THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE
UFR SCIENCES ET TECHNIQUES

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Franche-Comté

Spécialité : Sciences de la Vie
Ecole Doctorale Homme, Santé, Environnement

ANNEE 2002 N°916

Par

Renaud SCHEIFLER

Né le 29/12/1973 à Besançon (Doubs)

Evaluation de la biodisponibilité et des transferts de polluants métalliques et organiques dans des réseaux trophiques "sols – plantes – invertébrés"

LABORATOIRE DE BIOLOGIE ET ECOPHYSIOLOGIE (EA MR 3184 USC INRA)
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE L'ENVIRONNEMENT

Soutenue le 28 Juin 2002 à Besançon devant la commission d'examen

Jean-Charles MUNCH (Professeur, GSF Neuherberg)	Rapporteur
Jean-Claude PIHAN (Professeur, Université de Metz)	Rapporteur
Pierre-Marie BADOT (Professeur, Université de Franche-Comté)	Directeur de thèse
Annette de VAUFLEURY (MCF, Université de Franche-Comté)	Co-Directrice
Isabelle FEIX (Dr, Chef du Département Agriculture et Alimentation, ADEME)	Examinateur
Patrick GIRAUDOUX (Professeur, Université de Franche-Comté)	Examinateur
Jean-Louis MOREL (Professeur, ENSAIA/INRA Vandoeuvre-lès-Nancy)	Examinateur
Jean-Louis RIVIERE (Directeur de Recherches, INRA Versailles)	Examinateur

2,4-D : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique

2,4 DCP : dichlorophénol

ADN : acide désoxyribonucléique

$CaCl_2$: chlorure de calcium

Cd : cadmium

Cu : cuivre

CEC : capacité d'échange cationique

DDD : dichloro-diphényl-dichloréthane

DDT : dichloro-diphényl-trichloréthane

DTPA : acide éthylène triamine pentaacétique

EDTA : acide éthylène diamine tetraacétique

ETM : élément trace métallique

FBA(s) : facteur(s) de bioaccumulation

HPLC : high performance liquid chromatography, chromatographie liquide à haute performance

ISO : International standardisation organisation

Kp : coefficient de partage

LC50 : concentration léthale à 50%

M : molaire

Ni : Nickel

NOEC : No Observed Effect Concentration, concentration sans effet observé

OCDE : Organisation du Commerce et du Développement Economique

Pb : plomb

PCB(s) : polychloro-biphényl(s)

PCDD(s) : polychloro-dibenzo-dioxine(s)

PCP-Na : pentachlorophénate de sodium

POP(s) : polluant(s) organique(s) persistant(s)

Zn : zinc

Pour bien appréhender l'impact des pollutions sur les écosystèmes, la biodisponibilité et les transferts des polluants sont des phénomènes très importants à considérer. Depuis longtemps, je pense qu'une analogie existe pour le doctorant dans le milieu de la recherche. En effet, l'épanouissement personnel du doctorant et la réussite des travaux entrepris au cours d'une thèse dépendent très largement de la (bio)disponibilité de l'entourage du candidat (entourage scientifique, bien sûr, mais également familial et amical) et des transferts de savoir, de compétences et d'expériences de l'entourage vers le thésard.

Je suis donc très heureux d'exprimer ma profonde gratitude aux nombreuses personnes qui ont su se rendre (bio)disponibles et transférer vers moi leurs connaissances. Sans elles, ce travail n'aurait jamais été possible.

Mes premiers remerciements vont au Docteur Annette de Vaufleury et au Professeur Pierre-Marie Badot, respectivement co-directrice et directeur de cette thèse. Annette a été la championne toute catégorie de la (bio)disponibilité. Elle a su, avec enthousiasme, compétence et amitié, guider mes premiers pas dans la recherche. Je lui suis particulièrement reconnaissant de m'avoir assuré de son soutien total dans les moments difficiles. Le Professeur Badot, grâce à une capacité de (bio)accumulation du travail hors du commun, a su se rendre (bio)disponible à chaque fois que je lui ai demandé et m'a fait profiter de sa grande expérience dans de nombreux domaines (scientifique mais également administratif ou relations humaines !). Il m'a par ailleurs accordé une confiance totale sur certains des projets que j'ai proposés (encadrement d'étudiants sur des sujets… délicats, collaborations diverses,…). Je leur témoigne ici de mon plus profond respect et de mon amitié.

Je souhaite également remercier les Professeurs Gomot et Giraudoux, qui ont étroitement suivi mon parcours tout au long de ce travail. Le Professeur Gomot, outre ses connaissances encyclopédiques de la biologie et sa très grande expérience de la recherche, a montré un enthousiasme de tous les instants pour mes travaux. Sa passion sans faille pour les mollusques gastéropodes terrestres est communicative !

C'est peut-être autour des tables du restaurant universitaire que le Professeur Giraudoux a le plus contribué à cette thèse et à ma formation. Au cours de ces très nombreuses discussions, j'ai énormément appris de ses connaissances, de son enthousiasme, de son esprit d'analyse critique et constructif et de son attachement au travail d'équipe. Je le remercie en outre d'avoir participé au Comité de pilotage et d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse malgré un emploi du temps (sur)chargé. Qu'ils trouvent tous deux dans ces lignes l'expression de mon admiration et de mes remerciements.

Je souhaite vivement remercier le Professeur Jean-Claude PIHAN de l'Université de Metz qui a accepté de juger cette thèse en tant que rapporteur et qui est, en France, un des précurseurs de l'utilisation des escargots en écotoxicologie. Notre groupe de travail lui doit beaucoup et les échanges entre son équipe et Besançon ont toujours été fréquents et fructueux.

Je remercie chaleureusement le Professeur Jean-Charles Munch, du Department of Soil Ecology du GSF de Neuherberg (Allemagne) pour au moins trois raisons. D'une part, le Professeur Munch a accepté de m'accueillir pendant plusieurs mois dans son laboratoire pour une très intéressante collaboration, au cours de laquelle j'ai beaucoup appris et ai pu perfectionner mon Anglais (et, dans une (bien) moindre mesure, mon Allemand…). D'autre part, il m'a fait l'honneur de juger de l'intérêt scientifique de ce travail en acceptant d'en être le deuxième rapporteur. Enfin, c'est grâce et avec lui que j'ai découvert l'"Oktoberfest" à Munich, ce qui restera un souvenir sympathique (et arrosé…) de ma collaboration outre-Rhin. Un de ses collaborateurs, le Dr Reiner Schroll, m'a encadré avec compétence et humour dans mes travaux quotidiens au GSF. De même, j'exprime ma reconnaissance aux Drs Ulrike Dörfler et Wolfram Hammel, à Sabine Kuehn (francophone !!!), Jürgen Ruoss et aux techniciens du GSF (Jana et Christophe) qui m'ont beaucoup aidé.

Je suis extrêmement reconnaissant au Professeur Jean-Louis Morel de m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'ENSAIA/INRA de Vandoeuvre-les-Nancy pour une non moins intéressante collaboration. Nous lui devons l'idée très innovante d'adapter la technique de dilution isotopique à l'évaluation de la zoodisponibilité des métaux. J'ai beaucoup apprécié son encadrement scientifique et ses grandes qualités humaines lors de mes séjours en Lorraine. Il me fait également l'honneur de participer au jury de cette thèse. Je dois aussi la réussite de cette collaboration à l'encadrement et à l'amitié des Docteurs Christophe Schwartz (qui a été un des membres du Comité de pilotage) et Guillaume Echevarria, à l'aide inestimable de Stamatia Massoura (lovely Tina !), de Stéphane et Richard. Un très grand merci au Docteur Jean-Claude Fardeau, un des pionniers de la technique de dilution isotopique (TDI), qui a su avec l'humour qui le caractérise, éclairer ce que la TDI avait encore de nébuleux pour moi lors de la conception de l'article. Merci à tous les autres membres du laboratoire, que je ne peux citer ici.

Je tiens également à remercier chaleureusement le Docteur Isabelle Feix, Chef de Département à l'ADEME et superviseur de ma thèse, qui a régulièrement suivi l'évolution de mes travaux et avec qui nous avons eu de fructueuses discussions au cours de diverses réunions (Comité de pilotage, congrès,..). Je la

remercie beaucoup d'avoir accepté de participer à mon jury de thèse, bien qu'elle ait récemment été appelée à d'autres fonctions au sein de l'ADEME.

Mes sincères remerciements vont également au Docteur Jean-Louis Rivière, de l'Unité de Phytopharmacie et Médiateurs Chimiques de l'INRA de Versailles, qui a participé au Comité de pilotage et me fait l'honneur de participer au jury de cette thèse. Il a su, dès notre première rencontre tout au début de mon travail, suivre avec enthousiasme mes travaux, faire d'intéressantes suggestions et proposer des personnes ressources, notamment pour les travaux sur *Chrysocarabus splendens*.

Les Docteurs Jean-Michel Carnus et Mohammed BenBrahim (Momo pour les intimes), de l'Unité de Recherches Forestières (URF) de l'INRA de Pierroton (Landes) ont été nos partenaires privilégiés dans la collaboration entre nos deux laboratoires. Je les remercie vivement d'avoir accueilli avec enthousiasme notre proposition d'insérer de l'"escargot" dans leurs expériences sur les épandages de boues de station d'épuration. J'adresse mes remerciements et mes pensées amicales au Docteur Pierre Delattre, qui a suscité cette collaboration.

Je remercie beaucoup Jean-Yves Robert et Frédéric Maillot du Muséum de Besançon, qui nous ont fourni les individus de *C. splendens* nécessaires à la réalisation de notre élevage. Merci aussi pour les conseils éclairés et la bibliographie sur les techniques d'élevage des carabes et pour leur intérêt pour mes travaux. Merci à Stéphane Garnier, de l'Equipe Biosystématique et Ecologie du Centre Biologie et Gestion des Populations de l'INRA de Montpellier, pour nous avoir fourni d'autres individus de *C. splendens*.

Le Professeur Berthelot, du Laboratoire de Pharmacologie et de Nutrition Préventive Expérimentale de l'Université de Franche-Comté, m'a accueilli dans son laboratoire, d'une part pour initier une collaboration sur les métallothionéines et, d'autre part, pour réaliser des dosages en spectrométrie d'absorption atomique (SAA) à un moment où nos propres moyens techniques étaient indisponibles. Je lui en suis très reconnaissant et le remercie vivement. Mes remerciements vont également au Docteur Sylvie Bobillier-Chaumont (pour qui les métallothionéines n'ont plus de secret), à Frédérique Groubatch et à Sophie Robin, pour leur accueil et leur aide pour le dosage des métallothionéines et les dosages en SAA.

Ce travail a bénéficié à un moment ou à un autre des compétences techniques de Nadia Crini, Marielle Francesci, Jean-Claude Lambert, Christiane Lovy, Dominique Rieffel et Marie-Laure Toussaint. Ils ont su m'aider avec efficacité et gentillesse. J'ai également bénéficié de l'aide des secrétaires du laboratoire (Brigitte Jolibois, Armelle Courtois et Marie-Claude Tachin), notamment pour m'éclairer lorsque j'étais plongé dans les arcanes administratifs... Je sais devoir beaucoup au Docteur James Dat qui a relu mes articles pour éviter que j'égratigne trop la langue de Shakespeare tout en me donnant un avis très constructif sur leur fond scientifique. J'ai également reçu un soutien sans faille du Docteur Nadine Bernard, notamment au moment de la rédaction de la réponse à l'appel d'offre PNETOX et pour la "manip. Merles". Grand merci, Nadine ! Merci pour leur aide dans cette même "manip. Merles" à Céline Romain et Pascal Flicoteaux, à Jean François et à Pierre Piotte. J'ai une pensée amicale pour l'ensemble des membres du laboratoire avec qui mes rapports ont été amicaux et enrichissants. Que tous trouvent ici l'expression de ma gratitude.

Deux Professeurs ont beaucoup compté lors de mes études et ont sans nul doute orienté les choix qui m'ont mené à cette thèse. Le Professeur Jean-Pierre Perney a été mon enseignant de Biologie au lycée. Ses qualités humaines et sa passion pour la biologie et la géologie m'ont engagé à choisir des études universitaires en biologie. Puis, le Professeur Claude-Roland Marchand, également animé par cette passion naturaliste, a encadré une initiation à la recherche, qui m'a donné envie d'un DEA et d'une thèse. Même dans les moments difficiles, je n'ai jamais regretté ces choix et je tenais ici à les remercier et à leur dire mon admiration.

Par un heureux hasard, j'ai commencé cette thèse en même temps que les Docteurs (à l'époque, ils ne l'étaient encore pas !) Michaël Cœurdassier et Francis Raoul. Ils ont tellement contribué à cette thèse de toutes les manières possibles qu'il m'est difficile de leur exprimer plus complètement mes remerciements que par ce simple mot : Merci. J'adresse le même "Merci" à Thomas Déforêt (futur Docteur !), qui, bien que géographiquement plus éloigné, a représenté la même présence amicale et le même soutien au cours de ce travail. Merci également à toutes les personnes qui m'ont supporté (dans tous les sens du terme...) amicalement : Patrick, Céline, Dom., JCL, Sophie, Daniel à thèque, Philippe, les thésards du labo, les copains du GNFC, Benoît (merci pour les références dans Endnote), Marc, Grand Séb., tous ceux que je ne peux citer nommément et/ou que je pourrais oublier à l'instant où j'écris.

Il est de même difficile de remercier à la hauteur de leur aide et de leur soutien ma famille, mes parents et mes proches (dont Lcf). Je leur exprime mes plus profonds remerciements et leur dédie cette thèse. J'ai une pensée toute particulière pour mes grands-parents, mes parents, mon frère Gautier (et Manu !) et pour ma femme, Audrey, qui me supporte (là aussi dans tous les sens du terme...) depuis 9 ans.

INTRODUCTION **1**

PREMIERE PARTIE : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE **5**

I Contexte général **6**

II Le concept de biodisponibilité **8**

III Evaluation de la biodisponibilité : etat des connaissances et lacunes **10**

III.1 Biodisponibilité des ETM 10

III.1.1 Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des ETM 10

III.1.1.1 Extractions chimiques 10
III.1.1.1.1 Principe 10
III.1.1.1.2 Résultats obtenus 11
III.1.1.1.3 Intérêts et limites 15

III.1.1.2 La théorie de la partition à l'équilibre 16
III.1.1.2.1 Principe 16
III.1.1.2.2 Résultats obtenus 16
III.1.1.2.3 Intérêts et limites 17

III.1.1.3 Techniques de dilution isotopique 18
III.1.1.3.1 Principe 18
III.1.1.3.2 Résultats obtenus 20
III.1.1.3.3 Intérêts et limites 21

Résumé *22*

III.1.2 Facteurs affectant la biodisponibilité des ETM 23

III.1.2.1 Facteurs édaphiques 23
III.1.2.1.1 Le pH 23
III.1.2.1.2 Teneur et nature de la matière organique (MO) et des minéraux argileux (MA), capacité d'échange cationique (CEC) 24
III.1.2.1.3 Humidité et température du sol 25
III.1.2.1.4 Potentiel d'oxydo-réduction, Eh 25

III.1.2.2 Autres facteurs 26
III.1.2.2.1 "Age" de la contamination 26

III.1.2.2.2 Interactions entre ETM 27

Résumé *28*

III.2 Biodisponibilité des polluants organiques 29

III.2.1 Devenir des polluants organiques dans les sols 29

III.2.2 Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des polluants organiques 31

III.2.2.1 Techniques micro- et macrobiologiques 32
III.2.2.2 Extractions chimiques 32
III.2.2.3 La théorie de partition à l'équilibre 33

Résumé *35*

IV Devenir des polluants dans les organismes 36

IV.1 Devenir des ETM 36

IV.1.1 Devenir des ETM dans les plantes 36

IV.1.2 Devenir des ETM dans les invertébrés 37

IV.1.2.1 Les protéines de liaison 37
IV.1.2.2 Les granules 38
IV.1.2.3 Cas des mollusques gastéropodes 39

IV.2 Devenir des polluants organiques 40

V Transferts des polluants dans les réseaux trophiques 42

V.1 Transfert des ETM 42

V.1.1 Etudes *in situ* 42

V.1.1.1 Contamination des sols par les ETM 43
V.1.1.2 Transferts des ETM vers les plantes 43
V.1.1.3 Transfert des ETM vers les organismes animaux 44

V.1.2 Etudes expérimentales en laboratoire 46

V.1.2.1 Part respective des sources de transfert des ETM vers les organismes 46
V.1.2.2 Importance de la physiologie digestive dans la bioaccumulation des ETM ...47
V.1.2.3 Importance des formes de stockage des ETM.....47
V.1.2.4 Transfert des ETM dans les relations proie – prédateur.....48

V.2 Transfert des polluants organiques.....50

V.2.1 Etudes *in situ*.....51

V.2.2 Etudes expérimentales en laboratoire.....52

V.2.2.1 Part respective des sources de transfert de polluants organiques vers les organismes.....52
V.2.2.2 Transfert des polluants organiques dans les relations proie – prédateur 52
V.2.2.3 Transfert avec détermination des métabolites 53

Résumé *54*

Objectifs **55**

DEUXIEME PARTIE : RESULTATS.....**56**

SECTION I. Le cadmium "non-disponible" d'un sol est biodisponible pour les escargots : preuve expérimentale par la technique de dilution isotopique. 56

SECTION II. Transfert du cadmium depuis des plantes et des farines végétales vers l'escargot *Helix aspersa* : bioaccumulation et effets. 71

SECTION III. Transfert et effets du cadmium dans une chaîne alimentaire expérimentale impliquant l'escargot *Helix aspersa* et le coléoptère carabidé *Chrysocarabus splendens*. 78

SECTION IV. Transfert d'éléments trace métalliques (Cd, Cu, Ni, Pb et Zn) dans une chaîne alimentaire "sol – plante – invertébré" en microcosme. 88

SECTION V. Biodisponibilité, transfert et dégradation de l'isoproturon (herbicide phénylurée) marquée au ^{14}C dans une chaîne alimentaire "sol – plante – invertébré". 114

SECTION VI. Transfert de Cd, Cu, Ni, Pb et Zn depuis des sols forestiers amendés par des boues de station d'épuration vers l'escargot *Helix aspersa* : étude en microcosmes *in situ*. 130

SECTION VII. TABLEAU DE SYNTHESE DES RESULTATS 139

TROISIEME PARTIE: DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 142

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 153

ANNEXES 171

Annexe 1. Présentation générale de l'escargot *Helix aspersa* et méthodes d'élevage et de production. 171

Annexe 2. Présentation générale du coléoptère carabidé *Chrysocarabus splendens* et méthodes d'élevage et de production. 177

Annexe 3. Tableaux de synthèse bibliographique portant sur l'évaluation de la disponibilité environnementale et/ou de la biodisponibilité. Résultats classés par technique ou approche utilisée. 181

Annexe 3. a. Techniques d'extractions chimiques simples ou multiples 181
Annexe 3. b. Etudes de la solution du sol 184
Annexe 3. c. Travaux basés sur la théorie de partition à l'équilibre 186
Annexe 3. d. Techniques de dilution isotopique 188
Annexe 3. e. Facteurs influençant la biodisponibilité 190

Publications

1. Scheifler R., Gomot-de Vaufleury A., Toussaint M.-L. & Badot P.-M. 2002. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* 48: 571-579.
2. Scheifler R., Gomot-de Vaufleury A. & 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: 148-153.
3. Scheifler R., Schwartz C., Echevarria G., Gomot-de Vaufleury A., Badot P.-M. & Morel J.-L. "Non available" soil cadmium is bioavailable to snail: evidence from isotopic dilution technique. Sous presse dans la revue *Environmental Science and Technology*.
4. Scheifler R., Ben Brahim M., Gomot-de Vaufleury A., Carnus J.-M. and Badot P.-M. 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. Sous presse dans la revue *Environmental Pollution*.

Communications orales

1. Scheifler R., Gomot-de Vaufleury A., Toussaint M.-L., Badot P.-M. Experimental terrestrial food chain for assessment of cadmium transfer: primary consumer (snail)/predator (Carabid beetle). Global Environmental Issues in the 21st Century: Problems, Causes and Solutions, 3rd SETAC World Congress, May 21 – 25, 2000, Brighton, UK.
2. Scheifler R., Gomot-de Vaufleury A., Schroll R., Munch J.-C. & Badot P.-M. Etude *in situ* du transfert sol / plante / escargot d'un herbicide marqué au ^{14}C (l'isoproturon) par utilisation de microcosmes. Forum de l'Ecole Doctorale Homme, Environnement, Santé, 22 – 23 juin 2000, Besançon, France.
3. Scheifler R., Massoura S., Schwartz C., Echevarria G., Gomot-de Vaufleury A., Badot P.-M. et Morel J.-L. Biodisponibilité du cadmium (Cd) d'un sol pour *l'escargot Helix aspersa* : adaptation d'une technique isotopique. Forum de l'Ecole Doctorale Homme, Environnement, Santé, 14 – 15 juin 2001, Dijon, France.
4. Scheifler R., BenBrahim M., Gomot-de Vaufleury, Carnus J.-M. et Badot P.-M. Epandage de boues de station d'épuration en conditions forestières: évaluation des transferts de Cd, Cu, Ni, Pb et Zn vers l'escargot *Helix aspersa* exposé en microcosmes *in situ*. Restitution A.I.P. "AGREDE" (AGRiculture et Epandage de DEchets urbains et agro-industriels), 21 – 22 mars 2002, Paris, France.

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire de Biologie et Ecophysiologie (LBE) de l'Université de Franche-Comté (EA 3184 MR USC INRA). La thématique générale du LBE concerne l'étude des réponses des organismes aux variations des facteurs de l'environnement, et ce, aux différents niveaux d'organisation biologique. L'approche transversale sur laquelle repose ce travail de thèse a été rendue possible par le caractère transdisciplinaire de l'équipe. Cette thèse s'inscrit également dans le programme "Ecotoxicité des sols et des déchets" de l'Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), qui a co-financé ce travail avec le Conseil Régional de Franche-Comté (allocation de recherche).

