5	197.31	139.15	51.15	382.68	65.77	1021.36	54.81	517.37		4.46		8.92	1.46	1.87	1.46	2.68
S3 M2 1	118.75	117.87	50.89	329.86	57.68	219.03	54.29	343.06	1.90	3.52	0.75	3.52	1.02	1.76	0.34	1.32
S3 M2 2	224.83	131.31	66.50	373.40	79.17	458.49	63.33	374.13	1.20	3.67	0.57	5.87	0.95	1.98	0.63	1.98
S3 M2 3	185.58	151.62	70.70	364.65	79.53	332.98	83.95	580.56	<ld	2.88	<ld	3.84	0.44	2.30	0.44	1.54
S3 M2 4	225.63	133.09	67.29	322.21	71.25	437.79	75.21	306.45	<ld	8.76	<ld	8.76	0.40	1.66	0.40	5.78
S3 M2 5	236.60	165.18	57.36	369.50	60.94	311.26	50.19	356.13	<ld	1.91	<ld	3.82	<ld	2.01	0.72	1.81
S3 M3 1	160.39	119.80	51.82	284.68	56.75	264.07	56.75	260.20	1.11	3.22	0.20	1.93	<ld	1.55	0.25	1.42
S3 M3 2	177.12	135.11	57.97	333.56	244.75	873.16	61.19	406.18	2.45	3.38	0.64	4.22	0.32	1.86	0.32	2.70
S3 M3 3	168.08	111.03	54.81	293.91	69.42	1071.13	51.15	397.81	<ld	4.75	<ld	3.56	0.37	1.43	1.10	3.50
S3 M3 4	221.19	153.69	59.55	508.28	79.40	522.80	65.22	430.83	<ld	3.63	<ld	4.84	0.28	2.90	0.57	3.03
S3 M3 5	235.43	159.41	57.83	439.32	70.22	713.66	70.22	442.10	<ld	3.71	<ld	2.78	0.83	2.22	0.41	1.95
moyenne	186.17	138.63	57.08	357.62	81.40	885.29	63.81	402.44	1.93	4.51	0.52	5.88	0.92	2.03	0.93	2.89
écart-type	38.73	17.34	6.46	64.01	45.83	797.65	9.74	88.08	0.89	2.36	0.19	3.16	0.85	0.45	0.93	1.51
	Cuivre		Zinc		Fer		Manganèse		Nickel		Plomb		Cadmium		Chrome	
Station 4	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères
S4 MI 1	147.10	182.13	49.03	329.41	62.12	882.54	66.16	207.99	<ld	4.50	0.74	11.24	<ld	1.46	<ld	3.04
S4 MI 2	140.74	190.00	59.81	583.28	70.37	982.69	42.22	281.94	3.20	3.06	0.79	9.19	<ld	2.35	1.41	4.29
S4 MI 3	129.83	107.53	57.00	475.00	57.00	614.89	63.33	345.55	1.58	5.22	0.63	8.35	<ld	1.67	1.27	2.61
S4 MI 4	122.14	119.17	58.81	363.14	72.38	1016.33	54.29	305.80	1.58	4.50	0.836	7.87	<ld	1.57	1.81	2.70
S4 MI 5	140.60	155.45	49.40	301.31	57.00	387.68	60.80	289.80	1.60	3.84	<ld	4.80	<ld	1.63	1.14	2.11
S4 M2 1	141.49	142.50	44.47	417.81	64.68	262.70	72.77	354.80	1.54	3.88	0.69	3.88	<ld	2.13	0.40	2.13
S4 M2 2	145.53	137.51	52.55	367.40	64.68	715.91	64.68	366.35	2.79	3.15	0.69	4.20	<ld	1.47	0.40	2.73
S4 M2 3	88.05	112.75	50.98	412.36	60.24	1059.62	55.61	352.86	<ld	3.13	<ld	5.22	<ld	1.67	0.93	3.13