Les activités humaines ont des effets de plus en plus importants sur l'environnement et sur la santé. Des problèmes graves ont accompagné la sédentarisation des populations humaines, le développement des sociétés et les progrès de la technologie. Ces problèmes se sont accentués avec l'essor de l'industrie pour devenir très préoccupants de nos jours à l'échelle planétaire. Une succession d'accidents survenus dans les années 50 a conduit l'opinion publique à prendre conscience des problèmes liés à la pollution (Forbes et Forbes 1994). Parmi les accidents invoqués par ces auteurs, figure la catastrophe de Minamata (Japon), qui est un exemple du phénomène de **transfert de polluant dans les chaînes alimentaires**. Des quantités importantes de mercure ont été libérées par une papeterie industrielle dans les eaux de la baie de Minamata. Ce métal a été méthylé par des bactéries présentes dans les sédiments en un composé organométallique, le méthyl-mercure. Sous cette forme extrêmement mobile et toxique, le mercure a été transféré dans la chaîne alimentaire pour atteindre des concentrations très élevées dans la faune pisciaire. La population locale, dont le poisson constituait une part prépondérante de l'alimentation, a été fortement intoxiquée par le mercure ; plus de cent personnes sont décédées et un grand nombre a souffert de graves troubles et infirmités.

Cet exemple spectaculaire et dramatique des répercussions de la pollution de l'environnement repose sur le phénomène de transfert des polluants dans les réseaux trophiques, et plus particulièrement sur le phénomène de **biomagnification**. Ce phénomène correspond à l'augmentation de la concentration d'un polluant au fur et à mesure de son transfert dans les maillons d'une chaîne alimentaire (Janssen *et al.* 1993). D'autres cas de biomagnification, d'ampleur internationale (impliquant par exemple le DDT, un insecticide organochloré), ont affecté de nombreuses populations animales et ont été très médiatisés dans les années 50 – 70. Ils ont contribué au développement d'une nouvelle discipline à l'interface de l'écologie, de la chimie et de la toxicologie : l'**écotoxicologie**, dont l'objectif est d'étudier le devenir des polluants dans l'environnement et leurs conséquences écologiques (Calow 1998).

Les **polluants organiques** les plus persistants et toxiques (comme le DDT), susceptibles d'être transférés dans les chaînes alimentaires et de causer des mortalités importantes, ont progressivement été interdits (à partir du début des années 70 dans les pays industrialisés pour le DDT, Ramade 1998). Cependant, le nombre de composés organiques produits, commercialisés et utilisés chaque année augmente rapidement et les données écotoxicologiques ne sont pas disponibles pour un grand nombre d'entre eux (Forbes et Forbes 1994). Les instances internationales ont établi des listes de substances à étudier en priorité (CEE 2000) mais, outre les difficultés liées au grand nombre de composés,

l'évaluation de leur toxicité par transfert dans les réseaux trophiques se heurte au manque de méthodologies et d'outils standardisés. La mortalité de la faune non-cible (oiseaux et mammifères) liée à l'utilisation de la bromadiolone, un anticoagulant rodenticide employé dans la lutte contre les pullulations de campagnols prairiaux, en est un exemple récent (Berny *et al.* 1997).

Le transfert de polluants dans les réseaux trophiques ne se limite pas aux composés organiques. L'augmentation des concentrations en **éléments trace métalliques (ETM)** dans les sols – principalement due aux activités humaines (Nriagu et Pacyna 1988) – suscite de nombreuses études sur les risques de leurs transferts. Ces risques paraissent d'autant plus grands que les ETM, contrairement à la plupart des composés organiques, ne sont pas dégradés dans l'environnement. Les zones concernées par les pollutions métalliques sont très diverses : bords de voies routières, périmètres (parfois étendus sur plusieurs dizaines de km dans la direction des vents dominants) de zones industrielles ou minières, zones agricoles ou forestières d'épandages de boues de station d'épuration,...

Le problème des transferts des polluants dépasse donc largement le cadre scientifique pour devenir une préoccupation sociale et politique de première importance, reflétée par la pression accrue du grand public pour préserver la qualité de l'environnement et des produits de l'agriculture. La quantification et la modélisation des transferts et des effets des polluants dans les réseaux trophiques constituent un des enjeux majeurs de l'écotoxicologie moderne.

Malgré l'identification précoce des transferts des polluants dans les réseaux trophiques, les concepts et les méthodologies à utiliser pour les étudier sont encore discutées. Les connaissances scientifiques restent fragmentaires, parfois contradictoires, et suscitent encore de vives polémiques, notamment en ce qui concerne le phénomène de biomagnification (Beyer 1986; Fagerström 1991; Janssen *et al.* 1993; Laskowski 1991; Moriarty et Walker 1987; Pokarzhevskii et Van Straalen 1996; Van Straalen et Ernst 1991).

Les difficultés inhérentes aux études de transfert sont à l'origine de la variabilité des résultats obtenus et d'erreurs dans leurs interprétations. Une de ces difficultés réside dans l'**estimation de la biodisponibilité**, qui caractérise la capacité d'un polluant à être absorbé par un organisme. Il est maintenant établi que la concentration totale d'un polluant mesurée dans un compartiment d'un écosystème ne permet de prévoir de manière satisfaisante, ni sa concentration dans les organismes exposés, ni ses effets. La fraction du contaminant qui peut être absorbée par un organisme constitue la fraction biodisponible, variable en fonction du polluant, de l'organisme et du compartiment considéré. De nombreux travaux sur les transferts de polluants ont ignoré l'importance de ce paramètre, ce qui a conduit à des résultats *a priori* contradictoires avec les travaux qui l'ont pris en compte. A l'heure actuelle,

la prévision de la biodisponibilité d'un polluant pour un organisme est parfois satisfaisante mais la généralisation à d'autres polluants et/ou d'autres organismes (même taxonomiquement proches) reste le plus souvent impossible (Peijnenburg *et al.* 1999a).

L'interprétation des résultats peut également être faussée quand le site et la forme de stockage des polluants dans les organismes ne sont pas pris en compte. Le transfert entre des organismes de deux niveaux trophiques différents devrait être évalué sur la base de la quantité de polluant stocké dans le (ou les) organe(s) réellement ingérés par l'organisme consommateur. La forme de stockage du polluant devrait également être considérée dans la mesure où elle conditionne la biodisponibilité de la substance contenue dans les tissus consommés (Rivière 1998).

Enfin, le concept de biomagnification a été exagérément utilisé pour expliquer (et/ou prévoir) les concentrations en polluants dans les organismes en fonction de leur position trophique. Le recours systématique à ce concept a conduit à des interprétations erronées des résultats obtenus lors d'études des transferts de polluants organiques (Moriarty et Walker 1987) et métalliques (Beyer 1986).

Dans ce contexte, les études entreprises dans ce travail de thèse visent à une meilleure compréhension des phénomènes qui conditionnent la biodisponibilité, les transferts et les effets des polluants dans des réseaux trophiques. Nos travaux ont été organisés, en fonction de la complexité croissante des systèmes étudiés, selon trois approches complémentaires :

- des études en laboratoire de la biodisponibilité et/ou des transferts de polluants entre deux compartiments d'un réseau trophique,
- des études en laboratoire et en conditions semi-naturelles de la biodisponibilité et/ou des transferts entre trois compartiments d'un réseau trophique,
- une étude *in situ* intégrant les transferts sol – plante – animal.

Les polluants étudiés appartiennent à deux grandes familles : (1) les ETM avec principalement le cadmium (Cd) mais également le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn) et (2) les composés organiques avec un herbicide de la famille des phénylurées, l'isoproturon.

Les réseaux trophiques choisis comprennent des sols agricoles (ainsi qu'un sol forestier) présentant différents niveaux de contamination, des producteurs primaires (trois espèces de plantes: la laitue *Lactuca sativa*, le colza *Brassica napus* et le maïs *Zea mays*), un consommateur primaire (l'escargot *Helix aspersa*) et un prédateur (le carabe *Chrysocarabus splendens*).

Le modèle central de cette thèse est l'escargot Petit Gris *H. aspersa.* Connu pour ses capacités à accumuler les ETM à des concentrations importantes dans ses tissus, *H. aspersa* est utilisé fréquemment dans les travaux d'écotoxicologie, que ce soit sur le terrain

dans des études de bioindication active (Beeby et Eaves 1983; Berger et Dallinger 1993; Coughtrey et Martin 1977) ou passive (Pihan et Gomot-deVaufleury 2000), ou au laboratoire (Gomot 1997; Gomot-de Vaufleury et Pihan 2002; Laskowski et Hopkin 1996b). Herbivore et détritivore, ce mollusque gastéropode pulmoné est exposé aux pollutions des sols, des végétaux et de l'atmosphère et représente de ce fait un modèle intégrateur complémentaire des organismes sous-terrains comme les annélides ou les organismes à régime strictement herbivore ou détritivore. Peut-être parce qu'il entre dans le régime alimentaire de l'Homme, les études portant sur sa biologie et son écologie sont nombreuses et en font un des invertébrés les mieux connus, ce qui représente un avantage essentiel pour des études écotoxicologiques. Enfin, ce modèle a été très étudié dans notre laboratoire (Gomot et Deray 1987) où son élevage est parfaitement maîtrisé. La biologie générale d'*H. aspersa* et les modalités de son élevage en laboratoire sont présentées dans l'Annexe 1 de ce mémoire.

La laitue, le colza et le maïs ont été retenus comme modèles végétaux, d'une part, parce que ces plantes cultivées entrent dans le régime alimentaire de l'Homme (principalement la laitue et le maïs) et, d'autre part, parceque les escargots les acceptent comme nourriture.

Enfin, le coléoptère *C. splendens* a été choisi car il représente un prédateur naturel de mollusques gastéropodes (presque exclusivement héliciphage) et parce que les répartitions géographiques de *C. splendens* et de *H. aspersa* rendent possible une relation proie – prédateur entre ces deux espèces. La biologie de ce carabe, ainsi que les techniques d'élevage en laboratoire, font l'objet de l'Annexe 2 du présent document.

Le plan de ce mémoire est le suivant. Dans une première partie, une synthèse bibliographique dresse un bilan des connaissances actuelles, ce qui a permis de définir les objectifs de notre travail et de proposer les approches méthodologiques appropriées. Les résultats font l'objet de la deuxième partie du mémoire, organisée en 6 sections correspondant chacune à un article. Après avoir étudié la biodisponibilité du Cd présent dans un sol pollué pour l'escargot (Section 1), nous abordons les transferts du Cd dans un système plante – escargot (Section 2). L'hypothèse selon laquelle *H. aspersa* pourrait être un vecteur important du transfert du Cd dans les chaînes alimentaires est étudiée dans une expérience de transfert entre *H. aspersa* et *C. splendens* (Section 3). Les Sections 4 et 5 présentent des dispositifs permettant l'étude des transferts dans un système plus complexe (sol – plante – escargot). Ces dispositifs ont été utilisés en laboratoire pour les ETM (Section 4) et en conditions semi-naturelles pour l'herbicide isoproturon (Section 5). Enfin, l'étude *in situ* des transferts d'ETM fait l'objet d'une expérience exposée dans la Section 6. La troisième partie est constituée d'une discussion générale et des perspectives qui se dégagent de ce travail.

I CONTEXTE GENERAL

Les écosystèmes terrestres peuvent être contaminés par des pollutions aiguës, généralement locales, et/ou par des pollutions diffuses concernant des zones beaucoup plus vastes. Dans ce dernier cas, les polluants émis par des sources diverses (combustion de matières énergétiques, activités industrielles ou minières,...) sont déposés dans les différents compartiments de l'écosystème après un transport à plus ou moins longue distance et plus ou moins rapide.

Les apports de polluants peuvent être délibérés (épandages de déchets, de boues de station d'épuration, de fertilisants contenant des impuretés ou de biocides,...) ou totalement involontaires et imprévisibles (accidents de transport, inondations,...). Une proportion parfois non négligeable d'un composé toxique dans un écosystème peut également avoir une origine naturelle (sols formés sur des roches-mères métallifères, volcanisme, embruns marins) (Walker *et al.* 1996).

Les principales sources et les flux majeurs des substances polluantes au sein des écosystèmes sont présentés dans la Figure 1.

Le devenir des polluants dans un écosystème dépend des caractéristiques physico-chimiques du milieu, d'une part, et des caractéristiques du polluant considéré, d'autre part. La description et la quantification des rythmes de transport et de transformations des différentes substances polluantes (organiques et inorganiques) dans les différents compartiments des écosystèmes (eaux de surface ou souterraines, sols et atmosphère) sont les premières étapes permettant d'évaluer l'exposition d'un organisme à un polluant (Mill 1993).

Sensu stricto, l'exposition est définie comme le contact d'un organisme avec un agent physique ou chimique et Suter II (1993) précise, dans une perspective cinétique, que l'exposition est le processus par lequel un organisme acquiert une dose. L'évaluation de l'exposition est une composante-clé de l'évaluation du risque. Elle permet de décrire et de quantifier le contact entre une substance et un être vivant. Il s'agit de déterminer avec quel(s) compartiment(s) d'un écosystème un organisme est en contact et comment ce contact peut résulter en l'absorption du polluant par l'organisme. L'exposition dépend donc en grande partie de la biologie, au sens large, de l'organisme considéré (Jager 1998).

Une plante peut être contaminée par deux voies principales : l'apport atmosphérique de polluants et l'absorption depuis le sol par les racines (Figure 1). Chez les organismes animaux, le nombre et la nature des voies d'exposition dépendent beaucoup de l'écologie de l'organisme considéré (Suter II 1993, Van Straalen et Van Gestel 1998) et peuvent être :

- digestive par ingestion de nourriture (sol, matériel végétal ou animal mort ou vivant) et d'eau,
- cutanée par contact avec les polluants du sol et/ou de l'eau,

Figure 2. Voies et sources d'exposition (et de transfert potentiel) des mollusques gastéropodes aux polluants.

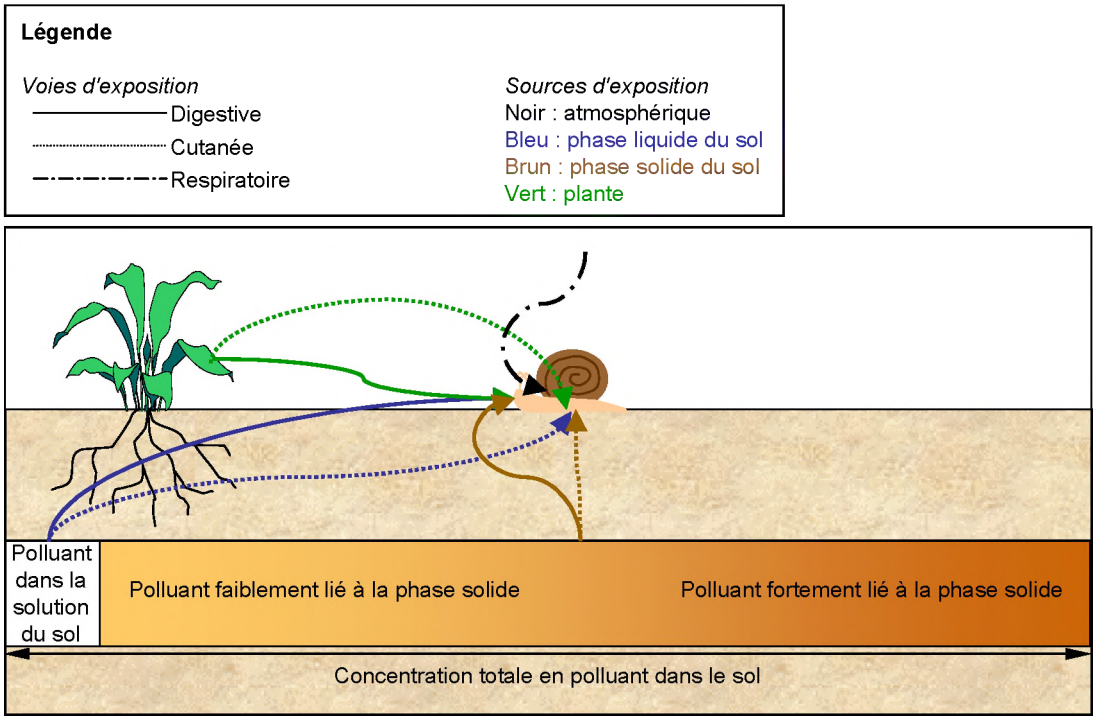
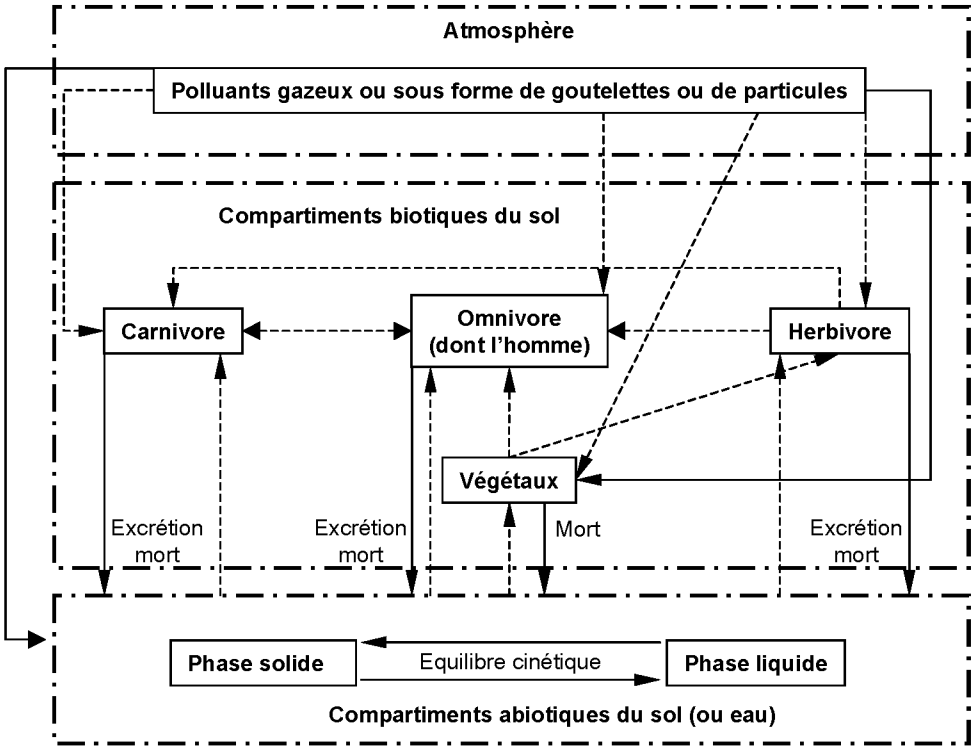


Figure 3. Transferts théoriques des polluants dans un écosystème terrestre. Les transferts figurés par des flèches en pointillé peuvent être influencés par la biodisponibilité (modifié, d'après Marinussen, 1997).



- respiratoire par inhalation de gaz et/ou de particules présents dans l'atmosphère et/ou dans la phase aérienne du sol (les interstices du sol pouvant être remplis par de l'eau et/ou par de l'air).

Dans ce mémoire, les sources (phase liquide ou phase solide du sol, plante, air) et les voies **d'exposition** (digestive, cutanée, repiratoire) seront considérées comme étant les sources et les voies **de transfert** s'il y a absorption du polluant (Figure 2).

Lorsque l'exposition a été définie, l'absorption des substances polluantes considérées est déterminée par leur biodisponibilité. La fraction biodisponible d'une substance représente la proportion de cette substance dans un compartiment qui est disponible pour l'absorption par les organismes vivants. La biodisponibilité est un paramètre particulièrement important qui intervient dans les transferts compartiments abiotiques – compartiments biotiques, mais également dans les transferts au sein des réseaux trophiques (Figure 3).

La thèse portant en grande partie sur ce paramètre (particulièrement au niveau des transferts sol – biomasse), un large volet de la synthèse bibliographique est consacré à la définition de ce concept et aux méthodes permettant de l'évaluer.

Lorsque les organismes ont absorbé un polluant, celui-ci a un devenir variable en fonction de sa nature et de la physiologie de l'organisme (il peut être transformé ou non, excrété et/ou stocké en quantité et sous des formes diverses). Ce devenir conditionne en partie le transfert de la substance (ou de ses métabolites) dans les réseaux trophiques. Le devenir des polluants dans les organismes ainsi que leurs transferts au sein des chaînes alimentaires sont abordés dans la suite de cette synthèse.

II LE CONCEPT DE BIODISPONIBILITE

Dans cette partie, nous considérerons uniquement la biodisponibilité des polluants présents dans les sols.

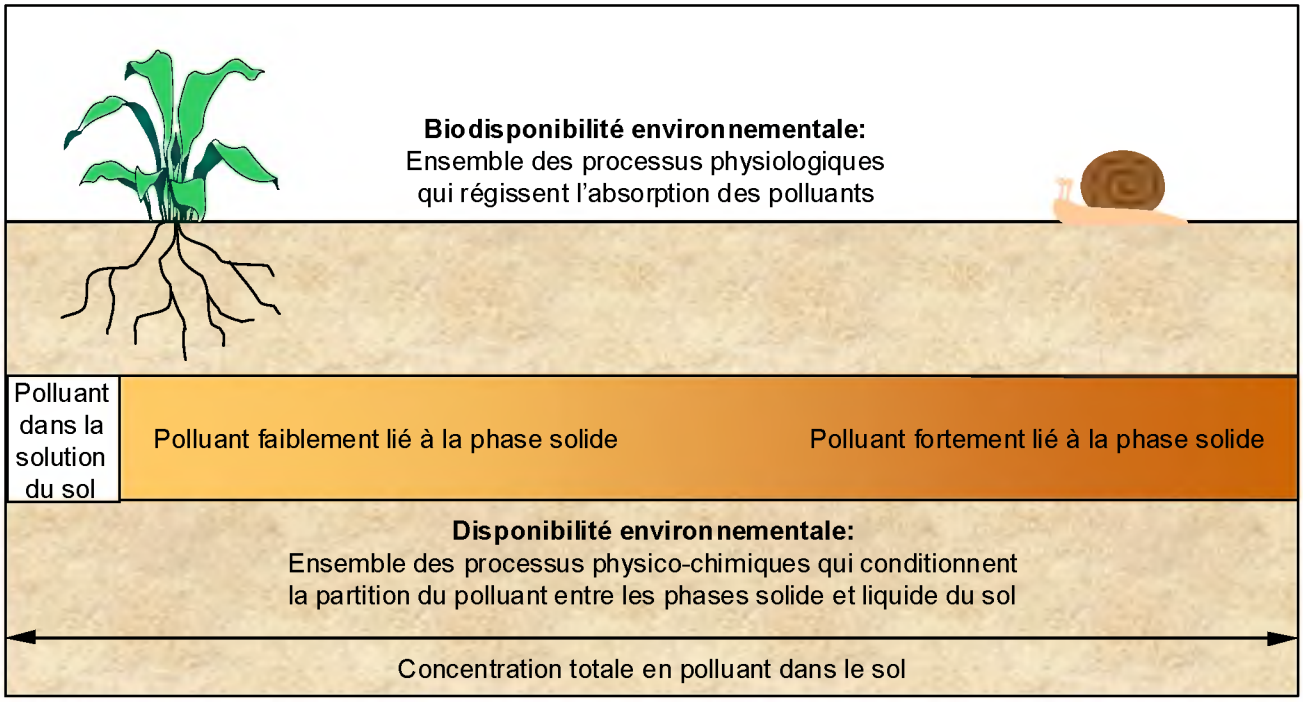
Bien que très employé, le concept de biodisponibilité est encore mal défini (Peijnenburg *et al.* 1997). Faire un inventaire des définitions proposées ne présenterait pas d'autre intérêt que de montrer qu'elles dépendent beaucoup de la formation scientifique des auteurs qui les proposent (écotoxicologues "végétaux" ou "animaux", chimistes du sol,...). Pour certains, la biodisponibilité correspond, pour les ETM, à la quantité d'ions métalliques libres en solution, d'autres estiment qu'elle est la quantité réellement absorbée par les organismes ou encore la quantité qui peut potentiellement causer un effet (Plette *et al.* 1999). La définition donnée par Peijnenburg *et al.* (1997), qui s'inspire de la définition de Hamelink *et al.* (1994) pour les milieux aquatiques, nous semble la plus appropriée aux transferts sol – organismes. Selon

ces auteurs, la biodisponibilité est un processus dynamique qui comprend au moins deux sous-ensembles de processus : la disponibilité environnementale, qui considère les processus physico-chimiques qui régissent la partition de la substance étudiée entre la phase solide et la phase liquide du sol, et la biodisponibilité environnementale, qui considère les processus physiologiques spécifiques qui régissent l'absorption de la substance.