S4 M2 4	101.69	120.04	53.52	386.17	50.85	1444.55	82.96	278.48	<ld	4.12	<ld	4.12	<ld	1.78	1.34	4.12
S4 M2 5	149.51	118.65	49.84	391.62	43.61	1518.34	77.87	481.22	<ld	5.81	<ld	4.15	<ld	1.83	0.31	4.15
S4 M3 1	245.88	141.75	89.41	401.11	111.76	782.62	78.24	446.35	4.47	4.52	1.68	6.03	<ld	1.96	1.12	2.56
S4 M3 2	173.04	140.26	54.29	265.02	57.68	292.75	81.43	283.78	1.09	3.26	0.75	4.08	1.70	2.77	0.34	1.79
S4 M3 3	199.50	206.26	52.25	522.25	42.75	224.55	57.00	298.72	<ld	3.05	<ld	4.06	2.85	3.66	0.48	2.54
S4 M3 4	181.36	115.15	54.70	358.89	51.82	295.56	74.85	504.75	<ld	2.88	<ld	3.84	0.86	1.92	0.29	1.92
S4 M3 5	203.90	152.15	60.24	376.91	64.88	257.97	60.24	409.35	<ld	3.09	<ld	3.09	1.39	2.24	0.46	1.93
moyenne	154.02	142.75	55.75	396.78	62.12	715.91	66.16	347.18	2.23	3.87	0.85	5.61	1.70	2.01	0.84	2.78
écart-type	40.93	30.07	10.29	81.21	16.23	432.34	11.65	83.10	1.15	0.89	0.34	2.42	0.84	0.58	0.51	0.83
	Cuivre		Zinc		Fer		Manganèse		Nickel		Plomb		Cadmium		Chrome	
Autocltones	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères
M.c. 1	268.24	187.76	44.71	353.18	212.35	301.76	<ld	49.18	5.59	2.01	4.69	6.71	6.71	16.54	2.24	2.46
M.c. 2	497.62	332.50	36.19	522.50	162.86	252.12	<ld	49.33	2.17	1.57	5.97	23.75	10.86	24.48	1.81	2.74
M.c. 3	405.33	258.11	25.33	725.94	190.00	258.11	<ld	53.77	9.50	1.47	2.79	12.55	11.40	22.41	1.27	1.79
M.c. 4	498.75	237.50	23.75	270.54	237.50	181.74	<ld	30.98	11.16	1.61	4.99	4.13	4.75	14.66	11.88	2.07
moyenne	417.48	253.97	32.50	468.04	200.68	248.43		45.81	7.11	1.67	4.61	11.78	8.43	19.52	4.30	2.26
écart-type	108.70	60.11	9.84	201.39	31.82	49.66		10.12	4.03	0.24	1.33	8.72	3.23	4.67	5.07	0.42
C.v. 1	170.00	150.27	50.00	578.64	270.00	127.82	<ld	29.36	4.60	1.73	2.20	6.91	6.00	14.51	2.00	1.90
C.v. 2	199.50	195.38	19.00	516.23	85.50	84.25	<ld	30.47	2.09	1.79	0.95	1.79	2.85	12.01	1.90	0.72
C.v. 3	362.73	211.11	34.55	1032.53	241.82	165.05	<ld	38.38	7.95	1.92	2.42	7.68	3.45	16.12	1.73	2.11
C.v. 4	263.08	180.58	58.46	825.95	248.46	172.73	<ld	34.55	2.92	1.57	1.90	6.28	1.46	17.90	1.46	1.57
moyenne	248.83	184.33	40.50	738.33	211.44	137.46		33.19	4.39	1.75	1.87	5.66	3.44	15.14	1.77	1.57
écart-type	85.29	25.91	17.42	237.39	84.82	40.54		4.12	2.59	0.15	0.65	2.64	1.90	2.50	0.24	0.61

ANNEXE 10 :
Données brutes de croissance et de bioaccumulation des EM pour les escargots transférés sur le site d'Homécourt