Ces auteurs complètent cette définition en définissant un troisième ensemble de processus, la biodisponibilité toxicologique (ou pharmacologique), qui correspond à la redistribution de la substance dans l'organisme et à ses effets toxiques.

Le concept de la biodisponibilité est schématisé sur la Figure 4.

Figure 4. Concept de biodisponibilité.



Cette définition possède deux avantages majeurs. D'une part, elle met en avant la nécessité d'appréhender la biodisponibilité dans sa dimension cinétique. En effet, la biodisponibilité est susceptible de varier significativement au cours du temps en raison de l'évolution des phénomènes physico-chimiques au niveau du sol et des cycles biologiques des organismes. D'autre part, cette définition indique explicitement que la biodisponibilité est spécifique et met d'emblée l'accent sur la difficulté d'extrapoler tout résultat obtenu sur une espèce à d'autres espèces, même taxonomiquement proches.

III EVALUATION DE LA BIODISPONIBILITE : ETAT DES CONNAISSANCES ET LACUNES

L'évaluation de la biodisponibilité peut être abordée par différentes approches non exclusives parmi lesquelles les plus utilisées sont sans doute les tests biologiques et les méthodes chimiques. Ces dernières renseignent principalement sur la disponibilité environnementale et ne permettent que de poser des hypothèses quant à la biodisponibilité réelle d'un polluant pour un organisme. Les tests biologiques consistent à exposer un organisme à un substrat pollué pendant une durée déterminée puis (1) à mesurer la concentration du polluant dans les tissus de l'organisme et/ou (2) à évaluer les effets toxiques sur l'organisme (en considérant différentes cibles ("endpoints") : mortalité, croissance, reproduction, comportement, biomarqueurs, ...). Cependant, les tests biologiques seuls ne permettent pas de prévoir la biodisponibilité du polluant pour un autre type de sol, une autre concentration ou un autre organisme, et, plus généralement, pour d'autres conditions environnementales que celles utilisées au cours du test. Cette approche ne renseigne pas non plus sur le compartiment du sol (phase liquide ou solide) dont provient le polluant qui a été absorbé par l'organisme.

Dans cette synthèse bibliographique, nous avons principalement retenu les travaux qui mettent en œuvre les deux types d'approches, chimiques et biologiques.

De très nombreuses études ont montré que la concentration totale d'une substance métallique ou organique dans un sol ne représente pas la quantité réellement biodisponible pour les organismes (Morrison *et al.* 2000). Dans une approche d'évaluation du risque, il est donc fondamental de connaître de manière quantitative et qualitative la fraction biodisponible des polluants dans les sols.

III.1 *BIODISPONIBILITE DES ETM*

III.1.1 Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des ETM

III.1.1.1 Extractions chimiques

III.1.1.1.1 Principe

L'extraction chimique est la mise en solution d'une fraction d'un ou plusieurs polluants présents dans le sol. Plusieurs types d'extraction chimique existent (Lebourg *et al.* 1996) :

- extraction simple : un seul extractant est utilisé,

- extraction multiple en parallèle : plusieurs extractants (en général de plus en plus puissants) sont utilisés, avec, pour chacun, un nouvel échantillon de sol,
- extraction multiple séquentielle : plusieurs extractants sont utilisés successivement sur un même échantillon de sol.

Dans tous les cas, les extractions sont suivies du dosage du polluant passé dans l'extrait. Les extractions chimiques permettent théoriquement de fractionner les polluants dans des pools de forme biogéochimique distinctes (solubles, adsorbés à la phase organique ou à des minéraux secondaires ou primaires,...), ce qui peut être considéré comme une partie de la spéciation (l'autre partie étant de caractériser la forme chimique du polluant : ion, complexe, liaison covalente,...). Les extractions chimiques ne sont pas forcément dédiées à l'étude de la biodisponibilité ; elles sont également utilisées pour évaluer les risques de transferts vers les eaux superficielles ou souterraines (Alvim Ferraz et Lourenço 2000; Holm *et al.* 1998; Thöming et Calmano 1998).

Pour l'évaluation de la biodisponibilité, l'objectif final des techniques d'extraction chimique est de prévoir la fraction biodisponible. Pour ce faire, des relations mathématiques sont recherchées entre les concentrations dans les extraits chimiques et les concentrations dans les tissus des organismes. Une corrélation significative entre ces données suggère que la concentration extraite peut être un indicateur valable du risque de transfert du polluant depuis le sol vers l'organisme.

De nombreux extractants chimiques sont utilisés et permettent de déterminer le ou les pools recherchés pour un ou plusieurs polluants. Les extractions chimiques multiples séparent en général la totalité de l'ETM en cinq fractions qui diffèrent en fonction de la nature des extractants choisis (Tableau 1), de leur concentration et du protocole utilisé (durée d'agitation sol – extractant, par exemple) (Ahnstrom et Parker 2001; Gommy *et al.* 1998). Les pools obtenus par les différents extractants peuvent se chevaucher (Tableau 1).

III.1.1.1.2 Résultats obtenus[1]

L'extraction à l'eau déionisée permet théoriquement d'obtenir les ions métalliques présents dans la solution du sol. Certaines études ont montré des corrélations significatives et positives entre les concentrations de la solution du sol et celles des plantes (Hamon *et al.* 1995). D'autres études, au contraire, n'ont pas trouvé de relations satisfaisantes entre ces deux paramètres (Lorenz *et al.* 1997) mais les corrélations ont été améliorées en prenant en compte les concentrations en Cd dans la solution rhizosphérique, particulièrement en considérant les concentrations de la forme ionique du Cd^{2+}. Ge *et al.* (2000) ne trouvent pas de corrélations satisfaisantes entre les concentrations de Cd, Cu, Ni, Pb et Zn des plantes prélevées sur des sols pollués et les concentrations en ions libres dans la solution ou les concentrations totales en solution. D'une manière générale, McLaughlin *et al.* (2000a)

[1] Les articles analysés pour la rédaction de ce chapitre sont synthétisés dans les annexes 3A et 3B.

concluent que l'analyse des concentrations de la solution du sol ne procure pas une estimation précise de la phytodisponibilité des ETM dans les sols.

Tableau 1. Capacité de différents extractants chimiques à extraire les ions des différents pools du sol (adapté, d'après Alloway, 1995). EDTA : acide éthylène diamine tetraacétique, DTPA : acide éthylène triamine pentaacétique

Pool recherché / Extractant	Solution du sol	Echangeable	Adsorbé faiblement et lié à la phase organique	Adsorbé fortement dans les oxydes et les minéraux secondaires	Résiduaires, liés aux minéraux primaires
Eau distillée	——				
0,1M $NaNO_3$	——	——			
0,05M $CaCl_2$	——	——			
0,1 M HNO_3	——	——			
0,1 M $Ca(NO_3)_2$	——	——			
0,005 M DTPA	——	——	——	- - - - - -	
1 M HNO_3	——	——	——	- - - - - -	
0,05 M EDTA	——	——	——	- - - - - -	
HNO_3/HF	——	——	——	——	——

L'utilisation des concentrations en ETM dans la solution du sol pour évaluer (et prévoir) leur biodisponibilité pour les organismes animaux (zoodisponibilité) conduit également à des résultats contradictoires. Ainsi, chez les arthropodes, les concentrations en Cd dans les tissus du collembole *Folsomia candida* ne peuvent être prévues par les concentrations en Cd soluble du substrat artificiel (matrice ISO) utilisé pour exposer les animaux (Crommentuijn *et al.* 1997). Les concentrations en Cu dans les tissus de *F. candida* exposés à des sols naturels expérimentalement contaminés sont mieux prédites par les concentrations totales que par celles de la solution du sol ou d'extraits obtenus par de l'eau de pluie (Bruus Pedersen *et al.* 1997). Pour le Zn, les différences de toxicité observées chez *F. candida* exposé à des sols expérimentalement contaminés et à des sols pollués par une fonderie ne sont pas totalement expliquées par les différences de concentrations en Zn solubles (Smit et Van Gestel 1996). Des expériences portant sur les interactions Zn/Cd ont montré que, bien que la solubilité du Cd ait été modifiée par la présence de Zn, l'absorption des deux ETM n'est pas significativement affectée, suggérant que la solubilité des ETM ne conditionne pas leur absorption (Van Gestel et Hensbergen 1997). Chez les annélides, les concentrations en Cd dans les tissus de *Lumbricus rubellus* exposé à des sols expérimentalement contaminés dont on modifie les concentrations en Cd soluble (par ajout de $Ca(OH)_2$ ou de MnO_2) sont

médiocrement corrélées (R^2 faibles) aux concentrations solubles (Oste *et al.* 2001a). Dans cette étude, cependant, la corrélation devient satisfaisante lorsque l'on considère le pH du sol comme variable explicative.

Pour les plantes comme pour les animaux, ces résultats peuvent être expliqués par le fait que la biodisponibilité est déterminée d'une part par la concentration (et éventuellement la spéciation) des ETM dans la solution du sol, mais également par la capacité du sol à tamponner cette concentration. Ce concept, qui ne semble pas avoir été adopté par les écotoxicologues "animalistes", a pourtant été formalisé il y a 30 ans par des écotoxicologues étudiant la phytodisponibilité. Ainsi, Tiller *et al.* (1972a) définissent trois paramètres qui caractérisent la biodisponibilité :

- le facteur Intensité (*I*) qui correspond à la concentration en ETM dans la solution du sol,
- le facteur Quantité (*Q*) qui représente la réserve en ETM provenant de la phase solide et susceptible d'alimenter la solution du sol[1],
- le facteur Capacité (*C*) qui est le rapport de la quantité sur l'intensité, également appelé pouvoir tampon.

Les extractions à l'eau permettraient donc de quantifier le facteur Intensité (McLaughlin *et al.* 2000a) mais ne mettraient pas en solution les ions de réserve, donc ne permettraient pas d'évaluer le facteur Quantité. Les extractions réalisées avec des réactifs chimiques plus puissants que l'eau sont utilisées dans l'espoir de mieux quantifier *I* et/ou *Q*.

Comme nous l'avons signalé auparavant, le nombre d'extractants chimiques utilisés pour étudier la biodisponibilité des ETM est considérable. Ces extractants sont généralement de trois types : chélatants organiques, solutions salines neutres et solutions acides plus ou moins concentrées. Les acides très concentrés sont utilisés pour extraire la totalité ou la quasi-totalité des ETM présents dans le sol et ne sont pas détaillés ci-après.

Pour les plantes, les extractants organiques le plus souvent utilisés sont l'acide éthylène diamine tetraacétique (EDTA) et l'acide diéthylène triamine pentaacétique (DTPA). Ces composés solubles sont de puissants chélateurs des ETM et agissent en désorbant les ions métalliques des sites d'échange de la phase solide pour les mettre en solution. Ces extractions mesureraient plutôt *Q* que *I* et auraient même une certaine tendance (comme les acides faiblement concentrés) à extraire des ions non-phytodisponibles (Lebourg *et al.* 1996). L'utilisation du DTPA et de l'EDTA n'a pas permis d'obtenir des corrélations satisfaisantes entre les concentrations extraites et les concentrations des tissus pour le Cd dans le blé, la carotte et la laitue (Singh *et al.* 1995) et pour le Cu pour 9 plantes sauvages poussant dans des vignobles du sud de la France (Brun *et al.* 1998). La validité de l'utilisation de ces extractants pour prédire la phytodisponibilité des ETM est également

[1] Le facteur *Q* peut être estimé par des extractions plus puissantes que celles obtenues avec de l'eau, ou par des méthodes isotopiques (voir partie II.1.2.3.).

critiquée par O'Connor (1988) pour les sols acides ou pollués et par Nakahone et Young (1993).

Les sels neutres les plus utilisés sont le chlorure de calcium ($CaCl_2$), le nitrate de calcium ($Ca(NO_3)_2$), le nitrate de sodium ($NaNO_3$) et le nitrate d'ammonium (NH_4NO_3), dans des concentrations allant de 0,01M à 1M (McLaughlin *et al.* 2000b). Le principe de ces extractions repose sur la mise en solution des cations métalliques liés à la phase solide par échange avec le cation du sel utilisé. Ce type d'extractants ne provoque qu'une faible altération du pH du sol et simule étroitement la force ionique naturelle d'un sol. Cependant, les résultats obtenus, comme avec les extractants précédents, ne sont pas toujours satisfaisants pour évaluer la phytodisponibilité. Lebourg *et al.* (1996) ont passé en revue un grand nombre d'études ayant utilisé différents sels neutres et notent que les corrélations obtenues entre les concentrations dans les plantes et les concentrations des extraits vont de non significatives à hautement significatives. McLaughlin *et al.* (2000b) concluent d'une autre revue de la littérature, que des corrélations significatives sont surtout observées dans les études portant sur un faible nombre de sols et/ou de sources de pollution.

Les extractants chimiques (chélatants organiques ou solutions salines neutres) ont aussi été utilisés pour tenter de prédire la zoodisponibilité. Dans ces études également, les résultats sont contradictoires, les mêmes extractants étant corrélés ou non avec les concentrations en ETM dans les tissus. Ainsi, les concentrations extraites par le $CaCl_2$ prédisent de manière satisfaisante les concentrations internes de Cu chez le collembole *Folsomia candida* exposé à des sols naturels, pollués ou expérimentalement contaminés (Bruus Pedersen *et al.* 2000). Inversement, dans la même expérience, l'extraction au $CaCl_2$ ne donne pas une estimation satisfaisante de la biodisponibilité du Cu pour une espèce du même genre, *F. fimetaria* (Bruus Pedersen *et al.* 2000). Les concentrations en Cd, Pb et Zn des tissus d'*Eisenia andrei* exposés six semaines à cinq sols pollués provenant de sites miniers du nord de la France ne sont corrélées ni aux concentrations extraites par un mélange acétate d'ammonium – EDTA ni par le $CaCl_2$ (Grelle et Descamps 1998). Dans une étude portant sur l'influence du pH sur la biodisponibilité du Cd, du Cu et du Pb pour *Dendrobaena rubida*, les corrélations entre les concentrations dans les tissus et celles obtenues par extraction à l'acétate d'ammonium ne sont pas significatives, et ce, pour toutes les modalités de l'expérience (Bengtsson *et al.* 1986). Enfin, une étude récente montre que les concentrations en Cd et en Zn ne diminuent pas ou peu dans les tissus d'annélides exposés à des sols chaulés ou amendés avec de la béringite (utilisée comme chélateur des ETM), alors que les concentrations extraites par le $CaCl_2$ sont diminuées de plus de 90% (Oste *et al.* 2001a).

III.1.1.1.3 Intérêts et limites

Les extractions chimiques sont simples et rapides à mettre en œuvre (comparées aux tests biologiques notamment) et leur coût est relativement faible. Elles permettent, d'une manière générale, d'obtenir des données plus pertinentes sur la disponibilité potentielle des ETM que les concentrations totales dans les sols (Chlopecka *et al.* 1996). Dans le cadre de l'évaluation du risque réglementaire, l'utilisation d'un ou plusieurs extractants décrivant de manière acceptable les réservoirs disponibles pour des groupes d'organismes (par exemple, végétaux non hyperaccumulateurs, animaux du sol à corps mous,...) et pour un ou plusieurs ETM permet d'améliorer l'évaluation de la biodisponibilité. Les instances de normalisation des différents pays se dotent de méthodes d'extraction et de dosage normalisées (NF 31-120 et 31-121 *in* AFNOR (1994)) capables de répondre à ces objectifs d'évaluation du risque.

En revanche, l'ensemble des résultats analysés montre qu'il n'existe pas d'extractant universel. Un extractant efficace pour un ETM et pour un sol peut se révéler inefficace pour un autre ETM et/ou un autre type de sol. Le nombre de facteurs qui déterminent la biodisponibilité explique l'hétérogénéité des résultats (McLaughlin *et al.* 2000a). Un des inconvénients les plus importants des techniques d'extraction chimique repose sur le fait qu'elles ne sont pas cinétiques. En effet, ces extractions mettent en solution une fraction de l'ETM total d'un échantillon de sol dans des conditions données mais ne prennent pas en compte les variations de biodisponibilité au cours du temps. En d'autres termes, McLaughlin *et al.* (2000a) indiquent que la seule mesure de *I* (ce qui est immédiatement biodisponible) ne suffit pas et qu'une estimation de *Q* (ce qui pourra devenir disponible au cours du temps) est également indispensable pour évaluer précisément la biodisponibilité d'un ETM dans un sol.

De plus, l'efficacité des extractions chimiques pour séparer les ETM en pools distincts est remise en cause. Ainsi, Hutchinson *et al.* (2000) soulignent que les extractions chimiques dissolvent une fraction arbitraire des ETM et qu'elles ne constituent pas une mesure satisfaisante de leur biodisponibilité. Chlopecka *et al.* (1996) précisent que l'interprétation de l'utilisation d'un extractant doit être prudente. Ainsi, un extractant utilisé pour obtenir une fraction peut ne pas réellement extraire les ETM provenant de cette fraction. Par exemple, la fraction extraite par des solutions tampon d'acétate est supposée être liée aux carbonates alors que les conditions de pH de certains sols rendent cette fraction très peu susceptible d'être extraite par cette solution (Chlopecka *et al.* 1996). Les auteurs supposent que la fraction extraite provient d'une autre fraction non définie et, de ce fait, ne permet pas d'évaluer de manière satisfaisante la fraction biodisponible.

D'autres approches, comme la théorie de partition à l'équilibre, ont été développées pour tenter de mieux décrire cette biodisponibilité.

III.1.1.2 La théorie de la partition à l'équilibre

III.1.1.2.1 Principe

Il est généralement admis que la théorie de partition à l'équilibre (TPE) ou "Equilibrium Partitioning Theory" est une des hypothèses les plus pertinentes pour conceptualiser la biodisponibilité. Initialement, cette hypothèse a été proposée par Shea (Shea 1988) puis développée par Di Toro et collaborateurs (Di Toro *et al.* 1991) pour évaluer la biodisponibilité des polluants organiques. La théorie a été récemment adaptée aux éléments trace métalliques (Janssen *et al.* 1997a; Janssen *et al.* 1997b; Peijnenburg *et al.* 1997; Spurgeon 1997).

Cette hypothèse stipule, d'une part, que les polluants qui sont liés aux sols ou aux sédiments sont en équilibre cinétique avec la phase aqueuse (eau interstitielle des sols et des sédiments) et, d'autre part, que les organismes benthiques ou terrestres sont exposés uniquement (ou très majoritairement) à cette phase aqueuse. Cette seconde partie de l'hypothèse est également connue sous le nom de "Pore-Water Hypothesis" (PWH).

La partition d'un polluant entre les phases liquide et solide d'un sol est décrite par le coefficient de partition K_p qui est défini ainsi :

$$K_p = \frac{[Polluant]_{solide}}{[Polluant]_{liquide}}$$

Avec $[Polluant]_{solide}$, la concentration du polluant lié à la phase solide (en $mg.kg^{-1}$) et $[Polluant]_{liquide}$, la concentration du polluant dans la phase liquide (en $mg.L^{-1}$). Cette valeur est exprimée en $L.kg^{-1}$.

L'hypothèse stipulant que la concentration prévisible d'un polluant dans un organisme est directement liée à la concentration du polluant dans la phase liquide, la connaissance de la valeur de K_p suffirait pour prédire la fraction biodisponible.

III.1.1.2.2 Résultats obtenus[1]

Plusieurs études, jusqu'à présent presque exclusivement consacrées aux annélides, ont cherché à établir les relations mathématiques entre, d'une part, les caractéristiques physico-chimiques du sol et les valeurs de K_p des ETM (Janssen *et al.* 1997a) et, d'autre part, entre les concentrations dans les organismes et les valeurs de K_p (Janssen *et al.* 1997b). L'objectif final de ces études est de proposer des modèles permettant, à partir de la mesure de propriétés simples des sols (pH, teneur en matière organique (MO), granulométrie, teneur en argile ou en oxydes de fer,...), de prédire les concentrations attendues dans des organismes exposés au sol (Peijnenburg *et al.* 1999b). Plusieurs études ont conforté cette hypothèse en montrant que les concentrations en ETM dans les tissus d'*Enchytraeus crypticus*

[1] Les articles analysés pour la rédaction de ce chapitre sont synthétisés dans l'annexe 3C.