	T 0		T 1		T 2		T 3		T 4	
escargot	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre	poids	diamètre
11 1	1.02	14.4	2.2	20	2.4	20	5.4	27.3	6.9	27.7
11 2	0.9	14.7	1.6	15	3.2	21	4.4	25.3	10.6	33.1
11 3	0.7	18.1	1.1	16	3.4	21	4.7	25.5	6.9	30.2
11 4	0.8	15.7	1.2	16.3	5.3	23	7.1	29.6	9.2	32.3
11 5	1	15.2	1.1	16.1	2.8	21	5.3	27.3	8.6	31
11 6	0.9	14.2	1.4	17	2.9	20.2	4.4	26.4	5.8	27.4
11 7	0.7	14.4	1	15.2	2.6	20.1	3.8	24	8.7	31.6
11 8	0.8	14	1.3	17.2	3.2	20.4	3.7	23.3	5.7	26.3
11 9	0.9	14.2	1.3	17.3	2.6	20.1	4.1	24	6.3	28.4
11 10	0.8	14.2								
moyenne	0.85	14.91	1.36	16.68	3.16	20.76	4.77	25.86	7.63	29.78
écart type	0.11	1.24	0.36	1.49	0.87	0.94	1.06	2.01	1.71	2.41
12 1	1.2	16.3	1.5	16.4	1.9	18.2	4.2	24.1	3.4	25
12 2	1	14.1	0.7	13	2.5	19.2	3.5	23.1	4	24.2
12 3	0.8	14.1	1.3	16.2	2.2	20.2	2.5	21.1	6.7	27
12 4	0.7	15.5	1.2	16	2	19.3	2.8	22	5.8	26.1
12 5	1.1	14	1.1	15.4	3.4	21.3	2.2	20	5.5	25.5
12 6	0.9	16	0.7	14.8	2.4	19.1	3.7	24	4.3	25.1
12 7	0.7	17.3	1.7	17	2.9	19.2	3	21.3	3.8	24.1
12 8	0.9	14	1	15.3	4.3	24.1	2.1	20.3	3	21.1
12 9	0.8	14.1	2.5	20	1.5	16.3	6.4	28.4	9.8	32.2
12 10	0.8	14.2	1.8	19.2	2.2	20.1	4.5	25		
moyenne	0.89	14.96	1.35	16.33	2.53	19.70	3.49	22.93	5.14	25.59
écart type	0.17	1.21	0.55	2.05	0.82	2.03	1.31	2.56	2.12	2.98
13 1	1.2	15.1	1.4	16	4.8	23.5	3.1	22.3	3.2	21.2
13 2	0.8	16	1.3	15.7	2.8	20.5	2.2	20	5.9	26.6
13 3	1.2	18.3	0.9	15	2.5	20.2	2.9	22	8.9	30.2
13 4	0.7	14.1	0.9	14	2.1	19.3	5.9	29	8	30
13 5	0.8	14	2.5	19.2	3	22.1	5.1	27.2	3.5	22.5
13 6	1.1	18	1.9	18	2.6	17	3.2	23	3	21.1
13 7	1.2	15.2	1.2	17	2.2	21	1.9	20	4.7	24
13 8	0.8	15.4	1.2	15.4	4.1	20	3.5	23.5	4.8	26
13 9	0.9	14.3	2.5	18.3	2.8	23.5	2.6	21	5.2	24
13 10	0.8	14.7	1.5	17	1.2	19.4	2.9	23	4.1	23.1
moyenne	0.95	15.51	1.53	16.56	2.81	20.65	3.33	23.10	5.13	24.87
écart type	0.20	1.52	0.59	1.63	1.01	2.00	1.25	2.93	1.98	3.28

	Cuivre		Zinc		Fer		Manganèse		Nickel		Plomb		Cadmium		Chrome	
	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères	pied	viscères
	156.00	73.03	46.00	220.20	111.00	549.13	29.00	444.80	< ld	2.20	< ld	5.49	< ld	1.21	< ld	2.21
	105.71	113.15	45.71	130.07	61.43	190.00	35.71	184.01	< ld	1.06	< ld	3.17	< ld	0.85	< ld	1.37
	85.22	106.36	51.69	211.76	69.85	243.66	30.74	558.40	< ld	0.97	< ld	4.83	< ld	1.02	< ld	1.33