(Peijnenburg *et al.* 1999a) et d'*Eisenia andrei* (Peijnenburg *et al.* 1999b) pouvaient être prévues avec une précision satisfaisante grâce aux valeurs de K_p. Les auteurs ont conclu que l'absorption des ETM chez ces deux espèces d'oligochètes dépendait des concentrations dans l'eau interstitielle ou d'"une voie d'absorption intimement liée à l'eau interstitielle". Ces travaux ayant conforté d'autres résultats expérimentaux suggérant que l'absorption des ETM par l'eau interstitielle serait prédominante chez des annélides (Spurgeon et Hopkin 1996), la TPE a été généralement admise par la communauté scientifique.

Cependant, des expériences suggèrent que l'absorption des ETM de la phase solide pourrait être quantitativement non négligeable chez des annélides et chez des arthropodes et remettent en cause la TPE. Ainsi, dans une étude de Crommentuijn *et al.* (1997), des collemboles (*F. candida*) sont exposés à un substrat OCDE (Organisation du Commerce et du Développement Economique) modifié de manière à faire varier les concentrations solubles de Cd. Aucune tendance cohérente entre les traitements n'étant observée au niveau de l'accumulation de Cd dans les tissus, les auteurs concluent que les concentrations en Cd soluble ne permettent pas de prédire la biodisponibilité du Cd pour cette espèce. Un certain nombre d'expériences sur le Zn remettent également en question la validité de cette théorie. Oste *et al.* (2001a) divisent les concentrations de Cd soluble par 25 par ajout de $Ca(OH)_2$ ou de MnO_2 et constatent une diminution des concentrations en Cd dans les tissus d'un facteur 1,3 seulement. Les concentrations en Cd soluble dans les sols et les concentrations internes n'étant que médiocrement corrélées, les auteurs concluent que l'absorption du Cd lié à la phase solide pourrait être majoritaire (en tous cas non négligeable) et que la TPE n'est pas applicable dans ce cas (Oste *et al.* 2001a).

Les expériences menées par l'équipe de Peijnenburg sur des annélides ont été adaptées à un organisme végétal, la laitue (*Lactuca sativa*), exposée à 17 sols naturels hollandais et 2 matrices artificielles expérimentalement contaminées (Peijnenburg *et al.* 2000). Les résultats montrent que l'absorption des ETM par la plante, très variable en fonction de l'ETM et du sol considéré, est fortement corrélée à la quantité d'eau transpirée par la plante (ce qui est en accord avec une hypothèse formulée par McLaughlin *et al.* (2000a)) mais également à la disponibilité des ETM dans l'eau interstitielle.

III.1.1.2.3 Intérêts et limites

L'intérêt majeur de la TPE et de la "pore-water hypothesis" qui lui est associée réside dans la possibilité théorique d'extrapoler la biodisponibilité (en terme de bioaccumulation et/ou de toxicité) d'un ETM observée dans un sol particulier à d'autres sols grâce à la mesure de quelques unes de leurs caractéristiques physico-chimiques. La généralisation de la prédominance de l'eau interstitielle comme voie de transfert chez les invertébrés terrestres

permettrait également d'extrapoler les résultats à des organismes différents à partir des résultats obtenus sur un seul modèle.

L'absorption des ETM par d'autres voies que l'eau interstitielle, cependant, ne semble pas être négligeable dans tous les cas, probablement en raison de la variabilité de l'exposition des organismes aux ETM et de leur absorption.

Des études complémentaires sur la contribution relative de l'eau interstitielle et de la phase solide dans l'absorption de différents ETM sont donc nécessaires pour améliorer l'évaluation de la biodisponibilité. Les techniques de dilution isotopique permettent ce type d'études.

III.1.1.3 Techniques de dilution isotopique

Les techniques de dilution isotopique ont été utilisées initialement pour l'étude de la phytodisponibilité des éléments majeurs (sodium (N), potassium (P) et phosphore (K)) puis adaptées à l'étude d'ETM comme Cd, Hg, Ni et Zn.

III.1.1.3.1 Principe

Le principe de ces techniques repose sur l'injection dans un sol d'un radioisotope (^{109}Cd ou ^{65}Zn par exemple) correspondant à l'élément stable que l'on veut étudier. Le radioisotope est introduit en quantité suffisante pour être absorbé et détecté dans les tissus des organismes exposés au sol mais en quantité suffisamment faible pour ne pas modifier l'équilibre physico-chimique de l'élément stable dans le sol. Ceci est rendu possible par la très grande sensibilité des spectromètres mesurant la radioactivité émise par les isotopes. L'isotope introduit se dilue très rapidement dans la solution du sol et dans le pool isotopiquement échangeable, également qualifié de pool labile.

Ce pool labile représente la fraction de l'élément faiblement liée à la phase solide du sol et qui est susceptible de s'échanger avec les ions de la solution du sol pendant une période donnée (Figure 5). Le pool non-labile ou non-isotopiquement échangeable représente donc la fraction de l'élément lié fortement à la phase solide et qui ne peut s'échanger avec les ions de la solution du sol pendant la période considérée (Figure 5).

Cette répartition de l'isotope conduit à la détermination de deux pools théoriquement bien différenciés qui sont caractérisés par des valeurs de composition isotopique différentes.

La composition isotopique (*CI*) représente le ratio de la radioactivité (mesurée par spectrométrie β ou γ selon l'isotope utilisé) sur la concentration en élément stable (mesurée par spectrométrie d'absorption atomique). L'isotope qui s'échange rapidement (en quelques minutes) avec les ions de la solution du sol et du pool labile "marque" ces deux compartiments de manière homogène et leur confère une certaine valeur de *CI*.

A partir de cette valeur, on peut calculer la valeur *E* (qui est mathématiquement l'inverse de la CI du sol) non plus exprimée en unités de radioactivité, mais en concentration ($\mu g.g^{-1}$) d'élément échangeable. Cette valeur *E* est une estimation physico-chimique du pool échangeable (comprenant la solution du sol). A l'inverse, l'isotope ne peut, par définition, atteindre le pool non isotopiquement échangeable, sa CI a donc pour valeur 0 (Figure 6).

Il est très important de noter que cette approche est cinétique. En effet, si l'équilibre de l'élément est modifié au cours du temps (modification du pH du sol, par exemple), donc que le compartiment échangeable diminue ou augmente, la valeur de la CI va être modifiée par concentration ou dilution de la quantité initialement introduite d'isotope dans la fraction échangeable de l'élément stable.

Les sols ainsi marqués sont utilisés comme substrat de culture pour des plantes. Après une période de croissance déterminée, les plantes sont récoltées et la CI des tissus est mesurée. Si cette CI est identique à celle du pool labile, cela signifie que la plante a absorbé l'ETM dans ce pool labile. Si, au contraire, la CI de la plante est significativement inférieure à celle du pool labile, cela signifie qu'elle a absorbé l'ETM en partie dans le pool non-labile (Figure 6). On peut imaginer un cas théorique extrême où la plante aurait une CI de 0, ce qui signifierait que la plante aurait exclusivement absorbé l'ETM dans le pool non échangeable. La CI de la plante peut être utilisée pour calculer la valeur *L* (mathématiquement, cette valeur *L* est l'inverse de la CI de la plante) qui représente une estimation biologique du pool biodisponible de métal.

Figure 5. Principe de la technique de dilution isotopique (exemple du Cd).

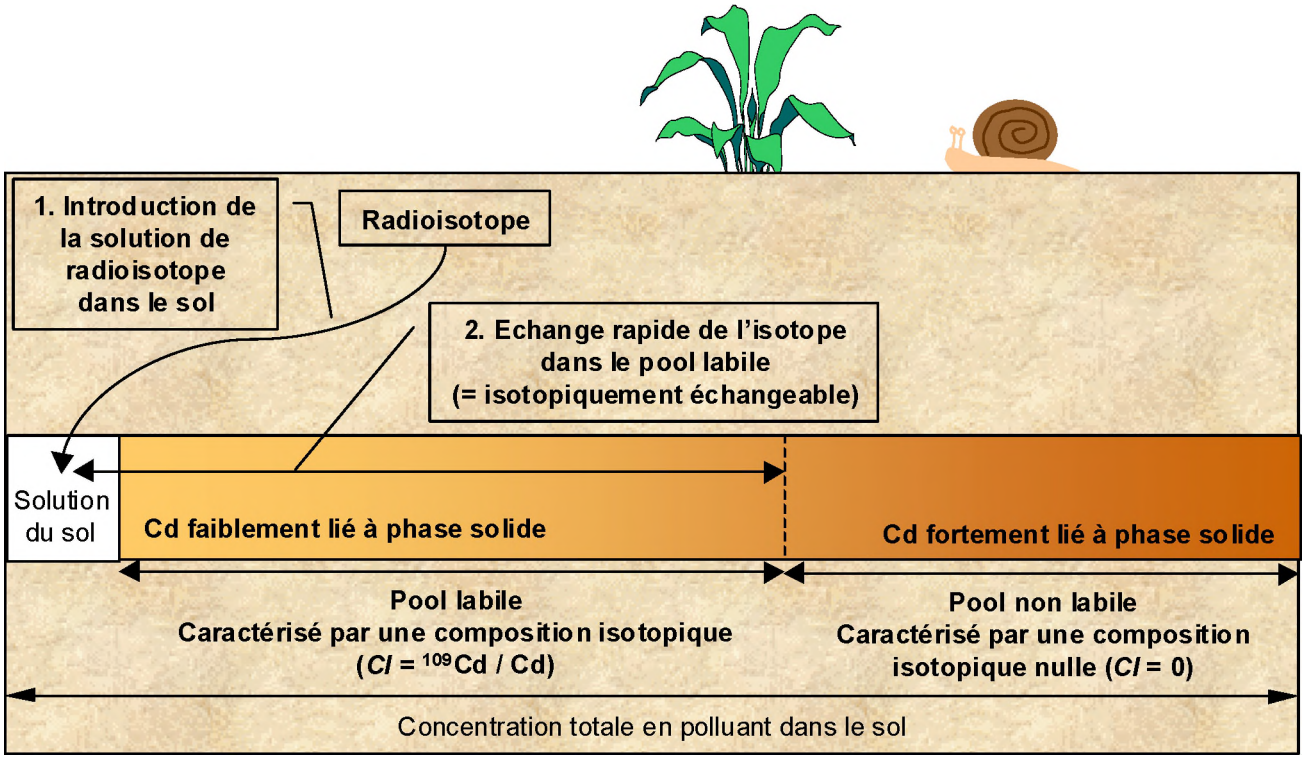
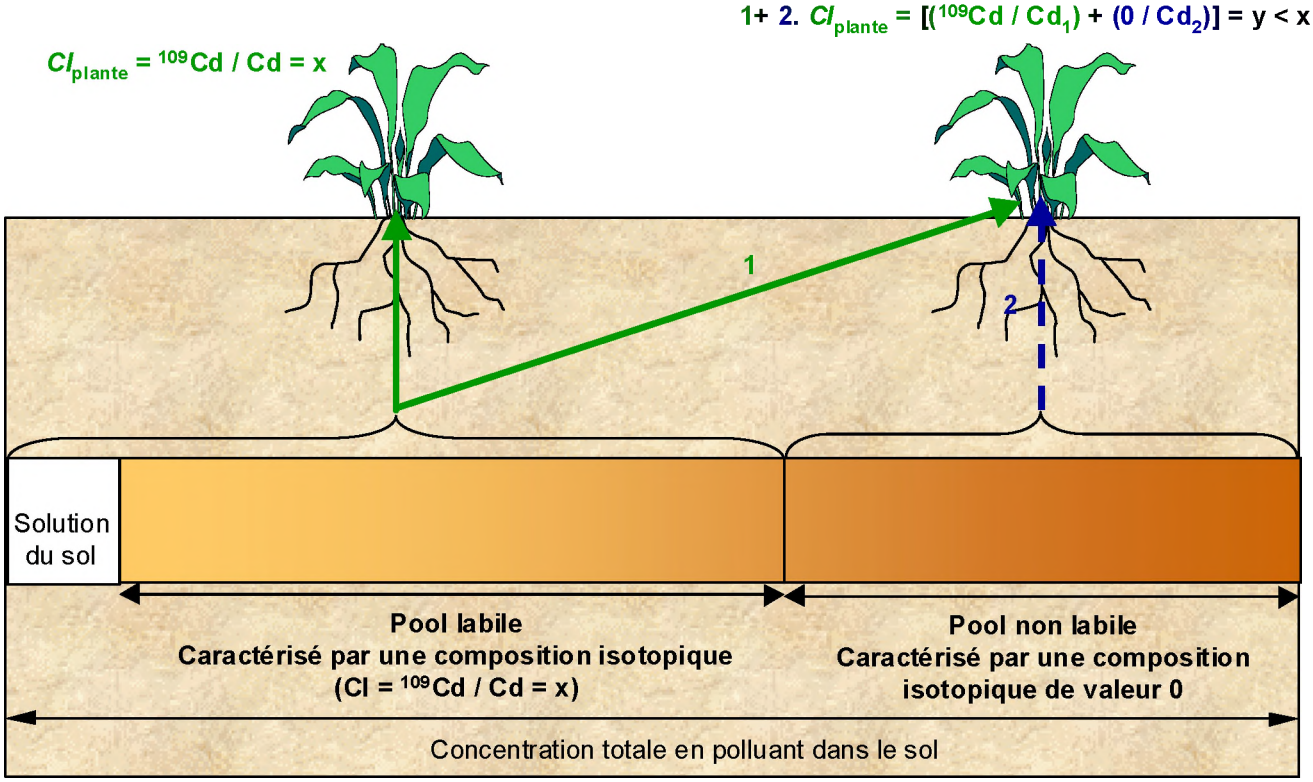


Figure 6. Représentation des différents pools d'un ETM dans le sol (exemple du Cd) et compositions isotopiques des organismes exposés. *CI* : composition isotopique.



III.1.1.3.2 *Résultats obtenus*[1]

Les études menées sur l'azote (N), le phosphore (P) et le potassium (K) ont montré qu'en conditions normales, les plantes prélèvent ces éléments dans le pool labile des sols (Fardeau 1981, 1993; Fardeau *et al.* 1979a; Fardeau *et al.* 1979b; Fardeau et Jappé 1976; Fardeau *et al.* 1991; Fardeau *et al.* 1985). L'application de ces techniques aux ETM a jusqu'à présent montré que les plantes absorbaient également les ETM dans le pool labile. Ainsi, dans les études de Tiller *et al.* (1972a; 1972b), les valeurs de *E* et de *L* ne sont pas significativement différentes pour le Zn dans des sols de pH inférieurs à 7, suggérant que les plantes étudiées prélèvent l'ETM dans le pool échangeable. Le trèfle violet *Trifolium pratense* prélève le Ni dans le pool labile de deux sols de nature différente mais de pH proches (6,5) (Echevarria *et al.* 1997; Echevarria *et al.* 1998). Le pool labile représente également le pool phytodisponible pour le ray-gras *Lolium perenne* et la laitue *Lactuca sativa* dans quatre sols de pH 8 prélevés le long d'un gradient de pollution (Gérard *et al.* 2000). Même les plantes hyperaccumulatrices de Cd du genre *Thlaspi* ne prélèvent pas de Cd dans le pool non-échangeable d'après les études de Gérard *et al.* (2000) et de Hutchinson *et al.* (2000). Pour ces auteurs, les ions "non-labiles" ne sont pas susceptibles d'intervenir dans l'équilibre phase solide – phase liquide du sol et ne sont donc pas disponibles pour l'absorption par les plantes (Hutchinson *et al.* 2000).

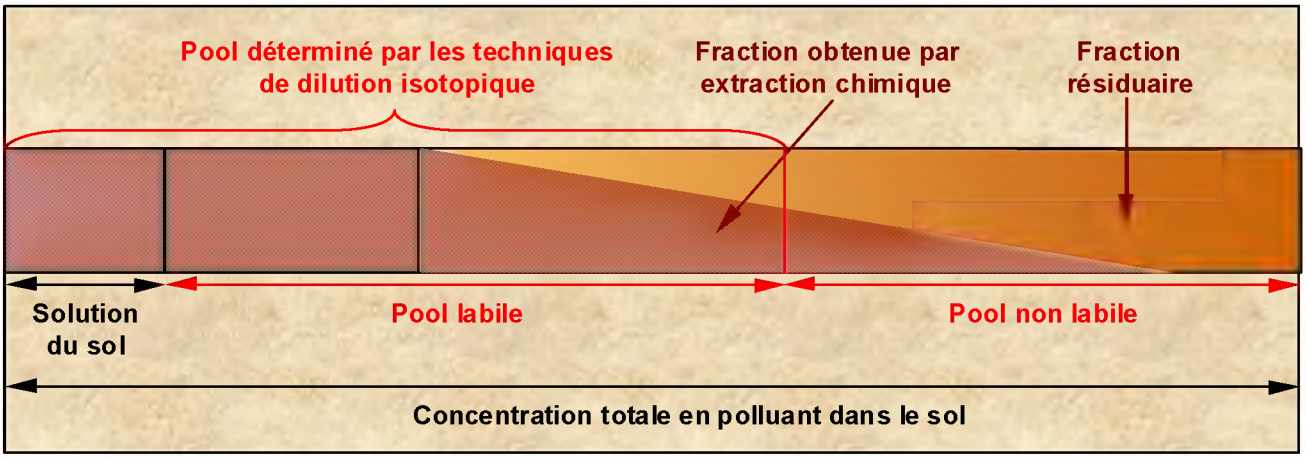
[1] Les articles analysés pour la rédaction de ce chapitre sont synthétisés dans l'annexe 3D.

Deux études, cependant, suggèrent que le pool non-labile d'un ETM pourrait être accessible pour les plantes. (Tiller *et al.* 1972a; Tiller *et al.* 1972b) ont trouvé des valeurs *L* inférieures aux valeurs *E* pour le Zn dans des sols de pH supérieurs à 7. Une étude sur l'absorption du Cd par le blé dans dix sols de Belgique, a montré des valeurs de *L* inférieures aux valeurs *E*, suggérant que le blé a pu avoir accès au pool non-labile du Cd dans le sol (Smolders *et al.* 1999).

III.1.1.3.3 Intérêts et limites

La grande majorité des plantes étudiées prélevant les ETM dans le pool labile, l'évaluation de la CI du sol marqué (ou valeur *E*), qui nécessite une expérience relativement simple et rapide, permet de prédire avec précision la taille du pool phytodisponible d'un ETM. Les techniques de dilution isotopique ont également l'avantage de donner une estimation non-arbitraire du pool phytodisponible (Figure 7).

Figure 7. Représentation théorique de la détermination du pool labile par les techniques de dilution isotopique et de la fraction obtenue par extraction chimique (d'après Morel, communication personnelle).



Une étude récente a comparé les techniques de dilution isotopique avec des extractions chimiques séquentielles pour évaluer la mobilité des ETM (Ahnstrom et Parker 2001). Cette étude démontre que les fractions extraites chimiquement ne montrent pas une bonne correspondance avec les résultats obtenus par les méthodes isotopiques et conclut que les extractions séquentielles classiques ne peuvent être que d'une utilité limitée pour prédire la biodisponibilité des ETM.

Les techniques de dilution isotopique permettent d'obtenir une estimation physico-chimique du pool disponible de l'ETM dans le sol (la CI ou valeur *E* du pool labile, qui correspond à la disponibilité environnementale de l'ETM) et de confronter cette valeur à l'estimation biologique du pool réellement biodisponible pour l'organisme exposé (la CI ou valeur *L* liée à l'organisme, qui intègre la disponibilité et la biodisponibilité environnementale). La différence entre les deux CI (ou les valeurs *E* et *L*) permet de connaître l'importance de l'éventuelle contribution du pool non-labile dans la fraction réellement biodisponible de l'ETM.

L'acquisition de ces données pour les invertébrés du sol représenterait une avancée majeure dans l'évaluation du risque lié à un sol pollué par des ETM.

Cependant, l'utilisation plus courante des techniques de dilution isotopique, notamment dans des objectifs d'application de routine pour l'évaluation du risque, est limitée par l'utilisation des isotopes radioactifs qui requiert des compétences et des locaux particuliers et des précautions très strictes. De plus, le coût est relativement élevé (achat des isotopes et du matériel mais aussi traitement des déchets radioactifs générés par les expériences).

RESUME

Evaluation de la biodisponibilité des ETM

- La concentration totale en ETM dans le sol ne permet pas d'évaluer avec précision leur biodisponibilité.
- Les concentrations mesurées après extraction chimique (simples ou multiples, à l'eau ou avec d'autres extractants) ne sont pas toujours corrélées avec les concentrations des organismes.
- La théorie de partition à l'équilibre est une hypothèse pertinente pour décrire la (bio)disponibilité mais la partie de cette théorie qui stipule que les ETM sont absorbés quasi-exclusivement dans la phase liquide du sol n'est pas généralisable.
- La technique de dilution isotopique semble très prometteuse mais n'a, jusqu'à présent, jamais été utilisée pour évaluer la zoodisponibilité des ETM.
- Bien que les escargots soient très utilisés en écotoxicologie sur le terrain comme au laboratoire, la biodisponibilité des ETM dans les sols pour ces organismes est mal connue.

III.1.2 Facteurs affectant la biodisponibilité des ETM[1]

III.1.2.1 Facteurs édaphiques

Les facteurs édaphiques qui peuvent influencer la biodisponibilité sont nombreux. Le pH et les teneurs en matière organique (MO) et en minéraux argileux (MA), principaux déterminants de la capacité d'échange cationique d'un sol, sont les facteurs les plus influents et les mieux étudiés. L'âge de la contamination du sol et d'autres facteurs comme l'humidité ou les interactions entre ETM peuvent également influencer la biodisponibilité des ETM.

III.1.2.1.1 Le pH

La plupart des ETM sont plus mobiles en conditions acides qu'en conditions alcalines car la liaison des ETM à la phase solide du sol (par différents mécanismes : adsorption, précipitation,...) augmente avec le pH (Alloway 1995). L'augmentation artificielle du pH des sols (la plupart du temps, par chaulage) est une technique largement utilisée pour diminuer la mobilité des ETM. Ainsi, une expérience récente a montré que le chaulage *in situ* (faisant passer le pH de 4,5 à 5,1, 6,3 et 7,0) réduisait significativement la solubilité du Cd et du Zn (Knight *et al.* 1998). Dans une étude concernant 30 sols forestiers et agricoles de Hollande, Römkens et Salomon (1998) observent des concentrations en Cd et en Zn solubles plus importantes dans les sols forestiers que dans les sols agricoles et attribuent cette différence aux pH plus faibes des sols forestiers, les sols agricoles étant souvent chaulés. Ces auteurs précisent que les concentrations en Cd et en Zn solubles augmentent fortement pour des pH inférieurs à 5,5. Inversement, les concentrations en Cu sont plus élevées dans les sols agricoles ; les variations des coefficients de partition (K_p) sont expliquées à 49% par la CEC et le pH pour cet élément, alors que les mêmes variables expliquent 80% de la variation des K_p pour le Cd et le Zn, ce qui tendrait à montrer une moins grande influence du pH dans la partition du Cu. De nombreuses expériences ont confirmé l'effet du pH du sol sur la solubilité du Cd et du Zn et son influence faible ou nulle sur le Cu (Bengtsson *et al.* 1986; Crommentuijn *et al.* 1997; Oste *et al.* 2001a).

Dans l'expérience de Knight *et al.* (1998), le pH a eu un effet sur la spéciation du Cd : la proportion de Cd^{2+} par rapport au Cd soluble étant passée de plus de 80% pour les pH acides à 50% à pH 7,0.

Par son action sur la solubilité et la forme des ETM, le pH est l'un des paramètres fondamentaux qui contrôlent la biodisponibilité des ETM pour les plantes (Morel 1997), qui absorbent les ETM dans la solution du sol. Ainsi, l'absorption de Cd et de Zn par *Beta vulgaris* est très diminuée par chaulage ou par adjonction de béringite (Oste *et al.* 2001a).

[1] Les articles analysés pour la rédaction de ce chapitre sont synthétisés dans l'annexe 3E.

De nombreuses études ont montré une augmentation de la biodisponibilité des ETM à pH faible mais des contre-exemples existent, au moins pour le Cd (He et Singh 1994).

Un effet important du pH sur la biodisponibilité de la plupart des ETM a été généralement observé chez les invertébrés du sol. Ainsi, les facteurs de bioaccumulation de Cd, de Pb et de Zn chez des annélides augmentent d'un facteur cinq lorsque le pH des sols auxquels ils sont exposés est réduit de 6,5 à 4,5 (Ma 1982; Ma *et al.* 1983). L'effet du pH est moins marqué pour les collemboles. En effet, Crommentuijn *et al.* (1997) n'observent pas de tendance claire à la diminution de la bioaccumulation du Cd avec l'augmentation du pH chez *F. candida* exposés à des matrices ISO dont le pH est modifié. De même, les EC50 du Cd, du Cu, du Pb et du Zn n'augmentent pas avec l'augmentation du pH chez *F. candida* (Sandifer et Hopkin 1996).

La biodisponibilité du Cu n'est pas influencée par le pH de la même manière que le Cd et le Zn. Ainsi, les travaux de Ma (1982) et Ma *et al.* (1983) ont montré que les FBAs du Cu varient très peu en fonction du pH chez les annélides. Le même auteur a démontré une absence d'effet du pH sur la toxicité du Cu pour *Aporrectodea caliginosa* (Ma 1988). Le même résultat a été observé chez le vers de terre *Octolasium cyaneum* (Jäggy et Streit 1982). L'élévation du pH pourrait même augmenter légèrement sa biodisponibilité puisque Bengtsson *et al.* (1986) ont observé une augmentation des concentrations de Cu dans les cocons de *Dendrobaena rubida* avec une augmentation du pH d'une unité (de 5,5 à 6,5).

III.1.2.1.2 Teneur et nature de la matière organique (MO) et des minéraux argileux (MA), capacité d'échange cationique (CEC)

Les sols contiennent tous de la MO (ce qui fait leur différence avec les roches altérées) mais une grande variabilité existe entre sols dans la quantité et la nature de la MO. En général, les sites chargés négativement portés par les groupements phénol ou carboxyl de la MO permettent une complexation des ETM. La MO joue donc un rôle important dans la partition phase liquide – phase solide des ETM. La diminution des teneurs en MO dans les sols conduit a une augmentation des concentrations en ETM solubles pour le Cd (Crommentuijn *et al.* 1997). De même, les MA, grâces à leurs charges négatives permanentes de surface, influent beaucoup sur les caractéristiques chimiques des sols, et notamment sur la capacité d'échange. Les MA proviennent de l'érosion de la roche-mère et influencent considérablement les propriétés physiques et chimiques de sols. La texture de la fraction fine (diamètre < 2 mm) d'un sol est dépendante des pourcentages relatifs des argiles (diamètre < 2 µm), des limons (2 µm < diamètre < 50 µm) et des sables (50 µm < diamètre < 2 mm). Les MA sont rarement présents à l'état pur dans les sols ; ils sont habituellement liés à des colloïdes humiques ou à des précipités d'hydroxydes. Les complexes organo-minéraux colloïdaux jouent un rôle très important dans le contrôle des concentrations des ions en solution (Alloway 1995).

L'influence des teneurs en MO et MA sur la biodisponibilité des ETM a été largement étudiée chez les oligochètes. Des expériences de manipulation des teneurs et/ou de la nature de la MO et des MA montrent que la toxicité du Cd et du Zn (exprimée en DL50) pour *Enchytraeus albidus* varie beaucoup en fonction de ces paramètres (Lock et Janssen 2001a; Lock *et al.* 2000). L'augmentation des teneurs en MO et MA diminue généralement la toxicité de ces deux ETM. Ces auteurs soulignent que la valeur de CEC est un paramètre beaucoup plus pertinent que les simples teneurs en MO et en MA car la CEC prend en compte leur nature. Cette remarque est très importante car, à teneurs égales, la grande variabilité de la nature de la MO et des MA peut faire varier considérablement leur capacité de complexation. Contrairement à sa relative indépendance aux mécanismes pH-dépendants, la biodisponibilité du Cu est très dépendante des teneurs et de la nature en MO et MA. L'augmentation des teneurs en MO d'un facteur deux réduit la toxicité du Cu (exprimée en LC50) pour l'oligochète *Octolasium cyaneum* (Jäggy et Streit 1982). Chez différentes espèces d'annélides, les variations d'accumulation du Cu ne sont pas expliquées en majeure partie par le pH mais par les teneurs en MO et les valeurs de CEC des sols étudiés (Ma 1982; Ma *et al.* 1983).

III.1.2.1.3 Humidité et température du sol

L'effet de la variation de l'humidité des sols sur la biodisponibilité des ETM a également été étudié. Les résultats sont contradictoires. Aucun effet de la variation de l'humidité sur l'accumulation du Cu n'a été mis en évidence chez le vers de terre *Lumbricus rubellus* (Marinussen et van der Zee 1997) alors que l'effet est significatif chez le collembole *F. candida* (Bruus Pedersen *et al.* 1997). La variation de l'humidité de la matrice ISO n'affecte pas les concentrations en Cd soluble et ne modifie ni la toxicité du Cd (évaluée par la masse des individus) ni sa bioaccumulation chez *F. candida* (Van Gestel et van Diepen 1996).

Les variations de température influencent fortement la bioaccumulation du Cu chez *L. rubellus* exposé à des sols contaminés en parcs extérieurs (Marinussen et van der Zee 1997). Chez *F. candida*, les concentrations en Zn augmentent lorsque la température diminue et elles sont plus élevées chez des individus exposés à des alternances de température que chez des individus exposés à des température constante (Smit et Van Gestel 1997). Enfin, à 15°C, les $EC50_{production\ de\ juvéniles}$ chez *F. candida* ne sont pas significativement différentes de celles obtenues à 20°C (Sandifer et Hopkin 1997).

III.1.2.1.4 Potentiel d'oxydo-réduction, Eh

Les sols sont sujets à des variations de potentiel d'oxydo-réduction qui affectent majoritairement les éléments majeurs mais également certains ETM. Les réactions d'oxydo-réduction peuvent avoir une action importante sur certains éléments dont la toxicité varie beaucoup avec la forme chimique (spéciation). C'est le cas notamment du chrome (Cr),

beaucoup plus toxique sous forme Cr(VI) que sous forme Cr(III) (Cœurdassier *et al.* 2000) mais également de l'arsenic (As) ou du mercure (Hg). Pour d'autres ETM (Cd, Cu, Pb, Zn), la forme chimique modifie moins considérablement leurs effets toxiques mais le potentiel d'oxydo-réduction agit cependant sur la solubilité des ETM dans les sols. Si les études concernant les plantes prennent parfois en compte ce paramètre (Morel 1997), son influence n'a, à notre connaissance, jamais été examinée dans les études de biodisponibilité des ETM pour les organismes animaux.

L'influence de chaque paramètre édaphique est difficile à mesurer car ils sont étroitement liés, la variation de l'un entraînant généralement la variation d'un ou de plusieurs autres. La complexité de ces interactions nécessite des recherches supplémentaires pour mieux décrire l'influence de ces paramètres, particulièrement pour la témpérature, l'humidité ou le potentiel d'oxydo-réduction.

III.1.2.2 Autres facteurs

III.1.2.2.1 "Age" de la contamination

L'âge de la contamination d'un sol peut influencer la biodisponibilité des ETM dans les sols. McLaughlin *et al.* (2000a) estiment que la mobilité et la biodisponibilité des ETM dans les sols diminuent au cours du temps. Ces auteurs précisent cependant que les effets du temps sur la biodisponibilité des ETM nécessitent d'être mieux étudiés, notamment pour déterminer les propriétés du sol qui influencent ce déclin temporel. D'autres auteurs suggèrent que la dégradation de la MO au cours du temps pourrait conduire à une re-mobilisation des ETM. Cette hypothèse nourrit depuis longtemps un débat concernant le devenir des ETM apportés dans les sols par des épandages de boues de station d'épuration. Certains auteurs pensent que les composés organiques apportés par les boues maintiennent les ETM dans des formes chimiques peu mobiles et biodisponibles (sludge protection hypothesis, Corey *et al.* (1987)). D'autres estiment que la dégradation de la MO (dont les teneurs dans les boues sont en général très importantes) va conduire à une lente remobilisation des ETM en formes solubles (sludge time bomb hypothesis, McBride (1995)). Récemment, McGrath *et al.* (2000) ont démontré que l'extractabilité et la phytodisponibilité des ETM dans des sols fraîchement amendés n'avaient pas significativement varié par rapport à des sols amendés plus de 20 ans auparavant.

Cependant, la plupart des résultats semble aller dans le sens d'une diminution de la biodisponibilité des ETM au cours du temps. Ce phénomène est particulièrement important pour extrapoler des résultats de toxicité obtenus avec des substrats fraîchement contaminés à des sols contaminés de long terme. Une étude de Spurgeon *et al.* (1994) montre que les tests de toxicité réalisés en laboratoire sur matrice ISO fraîchement contaminée surestiment

la toxicité des ETM en général. Les auteurs invoquent une plus grande biodisponibilité des ETM dans la matrice fraîchement contaminée par rapport aux sol pollués de long terme. La toxicité du Cu pour *Eisenia fetida* est supérieure lorsque les animaux sont exposés à un sol fraîchement contaminé par rapport au même sol prélevé sur un site pollué depuis plusieurs années (Scott-Fordsmand *et al.* 2000). Les mêmes effets ont été démontrés pour les collemboles. Des sols fraîchement contaminés par du Cu sont beaucoup plus toxiques (en terme de reproduction) pour *F. fimetaria* que le même sol prélevé sur un site pollué depuis plusieurs dizaines d'années (Bruus Pedersen et Van Gestel 2001). L'accumulation du Cu dans les tissus de *F. fimetaria* et *F. candida* est inférieure chez les animaux exposés à des sols contaminés à long terme (Bruus Pedersen *et al.* 2000).

Pour des sols contaminés artificiellement, une gamme d'"âge de contamination" allant de un jour à douze semaines n'a pas entraîné d'effet net sur la toxicité du Cu chez *F. fimetaria* (Bruus Pedersen et Van Gestel 2001). Des sols naturels fraîchement contaminés par du Zn montrent également une forte toxicité sur la reproduction de *F. candida* alors que l'exposition des animaux au même sol pollué de long terme n'a pas mis en évidence des relations directes entre les concentrations totales en Zn et les effets observés sur la croissance ou la reproduction (Smit et Van Gestel 1996). Les auteurs ont montré une plus forte concentration de Zn soluble dans les sols fraîchement contaminés que dans les sols pollués depuis longtemps (Smit et Van Gestel 1996).

III.1.2.2.2 Interactions entre ETM

Les interactions entre ETM sont également un facteur de variation de leur biodisponibilité. Ces interactions s'exercent à tous les niveaux : substrat (disponibilité environnementale), absorption (biodisponibilité environnementale) et effet au niveau des cibles (biodisponibilité toxicologique). Les interactions au niveau du substrat reposeraient sur la compétition entre les ETM pour les sites de complexation avec la phase solide du sol, affectant donc leur partition phase liquide – phase solide (Weltje 1998)[1]. L'interaction la plus étudiée est sans doute celle qui concerne le Zn et le Cd, dont les comportements chimiques dans les sols sont généralement considérés comme très proches. Quoi qu'il en soit, toutes les techniques d'évaluation de la biodisponibilité (extractions séquentielles, partition à l'équilibre et techniques isotopiques) prennent intrinsèquement en compte les effets résultant des interactions métalliques dans les sols pluricontaminés. Les mesures de bioaccumulation dans les tissus d'organismes exposés à un substrat pluricontaminé prennent aussi en compte les effets des interactions au niveau de l'absorption.

[1] Weltje (1998) propose une synthèse bibliographique des interactions entre ETM. L'étude concerne le Cd, le Cu, le Pb et le Zn chez les annélides exposés à des sols naturels et/ou des matrices artificielles, en laboratoire et *in situ*.

RESUME

Facteurs influençant la biodisponibilité des ETM

- La plupart des ETM sont plus mobiles en conditions édaphiques acides qu'en conditions alcalines, à l'exception du Cu dont la biodisponibilité semble relativement indépendante du pH.
- La diminution des teneurs en MO et MA augmente généralement la biodisponibilité des ETM dans les sols. Ces paramètres sont plus déterminants que le pH pour expliquer la biodisponibilité du Cu. La valeur de CEC qui traduit également la nature de la MO et des MA est un meilleur indicateur que leur simple teneur.
- Les effets des variations d'humidité et de température des sols sur la biodisponibilité des ETM sont mal documentés. L'influence des conditions d'humidité et de température sur l'activité des organismes rend difficile l'interprétation des résultats expérimentaux.
- Le potentiel d'oxydo-réduction peut agir sur la spéciation et/ou sur la disponibilité des ETM mais l'influence de ce paramètre sur leur biodisponibilité est peu étudiée.
- La biodisponibilité des ETM diminue généralement (moins souvent, elle ne varie pas) en fonction de l'âge de la contamination.
- Les interactions entre ETM (notamment Zn/Cd) influencent la biodisponibilité. Les études portant sur des sols naturellement contaminés (en général pluricontaminés) prennent en compte l'effet global des interactions entre ETM.

III.2 *BIODISPONIBILITE DES POLLUANTS ORGANIQUES*

Contrairement aux ETM, la plupart des polluants organiques sont dégradables. Parmi les composés organiques, on distingue cependant les polluants organiques persistants (POPs) qui ne sont pas ou peu dégradés (dichloro-diphényl-trichloréthane (DDT), polychloro-biphényls (PCBs), polychloro-dibenzo-dioxines (PCDDs),...). Ces composés sont caractérisés structurellement par un ou plusieurs cycles aromatiques ou aliphatiques, l'absence de groupe fonctionnel polaire et une quantité variable de substitutions halogénées, généralement chlorées. Les autres polluants organiques sont dégradés plus rapidement que les POPs mais avec des demi-vies très variables. La distinction entre les POPs et les autres polluants organiques repose donc surtout sur leur structure (Wania 2000).

La dégradation des polluants organiques rend leur suivi dans les écosystèmes plus complexe que celui des ETM. Elle nécessite l'utilisation de techniques complexes d'extraction, de purification et d'identification des molécules-mères et des métabolites.

III.2.1 Devenir des polluants organiques dans les sols

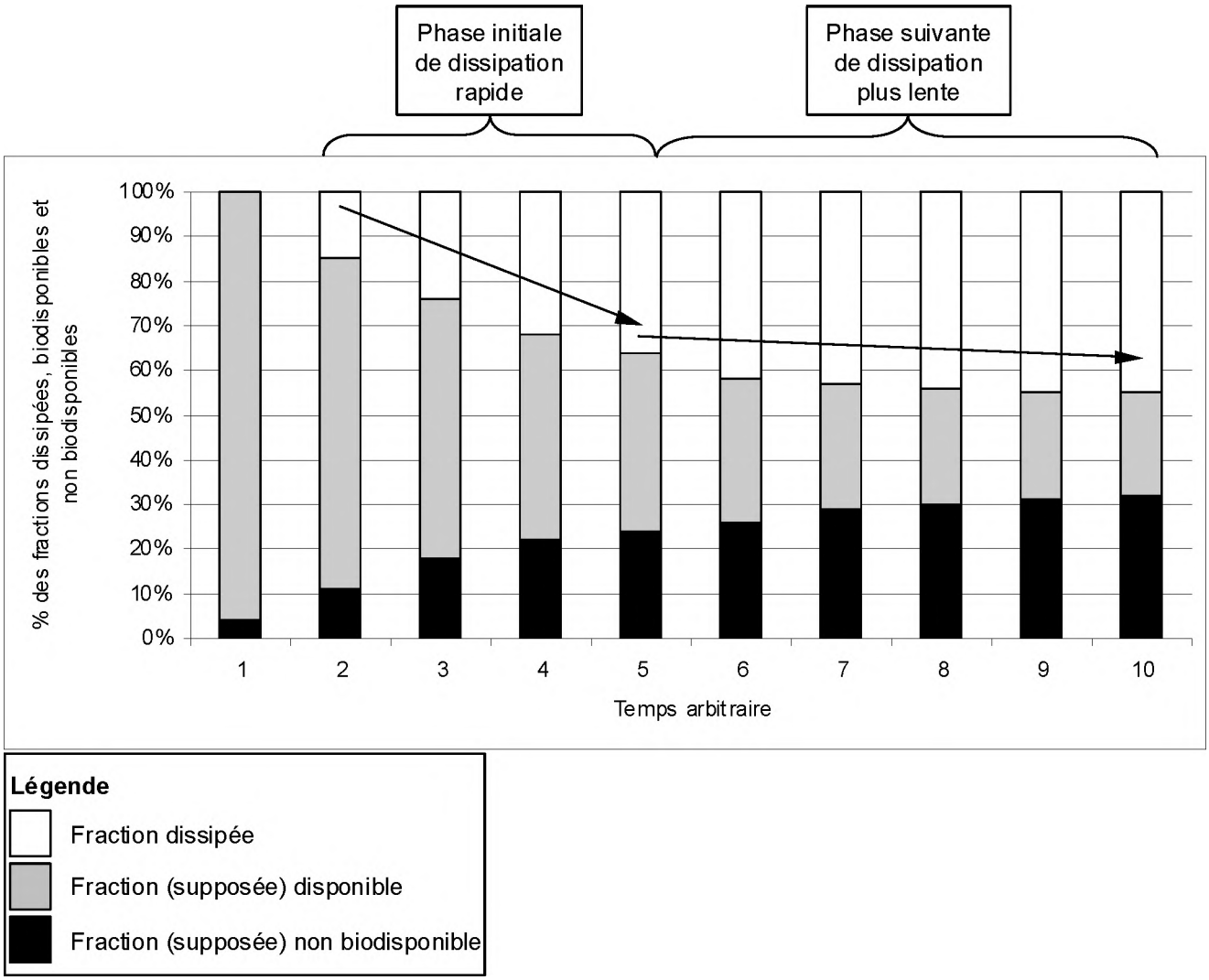
Déterminé par de nombreux facteurs dont les caractéristiques des sols, les propriétés du polluant étudié et les paramètres environnementaux (température, précipitation,...)(Reid *et al.* 2000), le devenir des polluants organiques dans les sols peut être très divers : lessivage dans les eaux superficielles ou profondes, dégradation biologique ou physico-chimique, volatilisation, liaison avec des composants du sol ou transfert dans les organismes (Jones *et al.* 1996).

La dissipation d'un polluant organique dans les sols suit une courbe de décroissance biphasique, avec une phase initiale courte de dissipation rapide suivie d'une phase plus longue de dissipation plus lente (Figure 8). L'importance de chacune des 2 phases est déterminée par la volatilité et l'hydrophobicité du composé (Cerniglia 1992; Reid *et al.* 2000). L'hydrophobicité d'un polluant organique est en partie caractérisée par la valeur du coefficient de partition octanol-eau (K_{ow}, le plus souvent exprimée en log) qui représente l'équilibre entre le caractère lipophile et le caractère hydrophile de la molécule.

La dissipation biphasique des polluants organiques est un phénomène très important car il implique que la seule connaissance de la demi-vie d'un composé organique ne permet pas de prédire avec précision sa concentration dans les sols en fonction du temps (Jones *et al.* 1996).

Les polluants subissent également des processus qui réduisent leur biodisponibilité au cours du temps et conduisent à la formation de résidus non-extractibles (Figure 8). Ces processus sont connus sous le terme de vieillissement ("ageing") (Hatzinger et Alexander 1995).

Figure 8. Devenir théorique des polluants organiques dans les sols : variation de la contribution des fractions dissipées et des fractions supposées disponibles et non disponibles par rapport à la concentration totale initiale en polluant (adapté de Reid *et al.*, 2000).