	122.74	106.76	50.44	218.22	48.76	171.19	45.40	213.51	< ld	3.29	< ld	1.88	< ld	0.80	< ld	1.16
	121.25	94.51	48.75	165.30	36.25	261.79	26.25	225.56	< ld	2.31	< ld	3.29	< ld	0.69	< ld	2.01
M1	118.19	98.76	48.52	189.11	65.46	283.15	33.42	325.26		1.96		3.73		0.91		1.62
écart-type	25.99	15.88	2.65	39.93	28.47	153.28	7.53	166.60		0.97		1.44		0.20		0.46
	128.11	107.24	48.94	210.69	63.33	462.33	31.67	458.11	< ld	2.53	< ld	5.91	< ld	1.90	< ld	2.31
	183.21	118.75	50.89	198.69	59.38	209.12	33.93	221.86	< ld	1.74	< ld	1.74	< ld	2.09	< ld	1.07
	121.48	114.68	59.18	232.79	62.30	369.73	34.26	697.52	< ld	2.57	< ld	2.57	< ld	1.71	< ld	1.71
	117.75	131.19	58.87	345.62	80.28	195.43	40.14	328.43	< ld	1.81	< ld	2.71	< ld	1.99	< ld	1.15
	139.15	72.68	50.85	195.15	93.66	480.72	34.79	403.46	< ld	4.58	< ld	1.72	< ld	1.32	< ld	2.88
M2	137.94	108.91	53.75	236.59	71.79	343.47	34.96	421.88		2.65		2.93		1.80		1.82
écart-type	26.58	22.03	4.89	62.70	14.72	135.67	3.13	177.74		1.15		1.73		0.30		0.78
	137.65	110.25	42.65	219.44	48.47	140.23	25.20	241.38	< ld	3.21	< ld	0.54	< ld	1.18	< ld	1.39
	123.40	81.79	45.05	244.36	56.80	327.17	23.51	429.28	< ld	2.03	< ld	1.52	< ld	1.68	< ld	2.29
	142.50	78.89	48.86	177.97	71.93	195.77	33.93	260.71	< ld	1.44	< ld	0.96	< ld	0.96	< ld	1.33
	100.70	89.13	43.70	199.61	58.90	512.36	34.20	318.09	< ld	1.60	< ld	2.67	< ld	1.07	< ld	3.37
	153.92	114.32	52.91	246.36	79.37	239.11	28.86	204.49	< ld	2.42	< ld	0.00	< ld	1.37	< ld	1.27
M3	131.64	94.88	46.63	217.55	63.09	282.93	29.14	290.79		2.14		1.14		1.25		1.93
écart-type	20.47	16.39	4.22	29.33	12.39	145.32	4.90	87.63		0.71		1.02		0.28		0.91
moyenne	129.25	100.85	49.63	214.42	66.78	303.18	32.51	345.97		2.25		2.60		1.32		1.79
écart-type	24.24	18.03	4.86	47.25	18.75	137.39	5.69	149.83		0.94		1.73		0.45		0.70
<i>témoins</i>	160.06	70.39	79.25	143.38	165.48	194.5	44.46	238.13	< ld	0.35	< ld	< ld	< ld	0.52	< ld	0.59
<i>écart-type</i>	79.12	21.82	31.77	38.27	83.34	65.14	21.06	98.88	< ld	0.16	< ld	< ld	< ld	0.08	< ld	0.51
<i>autochtones</i>	180.92	116.95	51.62	321.04	163.68	269.33	< ld	100.94	< ld	< ld	< ld	11.47	< ld	4.52	< ld	< ld
<i>écart-type</i>	69.18	31.41	23.07	83.05	123.04	112.68	< ld	31.29	< ld	< ld	< ld	3.66	< ld	2.68	< ld	< ld