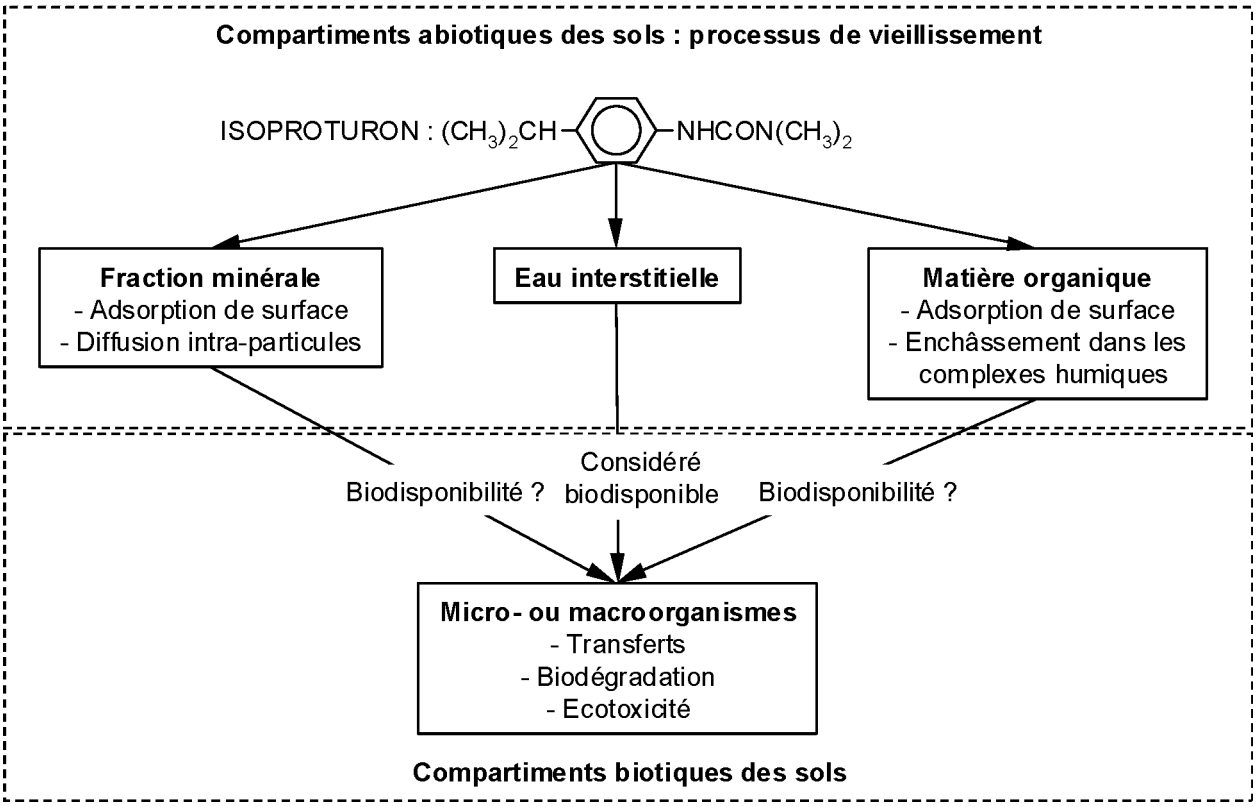


De très nombreuses études ont été menées sur les facteurs et les mécanismes responsables du vieillissement. Les principaux facteurs qui déterminent les interactions sol – polluant organique sont la teneur et la quantité de la matière organique (MO) et des constituants inorganiques, l'action des microorganismes et la concentration initiale en polluant. On admet généralement que l'adsorption des composés organiques est le principal mécanisme du vieillissement bien que d'autres processus comme l'enchâssement dans les micropores des minéraux ou de la MO peuvent également intervenir (revue dans Alexander (1995)). L'alternance de phases hydratées et déshydratées accélèrerait les processus de vieillissement (White *et al.* 1997).

Ces processus affectent la biodisponibilité des composés organiques (Figure 9). On admet habituellement que les polluants organiques présents dans la phase solide des sols sont répartis en deux fractions : la première étant constituée par les résidus qui peuvent être

rapidement désorbés (ou extraits), la seconde étant constituée de résidus plus difficilement désorbables (Pignatello et Xing 1996). La première de ces fractions serait particulièrement importante pour évaluer la biodisponibilité du polluant (Cornelissen *et al.* 1998) car il est usuellement supposé que l'absorption est beaucoup plus importante à partir de la phase liquide ou de la fraction facilement désorbable de la phase solide.

Figure 9. Processus principaux du "vieillissement" des polluants organiques dans les sols et biodisponibilité, exemple de l'isoproturon (modifié d'après Reid *et al.*, 2000).



La diminution de la biodisponibilité des polluants organiques en fonction de l'âge de la contamination du sol a été constatée chez de nombreux microorganismes (White *et al.* 1997) et des annélides terrestres (Belfroid *et al.* 1995; Belfroid 1994; White *et al.* 1997) et aquatiques (Leppanen et Kokkonen 1998; Loonen *et al.* 1997). La grande majorité des études publiées à l'heure actuelle a été consacrée à ces organismes. Les études portant sur d'autres organismes concernent très majoritairement les effets des polluants et très peu d'études sont spécifiquement consacrées à leur biodisponibilité.

III.2.2 Méthodes d'évaluation de la biodisponibilité des polluants organiques

D'une manière générale, la biodisponibilité des composés organiques peut être évaluée par des techniques biologiques, des extractions chimiques ou par l'application de la théorie de la partition à l'équilibre (TPE).

III.2.2.1 Techniques micro- et macrobiologiques

Il existe des tests microbiologiques qui permettent d'évaluer la biodisponibilité des polluants organiques en mesurant :

- la minéralisation de polluants marqués au ^{14}C en $^{14}CO_2$,
- l'impact du polluant sur la demande biologique en oxygène,
- les variations de dégradation du carbone organique dissout.

Certains de ces tests, normalisés (OCDE 1993), sont utilisés dans le monde entier depuis une vingtaine d'années (Reid *et al.* 2000).

Les techniques de bioluminescence se sont rapidement développées ces dernières années et permettent d'évaluer la biodisponibilité des polluants en mesurant leur impact sur l'activité bioluminescente de microorganismes. Cependant, ces techniques, qui nécessitent une extraction du polluant, sont très utilisées en milieu aquatique mais leur usage pour des sols reste limité en raison de difficultés techniques diverses (Bundy *et al.* 1997; Kelsey *et al.* 1997). Les techniques basées sur la bioluminescence sont principalement utilisées pour des polluants organiques mais des organismes répondant spécifiquement aux ETM ont récemment été développés (McGrath *et al.* 1999; Tibazarwa *et al.* 2001).

La biodisponibilité des polluants organiques peut également être évaluée pour des macroorganismes (animaux ou végétaux) en les exposant à des sols pollués pendant une durée donnée puis en mesurant (1) la bioaccumulation de la molécule-mère et/ou (2) la toxicité du polluant.

Les études basées sur l'accumulation et/ou la toxicité des **insecticides** sur la faune (cible ou non-cible) sont assez nombreuses (Bayley *et al.* 1995; Gyldenkaerne *et al.* 2000). Les travaux concernant la biodisponibilité de polluants organiques **non insecticides** sont plus rares et concernent majoritairement les annélides terrestres. Une synthèse des résultats acquis sur ce groupe a été récemment publiée pour tenter d'élaborer des modèles mathématiques permettant d'évaluer la bioaccumulation des polluants organiques dans les tissus des annélides (Jager 1998). Basé sur la TPE, le modèle élaboré permet de prévoir avec une précision satisfaisante les concentrations internes lorsque les annélides sont exposés à de l'eau contaminée mais surestime systématiquement les concentrations lorsque les animaux sont exposés à un sol (Jager 1998). L'auteur conclut que les modèles prédictifs ne peuvent être validés à l'heure actuelle en raison du manque de données sur le comportement physico-chimique des polluants dans les sols mais également sur les voies d'exposition des annélides. Les études de biodisponibilité consacrées à des macroorganismes autres que les annélides sont encore plus rares.

III.2.2.2 Extractions chimiques

Comme les extractions avec des acides forts permettent de mesurer la quasi-totalité des ETM présents dans les sols, des techniques d'extractions chimiques puissantes (différentes

de celles utilisées pour les ETM) permettent de déterminer les concentrations totales (ou quasi-totales) des polluants organiques dans les sols (extraction de Soxhlet, par exemple). Ces concentrations ne représentent pas la fraction biodisponible (Kelsey *et al.* 1997). D'autres extractions, moins drastiques, ont été développées dans l'objectif de trouver une méthode qui représente mieux la fraction biodisponible d'un polluant (Cornelissen *et al.* 1997; Kelsey et Alexander 1997; Kelsey *et al.* 1997). Kelsey *et al.* (1997) ont utilisé un grand nombre de solvants organiques (seuls ou en combinaison) pour extraire l'atrazine et le phénanthrène puis pour comparer les concentrations extraites avec la proportion du composé initial total (1) minéralisé par des bactéries (du genre *Pseudomonas*) et (2) accumulé par des vers de terre (*Eisenia fetida*). La biodisponibilité de l'atrazine est prévue de manière satisfaisante par un mélange méthanol:eau mais les proportions efficaces pour les bactéries (1:1) ne sont pas les mêmes que pour les vers (9:1, extraction plus puissante, plus grande proportion de solvant). Pour le phénanthrène, le butanol seul donne les meilleurs résultats mais sa biodisponibilité est mieux prédite en utilisant le solvant avec agitation pour les bactéries et sans agitation pour les vers de terre. Ces résultats montrent que, comme pour les ETM, la biodisponibilité des polluants organiques varie beaucoup en fonction des organismes considérés et que l'efficacité d'un extractant est également dépendante du polluant étudié et du protocole utilisé.

Reid *et al.* (2000) commentent ces résultats en mettant l'accent sur l'absence de corrélation simple et linéaire constatée par Kelsey *et al.* (1997) entre l'extractabilité et la biodisponibilité. Reid *et al.* (2000) précisent que la diminution relative de l'extractabilité renseigne sur la diminution relative de la biodisponibilité mais que les différences numériques entre les fractions extraites et les fractions biodisponibles restent élevées. Ces auteurs précisent également qu'un outil réellement prédictif devrait être basé sur des corrélations linéaires simples avec de forts coefficients de détermination (Reid *et al.* 2000) et non sur le type de relations trouvées par Kelsey *et al.* (1997).

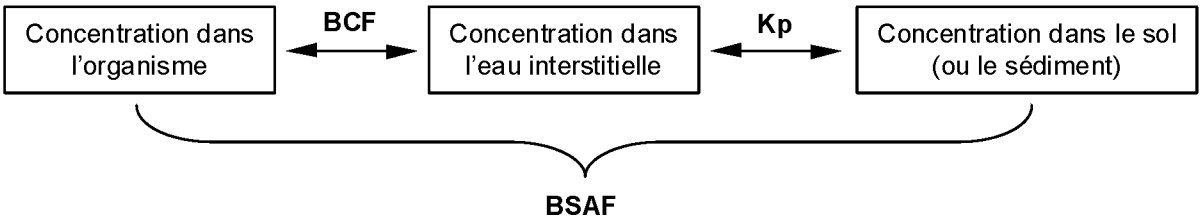
D'une manière générale, plusieurs auteurs s'accordent à dire que, si les extractions chimiques permettent parfois une évaluation satisfaisante de la biodisponibilité, la variabilité inter-spécifique de l'exposition et de l'absorption des polluants par les organismes est un obstacle majeur (et peut-être insurmontable) à la prévision de la biodisponibilité par le biais de méthodes chimiques (Kelsey *et al.* 1997; Reid *et al.* 2000).

III.2.2.3 La théorie de partition à l'équilibre

La TPE a été conçue initialement pour décrire la biodisponibilité des polluants organiques. Comme pour les ETM, les relations entre les concentrations de la phase liquide et celles de la phase solide sont décrites par le coefficient de partition, K_p (Figure 10). Le rapport de la concentration en polluant dans un organisme sur la concentration dans l'eau interstitielle correspond au facteur de bioconcentration (BCF, Figure 10). La relation qui lie les

concentrations dans les organismes et les concentrations dans les sols, est décrite par le facteur d'accumulation sol – biota (biota – to –soil accumulation factor, BSAF).

Figure 10. Relations entre les concentrations d'un polluant organique dans les organismes, l'eau interstitielle et le substrat (d'après Sijm *et al.* 2000). BCF : facteur de bioconcentration, Kp : coefficient de partition, BSAF : facteur de bioaccumulation sol - biota.



Il existe une relation étroite entre K_p d'une molécule et K_{ow}. Il existe également une relation entre K_{ow} et BCF (pour les organiques neutres, non ionisables, principalement). Comme BASF peut être considéré comme le rapport entre BCF et K_p, la valeur de BASF est supposée être (mathématiquement) indépendante de K_{ow} (Sijm *et al.* 2000).

Plusieurs études ont permis de valider ce concept chez un certain nombre d'organismes et pour certains polluants. Van Gestel et Ma (1988, 1990) et Van Gestel *et al.* (1991) ont réalisé une série d'expériences dans lesquelles les oligochètes *Eisenia andrei* et *Lumbricus terrestris* ont été exposés à la matrice ISO et à des sols naturels contaminés avec 7 composés organiques (1,2,3-dichlorobenzène, 3,4-dichloroaniline et 5 chlorophénols dont le pentachlorophénol). La toxicité (exprimée par la LC50, en µg de polluant par g de matière sèche de substrat) est très différente pour un même composé et pour une même espèce en fonction du sol. Les auteurs démontrent que ces différences "disparaissent" lorsque les LC50 sont exprimées en µg de polluant par ml de solution du sol en utilisant les valeurs de coefficient de partition. Dans ce cas, K_p peut être utilisé pour extrapoler la toxicité des substances organiques entre sols.

Cependant, la TPE ne serait pas généralisable à tous les composés organiques. Le défaut majeur de cette théorie est de ne pas considérer comme potentiellement biodisponible la fraction du polluant adsorbé sur les particules de sols (ou de sédiments). Belfroid *et al.* (1995) montrent que la TPE sous-estime la concentration à l'équilibre du polluant dans les tissus d'annélides de 10 à 50%. Belfroid *et al.* (1996) concluent une synthèse sur la biodisponibilité des polluants organiques en précisant que la TPE est généralement valide pour les composés dont log K_{ow} est inférieur à 5. Il est communément admis que les molécules dont le log K_{ow} est supérieur à 5 seraient absorbées en proportion importante avec l'ingestion de particules de sol ou de sédiment, et que la TPE ne serait pas valide pour ces molécules (Belfroid *et al.* 1996; Sijm *et al.* 2000).

RESUME

Evaluation de la biodisponibilité des polluants organiques

- Suivant la nature des contaminants, les techniques d'extraction chimiques permettent parfois d'obtenir des résultats satisfaisants, mais la variabilité du comportement des polluants organiques dans les sols et celle des voies d'exposition et d'absorption des organismes empêchent la généralisation des résultats obtenus dans un cas à d'autres extractants, sols, polluants ou organismes.
- La Théorie de Partition à l'Equilibre (TPE) a été validée pour les polluants ayant un log K_{ow} inférieur à cinq. Des études récentes montrent que, comme pour les ETM, l'absorption des polluants organiques par des sources autres que l'eau interstitielle ne serait pas négligeable, notamment pour les molécules dont le log K_{ow} est supérieur à cinq. La TPE n'est donc pas généralisable.
- La biodisponibilité des polluants organiques est principalement étudiée chez les microorganismes et les annélides.

IV DEVENIR DES POLLUANTS DANS LES ORGANISMES

Pour évaluer les transferts de polluants dans les chaînes alimentaires, il est fondamental de connaître le devenir (accumulation, excrétion ou transformation), la distribution des polluants au sein des organismes (sites de stockage) et leur forme de stockage. D'une manière générale, l'accumulation d'un polluant dans un organisme correspond à l'équilibre cinétique qui s'établit entre l'absorption, le stockage, la biotransformation pour les composés organiques et l'excrétion.

IV.1 *DEVENIR DES ETM*

IV.1.1 Devenir des ETM dans les plantes

Les ETM absorbés par les cellules des racines peuvent être immobilisés et détoxifiés grâce à la formation de complexes avec des composés organiques divers comme les acides organiques, les acides aminés ou les phytochélatines. Les ETM peuvent aussi précipiter en formant des granules opaques aux électrons (Morel 1997). La complexation des ETM avec des molécules organiques est le mécanisme prédominant dans le cytoplasme mais les ETM peuvent également être transférés, à l'état libre ou sous forme de complexes, dans les vacuoles. Chez la plupart des plantes, la présence d'ETM toxiques induit une synthèse de phytochélatines dans les vacuoles et le cytoplasme (Cobbett 2000; Leopold *et al.* 1999). Les phytochélatines sont des protéines de liaison des ETM qui contiennent des groupements sulphydryl et carboxyl capables de chélater les ETM. Les ETM présents dans le cytoplasme des cellules des racines peuvent être transférés de cellule en cellule par la voie symplasmique par les vaisseaux du xylème. Les ETM sont ensuite transportés dans les tiges, les feuilles et/ou les fruits, leur distribution finale dans les plantes dépendant de l'ETM considéré et de facteurs génétiques, environnementaux et physiologiques (Morel 1997). Certaines espèces peuvent accumuler la majeure partie des ETM absorbés dans les parties aériennes, particulièrement dans les organes végétatifs et peu dans les organes de stockage et reproductifs.

La laitue (*Lactuca sativa*), un des modèles végétaux utilisés dans nos travaux, possède une capacité particulière à absorber et à accumuler les ETM dans ses tissus, sans toutefois être un végétal hyperaccumulateur comme les plantes des genres *Thlaspi* ou *Alyssum* (capables d'accumuler certains ETM à des concentrations pouvant dépasser 10% de leur masse de cendre, Kabata-Pendias et Pendias (1992)). Cette capacité à accumuler les ETM apparaît nettement dans les tableaux de l'ouvrage de Kabata-Pendias et Pendias (1992),

présentant les teneurs moyennes en ETM de divers végétaux comestibles. Pour le Cd, le Cu, le Pb et le Zn, les concentrations des feuilles de laitue prélevées dans des sites non-pollués sont systématiquement supérieures aux concentrations moyennes mesurées dans les végétaux comestibles et sont le plus souvent parmi les plus élevées dans les sites contaminés (Kabata-Pendias et Pendias 1992). Des expériences utilisant plusieurs espèces végétales ont également montré la forte capacité d'accumulation de la laitue, pour le Cd (Gérard *et al.* 2000) et pour le Cd et le Zn (Hamon *et al.* 1997). Cette caractéristique, ainsi que l'appartenance de ce végétal au régime alimentaire de l'Homme, ont contribué au choix de la laitue comme modèle végétal dans ce travail. De plus, la laitue est une nourriture appropriée pour *H. aspersa*. Dans l'expérience de Hamon *et al.* (1997), le colza (*Brassica napus*) accumule peu le Cd par rapport aux autres espèces végétales utilisées.

IV.1.2 Devenir des ETM dans les invertébrés

Chez les invertébrés, les ETM absorbés circulent dans l'hémolymphe et sont distribués dans les tissus et organes où ils sont parfois stockés et/ou exercent des effets toxiques. Les organes les plus importants dans le stockage et/ou la régulation des ETM chez les invertébrés terrestres sont associés au système digestif (hépatopancréas chez de nombreux invertébrés dont les mollusques gastéropodes). L'épithélium du système digestif, souvent constitué d'une seule couche cellulaire, est la dernière barrière entre les polluants ingérés, présents dans la lumière du système digestif, et le milieu interne de l'organisme (Hopkin 1989). Les ETM peuvent également être absorbés par l'épithélium cutané (Van Straalen et Van Gestel 1998) ; dans ce cas, ils finissent souvent par être stockés dans l'hépatopancréas, parfois après avoir traversé plusieurs tissus.

Contrairement aux organismes aquatiques qui peuvent excréter des éléments absorbés en excès depuis le sang vers le milieu extérieur au niveau des surfaces respiratoires, les invertébrés terrestres ont développé soit des procédés d'excrétion, soit des mécanismes de stockage très efficaces. L'importance relative de l'excrétion et du stockage, qui conditionne l'accumulation des ETM, varie énormément en fonction des organismes (Dallinger 1993). D'une manière générale, on peut distinguer deux catégories d'organismes :

- les régulateurs qui maintiennent (souvent grâce à une excrétion très efficace) des concentrations internes en ETM stables même lors de fortes expositions,
- les non-régulateurs qui accumulent de grandes quantités d'ETM en les séquestrant dans des structures de stockages. Ces mécanismes de stockage des ETM incluent les protéines de liaison et les granules.

IV.1.2.1 Les protéines de liaison

Les protéines de liaison peuvent être divisées en deux groupes :

- les protéines qui séquestrent spécifiquement les métaux comme les métallothionéines et les ferritines,
- les protéines qui requièrent un ion métallique comme part essentielle de leur structure (hémocyanine, hémoglobine,...). Ces dernières ainsi que les ferritines, qui lient spécifiquement le Fe, ne seront pas traitées dans cette synthèse car elles interviennent peu ou pas dans le stockage des ETM non-essentiels ou des ETM essentiels en excès.

Les métallothionéines sont des protéines non-enzymatiques, solubles dans l'eau, de faible masse moléculaire et qui possèdent de nombreux atomes de soufre. Ces atomes de soufre appartiennent aux acides aminés cystéines qui représentent 30% de la masse moléculaire totale des métallothionéines. Elles ont été découvertes dans un très grand nombre d'organismes vertébrés comme invertébrés, aquatiques et terrestres (Carpene 1993; Dallinger *et al.* 1999; De Conto Cinier *et al.* 1998) mais certaines espèces semblent ne pas en posséder (Suzuki *et al.* 1984). Les complexes métallothionéines – ions métalliques sont formés par l'interaction de trois groupes thiols d'un acide aminé cystéine avec un atome des classes B ou intermédiaires[1] (Ag, Cd, Cu, Hg, Zn,...). Elles peuvent être induites par l'exposition à un ETM, ce qui a longtemps fait croire que leur fonction unique était de détoxifier les ETM non-essentiels ou les ETM essentiels absorbés en excès (par rapport aux besoins physiologiques immédiats). On sait maintenant qu'elles possèdent de nombreuses autres fonctions dans le métabolisme général des organismes (hypertension chez les mammifères, par exemple, Bobillier-Chaumont (1998)). Chez les invertébrés, les métallothionéines ont seulement été observées dans les compartiments intracellulaires. L'association métallothionéine – ETM n'est pas indéfiniment stable.

L'ETM lié à une métallothionéine peut être échangé soit avec un ETM de plus forte affinité, soit lors du catabolisme de la molécule. La détoxification des ETM par les métallothionéines peut donc être transitoire.

IV.1.2.2 Les granules

Les granules sont des structures sphériques, denses aux électrons donc apparaissant sombres en microscopie électronique, ils ont été classifiés en quatre catégories distinctes par Hopkin (1989).

- Les granules de type A, constitués de couches concentriques de phosphates de calcium et de magnésium, peuvent contenir des métaux de classe A et intermédiaire (Mn, Zn,...). Chez les mollusques, ces granules pourraient permettre (1) la détoxification des ETM des classes citées et (2) la constitution de réserves de calcium (et de phosphates) pour la réparation de la coquille et la reproduction.

[1] Les classes A, B et intermédiaire font référence à la classification de Niebor et Richardson (1980), qui repose sur l'affinité des métaux pour les ligands oxygénés (classe A), des ligands azotés ou soufrés (classe B) ou pour les 2 types de ligands (classe intermédiaire).

- Les granules de type B, d'apparence beaucoup plus hétérogène, contiennent toujours de grandes quantités de soufre en association avec des métaux de classe B et intermédiaire (Cd, Cu, Hg, Zn,...). La fonction essentielle sinon unique de ces granules est la détoxification des ETM. La présence de grandes quantités de soufre en association avec du Cd, du Hg ou du Zn suggère que ces granules sont composés en grande partie de résidus de métallothionéines. Les granules de type B représentent une forme de stockage insoluble (contrairement aux métallothionéines), définitive chez un certain nombre d'organismes.
- Les granules de type C, composés quasiment exclusivement de Fe. Ils peuvent contenir d'autres ETM (Pb ou Zn) chez des individus exposés à des concentrations extrêmement élevées d'ETM dans l'environnement (Hopkin et Martin 1982). Ces granules sont surtout des sites de stockage du Fe et n'ont pas pour fonction première de détoxifier les ETM.
- Les granules de type D sont généralement beaucoup plus larges que les précédents et sont composés de couches concentriques de carbonate de calcium. Les métaux autres que le Ca n'y ont jamais été détectés en quantités significatives et leur fonction serait la régulation du pH des fluides extracellulaires.

Les trois premiers types de granules sont intracellulaires alors que le dernier est localisé dans le compartiment extracellulaire.

IV.1.2.3 Cas des mollusques gastéropodes

Depuis longtemps, les mollusques gastéropodes pulmonés (limaces et surtout escargots) sont connus pour leur grande capacité d'accumulation des ETM. Cette propriété a été mise à profit en utilisant les mollusques gastéropodes comme bioindicateurs de pollution par les ETM (Beeby et Eaves 1983; Berger et Dallinger 1993; Coughtrey et Martin 1976, 1977; Greville et Morgan 1989a, 1990). Dans toutes les espèces de mollusques étudiées à ce jour, l'hépatopancréas contient systématiquement les plus fortes concentrations en Cd, Pb et Zn (Coughtrey et Martin 1976; Cooke *et al.* 1979; Dallinger et Wieser 1984). Le Cu, associé à l'hémocyanine, est distribué de manière plus homogène dans le corps entier et est stocké dans les cellules entourant les vaisseaux sanguins plutôt que dans l'hépatopancréas. Les coquilles des escargots ne semblent pas être un site de stockage important des ETM. Les concentrations de Cd et de Zn sont de l'ordre de 1 $\mu g.g^{-1}$ dans les coquilles d'*H. aspersa* prélevées dans des zones hautement contaminées (Cooke *et al.* 1979). Newman *et al.* (1994) précisent toutefois que la séquestration du Pb dans la coquille peut être une adaptation spécifique de populations exposées depuis très longtemps à de fortes concentrations de Pb. Cependant, même pour ces populations, les concentrations en Pb sont nettement inférieures à celles mesurées dans les tissus mous.

Des études des formes de stockage des différents ETM ont permis de montrer que, chez les mollusques gastéropodes terrestres, les ETM de classe B (dont le Cd et le Cu) sont majoritairement stockés sous forme de métallothionéines alors que les ETM de classe A sont surtout séquestrés sous forme de granules. Les ETM de la classe intermédiaire, comme le Zn, sont stockés sous les 2 formes.

IV.2 *DEVENIR DES POLLUANTS ORGANIQUES*

Quatre types de sites sont concernés par un polluant organique, lorsqu'il est entré à l'intérieur d'un organisme :

- sites de métabolisme : les polluants organiques sont métabolisés par des enzymes. La plupart du temps, ces processus conduisent à une détoxification mais dans certain cas, au contraire, cela mène à une activation (par exemple, diméthoate et son oxon actif, l'ométhoate).
- sites d'action toxique : les polluants interagissent avec une macromolécule endogène (ADN ou protéine, une enzyme, par exemple), une structure (une membrane, par exemple) et ces interactions conduisent à l'apparition de manifestations de toxicité au niveau de l'organisme.
- sites de stockage : les polluants sont stockés sous formes conjuguées ou complexées.
- sites d'excrétion : l'excrétion peut concerner le composé initial ou un produit de la biotransformation du composé.

Deux ensembles de processus agissent :

- les processus fonctionnels d'absorption, de distribution et de métabolisme des polluants dans les organismes déterminent la quantité du polluant qui atteint les sites d'action (que ce soit le composé d'origine ou un métabolite).
- les interactions moléculaires entre les polluants et les sites d'action. La nature et le degré des interactions entre le site d'action et le polluant vont déterminer l'éventuelle réponse toxique induite par le polluant.

Les polluants, après avoir été absorbés, circulent dans le sang (et dans une moindre mesure dans la lymphe) chez les vertébrés et dans l'hémolymphe chez les invertébrés. Dans les plantes, les polluants peuvent circuler soit dans le phloème (par un transport de type symplasmique) soit, par les flux liés à la transpiration, dans le xylème (transport de type apoplasmique). D'une manière générale, les polluants entrés par les racines peuvent être transloqués dans l'appareil aérien par le xylème alors que les polluants entrés par feuilles peuvent être transportés dans d'autres parties de la plante par le phloème.

Les polluants peuvent ensuite soit être métabolisés, soit être stockés (à plus ou moins long terme) dans des structures où ils ne peuvent interagir avec leurs sites d'action et où ils ne sont pas métabolisés. Chez les animaux, ces structures de stockage sont surtout des structures lipophiles (dépôts de graisse), des micelles de lipoprotéines ou des membranes cellulaires.

La métabolisation d'un contaminant organique correspond aux mécanismes biochimiques qui peuvent permettre sa transformation en métabolites polaires hydrophiles, plus facilement excrétables. Dans ce cas, le processus de biotransformation conduit à une détoxication de la molécule toxique.

Les processus de détoxication comprennent trois phases :

- la phase I dite de fonctionnalisation consiste en des réactions d'oxydation, de réduction et d'hydrolyse qui introduisent des groupements polaires (groupements hydroxyls) dans la molécule-mère. Deux grands groupes de monooxygénases à fonction multiple catalysent 90% des oxydations de phase I : les monooxygénases à cytochromes P450 et les monooxygénases à flavine.
- la phase II dite de conjugaison. Dans le cytoplasme des cellules, des composés endogènes hydrophiles sont ajoutés aux métabolites hydroxylés issus de la phase I et facilitent l'excrétion. Les principales enzymes impliquées sont les glutathion-S-transférases, les sulfotransférases et les UDP-glucuronosyl-transférases.
- La phase III d'excrétion du polluant hors de la cellule par l'intermédiaire de pompes membranaires de nature glycoprotéiques ATP-dépendantes.

Chez les organismes animaux terrestres, l'excrétion des polluants se fait généralement par les fèces ou l'urine et dépend de la conversion des polluants en métabolites (ou conjugués) solubles dans l'eau. Les vertébrés peuvent également éliminer une partie des polluants par la bile. La proportion des différents processus dans l'excrétion totale des polluants dépend de leur poids moléculaire et de l'organisme considéré. Les conjugués excrétés sont majoritairement des anions organiques. Si leur poids moléculaire est inférieur à 300, ils sont surtout excrétés dans l'urine. Au-dessus de 600, la bile est le principal véhicule de l'excrétion des polluants. Entre les deux, cela varie en fonction de l'espèce et du poids moléculaire de la molécule. Chez les invertébrés terrestres, le "pattern" est similaire mais l'hépatopancrés et le corps gras remplacent la fonction du foie des vertébrés dans l'excrétion des polluants (Walker *et al.* 1996).

V TRANSFERTS DES POLLUANTS DANS LES RESEAUX TROPHIQUES

V.1 *TRANSFERT DES ETM*

V.1.1 Etudes *in situ*

Une publication souvent citée parmi celles qui ont alerté la communauté scientifique sur le transfert des ETM est celle de Price *et al.* (1974). Dans cette étude, les auteurs ont prélevé des arthropodes qu'ils ont classés en trois groupes trophiques: les "suceurs de sève", les folivores et les prédateurs. A partir d'une différence significative trouvée entre les concentrations en Pb de ces trois groupes, les auteurs concluent qu'une biomagnification du Pb a eu lieu dans ce réseau trophique. Bien que remise en cause quelques années plus tard (notamment en raison du regroupement inapproprié des espèces au sein des trois groupes trophiques, Beyer (1986)), cette étude a sans doute motivé de nombreuses recherches consacrées à la mise en évidence des transferts d'ETM et de leur éventuelle biomagnification dans les réseaux trophiques (Beyer 1986). Certains sites pollués ont fait l'objet d'études extrêmement poussées, au cours desquelles des échantillons de sol, de litière, de végétaux et d'animaux appartenant à tous les échelons des chaînes alimentaires ont été prélevés et analysés. On peut citer notamment la mine de Zn, de Pb et de Cd d'Avonmouth près de Bristol (sud-ouest de l'Angleterre), étudiée en détail par les chercheurs de l'Université de Bristol depuis le début des années 1970 (synthèses dans Hopkin 1989; Martin et Bullock 1994 et Read 1988). La plupart des études – maintenant classiques – des niveaux de contamination en ETM dans les invertébrés du sol a été réalisée dans les forêts situées aux alentours de ce site (entre autres pour les gastéropodes terrestres: Coughtrey et Martin 1976, 1977). Les effets les plus spectaculaires de la pollution de ce site sont la très faible dégradation de la litière, qui constitue au cours du temps une couche épaisse à la surface du sol, et la disparition totale de certains groupes d'invertébrés dans les zones les plus polluées (notamment les vers de terre).

D'autres sites ont reçu une attention considérable comme les sites forestiers proches de l'usine métallurgique de Cu de Gusum en Suède (synthèses dans Bengtsson (1986) et Tyler (1984)), de la mine de Pb et de Zn d'Arnoldstein en Autriche (Rabitsch 1994, 1995a, b, 1996) ou de la mine de Zn de Palmerton (Pennsylvanie, USA)(Beyer *et al.* 1985). Un écosystème prairial a également été étudié en détail en bordure d'une zone urbaine et industrielle (métallurgie du Cu) à Merseyside (nord-ouest de l'Angleterre)(Hunter *et al.* 1987a, b, c, 1989). Enfin, des études moins complètes ont été menées dans des écosystèmes divers:

sites forestiers contaminés ou non en Suisse (Knutti *et al.* 1988), en Allemagne (Scharenberg et Ebeling 1996) et en Pologne (Laskowski et Maryanski 1993), bords de grands axes routiers (Muskett et Jones 1980; Wade *et al.* 1980), zones forestières proches d'usines métallurgiques traitant le Zn (Van Straalen et Van Wensem 1986), désert proche de complexes industriels et miniers (Mackay *et al.* 1998).

Les connaissances générales apportées par l'ensemble de ces études peuvent être résumées de la maniére suivante.

V.1.1.1 Contamination des sols par les ETM

Depuis les zones polluées relativement ponctuelles (0,75 km^2 pour le complexe de Merseyside, par exemple), la contamination s'étend sur de vastes surfaces, avec des contaminations en divers ETM qui restent significativement plus élevées que celles de zones témoins, et ce à plusieurs km de distance dans la (ou les) principale(s) direction(s) des vents (jusqu'à 25-30 km pour le site d'Avonmouth, Hopkin (1989)). Les concentrations diminuent généralement en fonction de la distance à la source de contamination de manière exponentielle. De même, il existe une diminution des concentrations en ETM en fonction de la profondeur du sol (Hunter *et al.* 1987a; Rabitsch 1994). La topographie et l'utilisation du sol peuvent également influer sur les concentrations en ETM dans les sols (Hunter *et al.* 1987a). La mobilité des ETM dans le sol estimée par extraction séquentielle (eau distillée, acétate d'ammonium ou acide acétique, et EDTA) décroît selon l'ordre suivant : Cd > Zn > Pb > Cu (Hunter *et al.* 1987a; Rabitsch 1994). Les proportions de métal soluble par rapport à la concentration totale sont bien supérieures pour le Cd et le Zn que pour le Pb et le Cu (Rabitsch 1994).

V.1.1.2 Transferts des ETM vers les plantes

Comme pour les sols, les concentrations dans les plantes décroissent en fonction de la distance à la source de pollution, sur des échelles spatiales vastes (Hunter *et al.* 1987a; Rabitsch 1994). Plus localement, les "patterns" de concentration sont spécifiques au site étudié et peuvent varier beaucoup même sur une faible distance. Les variations de concentrations dépendent également de l'espèce et de l'ETM considérés. Globalement, les concentrations augmentent avec l'âge du végétal étudié mais elles varient en fonction des saisons (Hunter *et al.* 1987a; Muskett et Jones 1980). De très fortes concentrations en ETM sont toujours constatées dans la litière. Les concentrations mesurées dans les tissus des plantes prélevées sur le terrain étant souvent supérieures à celles des mêmes espèces cultivées en laboratoire sur le sol pollué, la contamination par dépôt atmosphérique sur la surface des végétaux peut être importante, voire majoritaire, par rapport à l'absorption par les racines. Dans le cas de dépôts atmosphériques, la morphologie de la surface des feuilles ainsi que les propriétés biochimiques de la cuticule jouent un rôle important dans la rétention

des particules (Hunter *et al.* 1987a; Little 1973). Ainsi, Hunter (1984) estime que 25% du Cu mesuré dans des plantes (espèces non précisées) sont intégrés dans les tissus sous forme ionique ou liés à des protéines alors que 75% du Cu est présent sous forme de dépôts superficiels de particules.

V.1.1.3 Transfert des ETM vers les organismes animaux

D'une manière générale, les concentrations dans les animaux décroissent en fonction de la distance à la source (bien que des contre-exemples – c'est à dire une indépendance entre les concentrations dans les organismes et la distance à la source – suggèrent des mécanismes de régulation, de tolérance et/ou d'adaptation). A concentrations en ETM égales dans l'environnement, les différences de concentrations dans les organismes peuvent être considérables en fonction des groupes taxonomiques étudiées. Ainsi, Knutti *et al.* (1988) insistent sur l'énorme variabilité interspécifique des concentrations en Cd mesurées dans le millier d'invertébrés échantillonnés et analysés dans leur étude, les concentrations s'étalant de quelques $ng.g^{-1}$ dans certains coléoptères à plus de 20000 $ng.g^{-1}$ dans des isopodes. A l'intérieur même de groupes taxonomiques proches, les concentrations en ETM peuvent varier énormément en fonction de l'espèce étudiée (Morgan *et al.* 1986). Enfin, des différences importantes ont été mises en évidence au sein d'une même population, montrant une importante variabilité intraspécifique (Rabitsch 1994).

L'ensemble des auteurs s'accorde à considérer que les différences de régime alimentaire (déterminant l'exposition des organismes) et de physiologie digestive représentent les principaux facteurs expliquant les variations de concentrations observées chez les différents groupes. Hopkin *et al.* (1985), par exemple, suggèrent que des différences relativement faibles du pH du tube digestif des organismes pourraient entraîner des différences importantes de la solubilité du Pb.

Toutes les études constatent que la concentration en ETM n'est pas obligatoirement liée à la position de l'organisme étudié dans la chaîne trophique, que ce soit dans des écosystèmes contaminés (Beyer *et al.* 1985; Hunter *et al.* 1987b; Laskowski et Maryanski 1993; Mackay *et al.* 1998; Morgan *et al.* 1986; Rabitsch 1994; Van Straalen et Van Wensem 1986) ou dans des écosystèmes présumés non-pollués (Knutti *et al.* 1988; Scharenberg et Ebeling 1996). Des études spécifiquement consacrées aux micromammifères montrent cependant que les musaraignes (insectivores) accumulent plus le Cd que les herbivores (Andrews *et al.* 1984; Hunter et Johnson 1982; Hunter *et al.* 1987c). Différents facteurs de variation peuvent intervenir dans les différences de concentrations observées. (Van Straalen et Van Wensem 1986) ont démontré que, contrairement à certaines hypothèses, les concentrations en ETM dans les organismes ne sont pas corrélées avec leur masse corporelle. Les variations saisonnières sont en général marquées mais ne montrent pas les

mêmes tendances dans toutes les études. L'âge, le stade de développement et l'activité des organismes sont également des facteurs de variation (Rabitsch 1994).

Parmi les différents ETM, le Cd est toujours très mobile et souvent accumulé à des concentrations importantes dans les tissus des organismes. Les valeurs de FBAs (calculés par rapport au sol) sont souvent supérieures à 1 dans l'étude de Morgan *et al.* (1986). L'ensemble des études considère cet ETM comme l'un des plus préoccupants (avec le Zn, moins toxique mais relargué dans l'environnement à des concentrations supérieures). Les "patterns" sont en général moins tranchés pour les autres ETM (Cu, Pb et Zn). Le Zn semble régulé chez de nombreux organismes terrestres (Laskowski et Maryanski 1993; Roberts et Johnson 1978), vertébrés (Johnson *et al.* 1978) comme invertébrés (Beyer et Cromartie 1985). La régulation du Cu et du Pb est plus controversée. Les concentrations en Cu semblent régulées dans les études de Alberici *et al.* (1989), Beyer *et al.* (1985), Laskowski et Maryanski (1993), Rabitsch (1994) et Van Straalen *et al.* (1987). Hunter *et al.* (1987c) trouvent au contraire des FBAs de 2 à 4 chez les invertébrés étudiés. Nette chez les mammifères, la régulation du Cu ne semble pas être une règle générale chez les invertébrés (Hunter et Johnson 1982).

Dans une revue récente sur la bioaccumulation des ETM, Heikens *et al.* (2001) précisent que, pour la plupart des groupes taxonomiques d'invertébrés, les concentrations en Cd, en Cu et en Pb augmentent avec l'augmentation des concentrations dans les sols alors que les concentrations en Zn, en général régulées, sont indépendantes de celles du sol. Dans cet article, les auteurs ont classé les différents groupes d'invertébrés (à l'exception des mollusques) en fonction des concentrations en ETM mesurées dans leurs tissus et de la dépendance de cette concentration à celle du sol. Pour le Cd, les groupes dont les concentrations sont indépendantes de celles du sol sont classés ainsi : isopodes > formicidés > chilopodes. Les autres groupes, dont les concentrations sont corrélées à celles du sol, sont classés ainsi : lumbricidés > arachnides > diploures > diplopodes > collemboles > coléoptères. Pour le Cu, les concentrations internes peuvent augmenter légèrement mais restent généralement dans le même ordre de grandeur ; les espèces pouvant être classées ainsi : diplopodes = isopodes > collemboles > arachnides > lumbricidés > coléoptères = formicidés. Pour le Pb, les auteurs concluent de leur synthèse bibliographique que la plupart des espèces accumulent fortement ce métal en fonction de l'augmentation des concentrations du sol mais les différences sont telles au sein d'un même groupe taxonomique qu'aucun classement des groupes en une séquence cohérente n'a pu être établi. Pour le Zn, les groupes ont pu être ordonnés selon la séquence suivante : isopodes = diplopodes > arachnides > chilopodes > formicidés > lumbricidés > coléoptères. Les gastéropodes sont, comme les isopodes, parmi les organismes qui accumulent le plus les

différents ETM (Dallinger 1993). Cet auteur a classé les espèces en fonction des FBAs (macroconcentrateurs : FBAs > 2, microconcentrateurs : FBAs < 2 et déconcentrateurs : FBAs < 1) pour les différents ETM et les gastéropodes dont *H. aspersa* sont macroconcentrateurs pour le Cd, le Cu et le Zn.

Ces classements informent sur les capacités de bioaccumulation des ETM des différents groupes taxonomiques d'invertébrés et sur la contamination du milieu mais ne renseignent pas sur les transferts d'ETM d'un maillon à l'autre des chaînes alimentaires. Ces études ont permis de mettre en évidence l'absence de relation claire et directe entre la position trophique d'un organisme et sa concentration en ETM et d'identifier des bioindicateurs potentiels.

Malgré le grand nombre d'articles parus sur la contamination des organismes vivant aux alentours du même site, Hopkin (1989) précisait que les sources de transfert des ETM par les différents organismes n'étaient pas élucidées avec précision en raison du manque d'information sur leur régime alimentaire, particulièrement pour les invertébrés. Certaines expériences réalisées *in situ* quasiment exclusivement consacrées aux vertébrés ont tenté d'évaluer le régime alimentaire (qualitativement et quantitativement) des espèces étudiées et les concentrations des différents composants (Ma *et al.* 1991; Pascoe *et al.* 1994; Torres et Johnson 2001). L'analyse des résultats est complexe car les régimes sont souvent variables en fonction des saisons et des cycles biologiques des organismes. Des essais de modélisation sont en cours mais traduisent encore imparfaitement les transferts des polluants ; ces études ne sont donc pas présentées dans cette synthèse.

V.1.2 Etudes expérimentales en laboratoire

Devant la variabilité des gammes de concentrations trouvées chez les différents groupes d'organismes prélevés sur le terrain, des études de laboratoires ont été effectuées chez des organismes appartenant à des groupes taxonomiques et/ou ayant des positions trophiques et des physiologies digestives différentes pour mieux appréhender les sources et/ou les voies de transfert et les mécanismes impliqués.

V.1.2.1 Part respective des sources de transfert des ETM vers les organismes

Comme Hopkin (1989) le notait déjà dans sa description des études menées sur le site d'Avonmouth (Angleterre), la part respective des différentes sources de transfert (sol, litière, végétaux,...) dans la bioaccumulation des ETM chez les invertébrés terrestres est encore peu connue. Bruus Pedersen *et al.* (2000), en exposant des collemboles à des sols pollués et en les nourrissant avec des levures contaminées ou non, montrent que l'accumulation du

Cu à partir de la nourriture est supérieure à celle du sol et que les deux sources de transfert s'additionnent.

V.1.2.2 Importance de la physiologie digestive dans la bioaccumulation des ETM

Une étude récente démontre que l'assimilation et l'excrétion des ETM sont très différentes chez quatre espèces d'arthropodes: deux prédateurs, le pseudoscorpion *Neobisium muscorum* et le coléoptère carabidé *Notiophilus biguttatus* et deux détritivores, la mite oribatide *Platynothrus peltifer* et le collembole *Orchesella cincta* (Janssen *et al.* 1991). Chez les quatre espèces, l'assimilation du Cd est corrélée avec l'assimilation de la nourriture. Les capacités d'assimilation du Cd sont plus fortes chez les deux prédateurs que chez les détritivores. Les capacités d'excrétion sont fortes chez les insectes *N. biguttatus* et *O. cincta* et faibles chez les arachnides *N. muscorum* et *P. peltifer*. Il n'a pas été trouvé de relations entre l'efficacité de l'assimilation et l'efficacité d'excrétion. Les auteurs précisent que les différences d'efficacité d'assimilation reflètent les différences de niveaux trophiques et plus précisément les différences en besoins nutritifs, qui peuvent être déterminés en fonction de la taxonomie de l'espèce considérée. Les espèces qui présentent des concentrations à l'équilibre élevées sont celles qui possèdent une capacité d'excrétion faible, quelle que soit leur efficacité d'assimilation, suggérant que l'excrétion est le paramètre le plus important dans la détermination de la capacité des organismes à accumuler ou non le Cd.

Cette étude fait référence dans la mesure où elle montre l'importance de la physiologie de l'organisme dans sa capacité à accumuler un ETM indépendamment de sa position trophique.

Dans l'étude des transferts, un autre paramètre à considérer est la forme de stockage des ETM dans les organismes car elle peut conditionner leur biodisponibilité pour l'organisme consommateur.

V.1.2.3 Importance des formes de stockage des ETM

En milieu terrestre, des expériences ont été menées sur les transferts du Cd, du Cu, du Pb et du Zn contenus dans les tissus des isopodes *Oniscus asellus* chez un prédateur, le centipède *Lithobius variegatus* (Hopkin et Martin 1984). Dans cette étude, la bioaccumulation du Pb sous forme de granules dans les tissus de l'isopode est invoqué pour expliquer le faible transfert constaté chez le prédateur.

En milieu marin, pour lequel les études sont plus nombreuses, des études récentes ont étudié l'influence de la forme de stockage du Cd sur le transfert proie – prédateur. Dans une première étude, Wallace et Lopez (1995) ont élevé des oligochètes marins *Limnodrilus hoffmeisteri* pendant une et six semaines dans de l'eau contaminée par des concentrations croissantes de Cd. L'augmentation de la concentration et de la durée d'exposition augmente

les quantités et les proportions de Cd stocké sous forme cytosolique. Les auteurs suggèrent que l'induction de métallothionéines (ou de protéines proches) est responsable de ce phénomène. Les oligochètes sont ensuite offerts comme proies à des crevettes de l'espèce *Palaemonetes pugio*. La relation entre la quantité et le pourcentage de Cd dans la fraction cytosolique (donc soluble) des proies et la quantité et le pourcentage de Cd absorbé par les crevettes sont directes et linéaires. Les auteurs en concluent que la fraction soluble de Cd dans la proie est disponible pour le prédateur et que les facteurs influençant la distribution subcellulaire du Cd affectent directement son transfert vers les prédateurs. Une seconde étude a porté sur la comparaison des transferts entre les mêmes espèces mais en utilisant comme proies des oligochètes de deux populations différentes (Wallace *et al.* 1998). La première population, exposée depuis des générations à des concentrations élevées en Cd, a développé une résistance au Cd, basée sur la production plus élevée de granules de stockage du Cd. La seconde population provient d'un site témoin non pollué et séquestre, lorsqu'elle est exposée, tout le Cd assimilé sous forme de métallothionéines. Les deux populations sont utilisées pour nourrir les crevettes. Ces dernières accumulent 21% du Cd ingéré lorsqu'elles sont nourries d'individus résistants (donc produisant des granules) alors que les crevettes nourries d'individus non-résistants accumulent près de 75% du Cd ingéré. Ces résultats confirment donc l'importance de la forme de stockage subcellulaire dans la biodisponibilité et le transfert de Cd dans la chaîne alimentaire marine étudiée.

V.1.2.4 Transfert des ETM dans les relations proie – prédateur

Une des plus anciennes publications consacrées au transfert de Cd dans une chaîne alimentaire simplifiée a montré qu'il n'y avait pas biomagnification du Cd dans le cas étudié (Van Hook et Yates 1975). Dans leurs expériences de laboratoire et de terrain, les auteurs ont calculé une valeur de FBA de 0,8 pour le Cd, chez des araignées nourries avec des criquets contaminés. Les concentrations dans le prédateur étaient donc inférieures à celles de ses proies. Les cinétiques d'accumulation et de décontamination ont été étudiées pour le Cd et le Zn chez le centipède *Lithobius mutabilis* et chez le coléoptère carabidé *Peocilus* (ou *Pterostichus*) *cupreus* (Kramarz 1999a, b). Dans ces études, des larves de mouche (*Musca domestica*) sont exposées à une nourriture contaminée par du Cd, du Zn ou un mélange des deux ETM. Les larves ainsi contaminées servent de nourriture aux deux prédateurs pendant 90 jours puis les prédateurs sont nourris avec des larves non contaminées pendant une période supplémentaire de 30 jours. Dans les deux expériences, les concentrations en Cd dans les tissus des prédateurs augmentent régulièrement pendant la période d'exposition mais restent très inférieures à celles de leurs proies (au moins 10 fois) et reviennent en quelques jours à un niveau proche de la concentration initiale après arrêt de l'exposition (ces deux tendances étant plus marquées chez le carabes que chez le centipède).

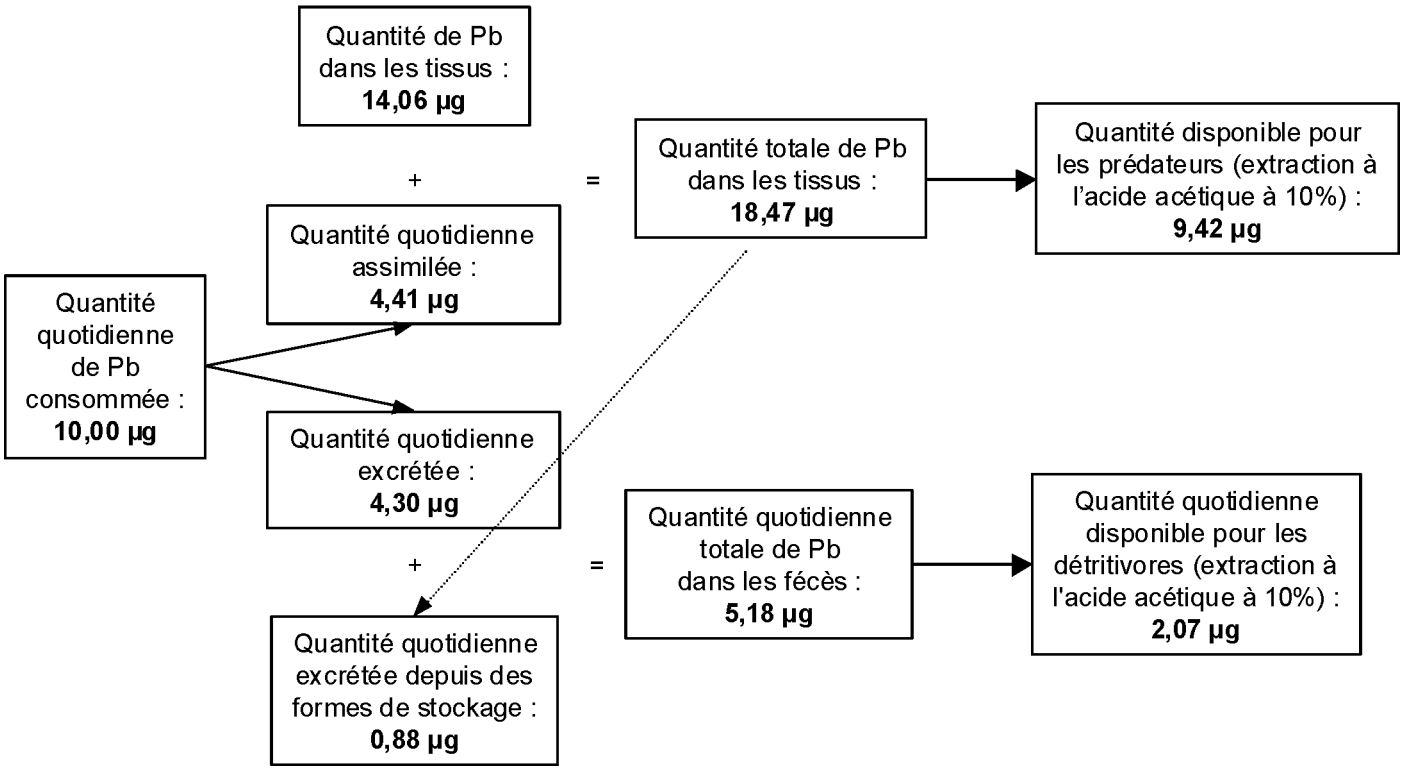
Chez les invertébrés, un des rares cas de biomagnification d'un ETM entre une proie et un prédateur est celle de Nuorteva et Nuorteva (1982) et concerne le mercure. Dans cette étude, des larves de mouches (calliphoridés) sont élevées sur des cadavres de poissons riches en méthyl-mercure. Les auteurs constatent une première augmentation des concentrations en Hg qui sont quatre fois plus élevées dans les tissus de la mouche que dans sa nourriture. Les larves ainsi contaminées servent de nourriture à un coléoptère staphylinidé (*Creophilus maxillosus*) pendant une semaine. Les concentrations mesurées dans le prédateur sont supérieures à celles mesurées dans les mouches, avec des FBAs de l'ordre de trois.

Les fortes capacités d'accumulation des ETM des mollusques gastéropodes ont alerté les chercheurs sur le risque qu'ils représentaient en terme de transfert dans les chaînes alimentaires. Dès 1980, Williamson (1980) attire l'attention sur ce risque en précisant que certains prédateurs comme la grive musicienne *Turdus philomelos* ou certains coléoptères carabidés sont des prédateurs spécialistes des mollusques. Les mollusques constituent, d'une manière générale, des proies pour de nombreux prédateurs (invertébrés, amphibiens, oiseaux, mammifères) et constituent une part importante de leur régime alimentaire. Dans une expérience originale, Beeby (1985) évalue, par rapport à la quantité de Pb ingérée par l'escargot *H. aspersa*, la quantité disponible pour les prédateurs et les détritivores (par le biais des féces). Les résultats de cette expérience sont rapportés dans la Figure 11. A partir de ces résultats, l'auteur conclut que *H. aspersa* pourrait constituer un vecteur majeur du transfert de Pb au sein des chaînes alimentaires d'un écosystème pollué.

Dans une autre étude, Laskowski et Hopkin (1996a) soulignent également le rôle possible des escargots dans l'intoxication de prédateurs. Ces auteurs constatent que les concentrations de Cd et de Cu dans les tissus d'escargots sont toujours supérieures à celles de leur nourriture. Pour le Pb et le Zn, les concentrations sont inférieures dans les tissus lorsque la nourriture est fortement contaminée. Les auteurs concluent que les escargots seraient un vecteur de transfert plus important pour le Cd et le Cu que pour le Pb et le Zn. L'escargot pourrait quand même constituer un vecteur important de transfert du Zn puisque les concentrations dans les tissus restent supérieures à celles de la nourriture jusqu'à une concentration de 2650 $\mu g.g^{-1}$. Enfin, Laskowski et Hopkin (1996a) signalent que, contrairement au Cu qui est principalement stocké dans les tissus des invertébrés terrestres sous forme de granules, le Cd est majoritairement lié à des métallothionéines (ou à d'autres protéines de faibles poids moléculaire) solubles, donc qu'il doit être très biodisponible pour les prédateurs.

L'hypothèse selon laquelle les escargots vivants dans des sites très contaminés représenteraient un risque effectif pour des prédateurs n'a jamais été testée expérimentalement.

Figure 11. Flux d'une quantité de Pb "à travers" un escargot *H. aspersa* : bilan quotidien en terme de disponibilité pour les prédateurs et les détritivores (d'après Beeby 1985).



Bilan quotidien :
Consommation : 10 µg - Disponibilité pour les prédateurs et les détritivores : 11,49 µg

V.2 *TRANSFERT DES POLLUANTS ORGANIQUES*

Comme cela a été évoqué dans l'introduction de ce mémoire, les transferts de polluants organiques dans les chaînes alimentaires terrestres ont donné lieu à quelques exemples dramatiques de l'effet létal de ces transferts (insecticides organochlorés, notamment). Cependant, les connaissances sur l'exposition des organismes terrestres aux polluants organiques (et les effets qui en résultent) sont beaucoup moins étendues que celles concernant le milieu aquatique (Freemark et Boutin 1995). De plus, la plupart des études consacrées aux écosystèmes terrestres portent sur les vertébrés. Les études sur les invertébrés ont trait en majorité aux vers de terre, souvent considérés comme des vecteurs potentiels majeurs des polluants vers les prédateurs vertébrés (oiseaux et mammifères) (Cooke *et al.* 1992). Pour Paoletti et Bressan (1996), le coût important des analyses et le très grand nombre de pesticides à étudier représentent un frein majeur au développement des études de routine.

Contrairement aux concentrations en ETM, toutes les concentrations données dans ce chapitre sont exprimées en µg par g de matière fraîche.

V.2.1 Etudes *in situ*

Une des premières études montrant les effets du transfert d'un composé organique depuis les tissus d'annélides vers un prédateur est celle de Rudd (1964). Cette étude a montré que les populations d'un turdidé proche du Merle noir européen (le Robin américain, *Turdus migratorius*) ont fortement diminué dans les zones traitées au DDT en raison de la mortalité directe et de la diminution du succès de reproduction. Il a été démontré que ces effets étaient liés à un empoisonnement secondaire par le biais des annélides consommés par cette espèce. Les concentrations mesurées en DDT dans les annélides ont révélé que l'ingestion d'une centaine de vers contaminés correspondait à la dose létale de DDT (3 mg) pour l'espèce. Le transfert par l'intermédiaire des annélides est également invoqué pour expliquer les diminutions observées des populations de bécasses (*Scolopax rusticola*). D'autres exemples d'empoisonnement secondaire (principalement par les insecticides organochlorés) de diverses espèces de prédateurs consommant des annélides ont été signalés (revue dans Cooke *et al.* (1992)).

Comme évoqué précédemment, ces insecticides persistants ont été interdits dans beaucoup de pays. Les transferts d'autres composés organiques (les PCBs par exemple) dans les chaînes alimentaires des écosystèmes terrestres continuent cependant de faire l'objet d'études (Hendricks *et al.* 1995; Van den Brink et Ma 1998), avec parfois des effets létaux importants comme dans le cas d'un anticoagulant rodenticide, la bromadiolone (Berny *et al.* 1997).

En dehors des études consacrées aux annélides (et déjà abordées dans les paragraphes consacrés à la biodisponibilité de cette synthèse), les travaux sur les transferts de molécules organiques chez les invertébrés sont rares. Pourtant, dès 1971, Eisner *et al.* (1971) ont trouvé du 2,5 dichlorophénol dans les sécrétions défensives de la sauterelle *Romalea guttata*. Les auteurs suggèrent que ce composé est un métabolite du 2,4 D, un herbicide couramment utilisé dans le site où les sauterelles ont été prélevées. Des études portant sur les PCBs ont montré que la plupart des invertébrés accumulent ces composés (Eisler 1986). Une étude de bioindication active utilisant *Acheta domesticus* encagé sur des sites pollués par les PCBs a montré que ce criquet peut accumuler rapidement (durée d'exposition de 3 à 7 jours) les PCBs à des concentrations de l'ordre du $\mu g.g^{-1}$ pour des concentrations de 1150 $\mu g.g^{-1}$ dans le sol. Sur des sols très fortement pollués par les PCBs (6300 $\mu g.g^{-1}$), les concentrations mesurées dans des punaises (Homoptères scutelleridés) et dans des fourmis (hyménoptères formicidés) sont respectivement de 13,9 et 60,0 $\mu g.g^{-1}$ (Watson *et al.* 1985).

V.2.2 Etudes expérimentales en laboratoire

Les études du transfert de composés organiques en laboratoire sont relativement nombreuses. Comme avec les radioisotopes utilisés pour les ETM, le marquage au ^{14}C permet de suivre le devenir des composés marqués et de leur(s) métabolite(s) dans les sols, les eaux et les organismes, même lorsque les quantités utilisées initialement sont très faibles.

V.2.2.1 Part respective des sources de transfert de polluants organiques vers les organismes

Dans une étude récente, Sousa *et al.* (2000) ont étudié les différentes sources d'exposition au lindane (sol ou nourriture) d'un isopode, *Porcellionides pruinosus*. Les quantités accumulées dans les tissus sont beaucoup plus importantes (environ 30 fois) lorsque les isopodes sont exposés au sol pollué plutôt qu'à la nourriture. Ces différences s'expliquent par des taux d'assimilation beaucoup plus faibles chez les individus exposés à la nourriture contaminée. Nous n'avons pas trouvé d'autres études concernant cette problématique.

V.2.2.2 Transfert des polluants organiques dans les relations proie – prédateur

Le transfert du PCP-Na (marqué au ^{14}C) a été étudié dans une chaîne alimentaire "levure – collembole (*Folsomia candida*) – coléoptère carabidé (*Nebria nevicollis*)" (Gruttke *et al.* 1988). Dans des collemboles exposés pendant 30 jours à de la levure contaminée à 870 $\mu g.g^{-1}$ de PCP-Na, la concentration dans les tissus atteint 380 $\mu g.g^{-1}$ de radiocarbone après 8 jours d'exposition puis se stabilise à environ 220 $\mu g.g^{-1}$ pendant les 20 jours restant. Une autre expérience a permis de suivre une période de décontamination de 20 jours suivant six jours d'exposition et a montre une excrétion très rapide, qui conduit à une concentration inférieure à 10 $\mu g.g^{-1}$. Les collemboles exposés huit jours (contenant 380 $\mu g.g^{-1}$) sont offerts comme proie aux carabes pendant 12 jours. Après quatre jours, la concentration dans le prédateur est de 4,5 $\mu g.g^{-1}$ puis reste stable pendant les huit jours suivants d'exposition. Après quatre jours de décontamination, la concentration a fortement diminué à 0,39 $\mu g.g^{-1}$. L'extraction et l'analyse du PCP-Na des tissus de la proie et du prédateur donnent des résultats relativement similaires. Les pourcentages de PCP-Na, de métabolites non polaires et polaires et de résidus non extractibles par rapport à la quantité totale de radiocarbone dans les tissus sont de 50, 2, 3 et 45 chez le collembole et de 41, 3, 15 et 41 chez le carabe. La nature exacte des métabolites n'a pas été déterminée dans ces travaux.

V.2.2.3 Transfert avec détermination des métabolites

A notre connaissance, la seule étude dans laquelle la nature des métabolites a été déterminée porte sur le transfert du 2,4-D chez un papillon polyphage (*Eupackardia calleta*, Lépidoptère saturniidé)(Deml et Dettner 2001). Des larves de ce papillon sont exposées à des feuilles sur lesquelles le 2,4-D a été pulvérisé. Les principaux composés retrouvés dans le système digestif des larves, leurs fèces, les corps gras, l'hémolymphe et les sécrétions exocrines sont la molécule initiale, le 2,4-DCP (2,4-Dichlorophénol) et l'acide phénoxyacétique.

RESUME

Devenir des polluants dans les organismes et transferts dans les réseaux trophiques

ETM

- Dans les plantes, les ETM peuvent être stockés sous forme de protéines de liaison (phytochélatines) ou de granules, dans les tissus aériens ou dans les organes sous-terrains.
- Dans les invertébrés, les ETM sont généralement stockés dans les organes associés au système digestif, sous forme de protéines de liaison (métallothionéines) ou de granules.
- Les mollusques gastéropodes pulmonés accumulent les ETM majoritairement dans les viscères (hépatopancréas, rein) sous des formes variables en fonction de l'ETM considéré. Le Cd, principalement lié à des métallothionéines, le rend *a priori* biodisponible pour les prédateurs.
- Les concentrations en ETM dans les différents organismes composant les chaînes alimentaires terrestres sont souvent connues mais les transferts sont peu étudiés.
- Une seule étude a été trouvée dans la littérature disponible sur la détermination de la contribution relative des différentes sources d'exposition (sol et nourriture principalement) dans l'accumulation des ETM par les invertébrés du sol.

Polluants organiques

- Les études des transferts de composés organiques dans des invertébrés sont rares.
- Très peu de travaux ont été consacrés à la contribution relative des différentes sources d'exposition dans le transfert des composés organiques chez les invertébrés, aucune chez des mollusques gastéropodes pulmonés.
- Une seule, à notre connaissance, a été consacrée à l'identification des métabolites présents dans les tissus des invertébrés exposés.

Du bilan des connaissances actuelles établi dans cette synthèse bibliographique, émerge un certain nombre de questions, auxquelles les expériences de la thèse cherchent à répondre.

L'évaluation de la biodisponibilité des ETM pour les invertébrés du sol, telle qu'elle est réalisée actuellement, ne permet pas de caractériser les pools biodisponibles.

- A quel(s) pool(s) des ETM présents dans les sols les escargots ont-ils accès ? Ont-ils seulement accès au pool échangeable, ou, comme le suggèrent des travaux récents chez d'autres invertébrés, ont-ils également accès au pool non échangeable ? Si cette dernière hypothèse est vérifiée, quelle est la contribution du pool non échangeable dans ce qui est biodisponible pour *H. aspersa* ?
- Quelle est la biodisponibilité des ETM présents dans les végétaux pour *H. aspersa* ?

La connaissance des différentes sources de transfert chez les invertébrés sont insuffisantes.

- Comment ont lieu les transferts d'ETM dans une chaîne alimentaire sol – plante – escargot ? Peut-on quantifier l'importance relative des transferts "sol – escargot" et "plante – escargot" ?

Les connaissances sur la biodisponibilité et les transferts des polluants organiques chez les invertébrés sont encore plus fragmentaires que pour les ETM et leur devenir dans les tissus des organismes exposés est quasiment inconnu.

- Comment ont lieu les transferts d'un composé organique, l'isoproturon, dans un système sol – plante – escargot ? Peut-on quantifier l'importance relative des transferts "sol – escargot" et "plante – escargot" ? Quelle est la nature et la quantité des résidus issus de l'isoproturon dans les tissus des escargots ?

Les transferts de polluants dans les relations proie – prédateur sont peu étudiés.

- Le Cd accumulé dans les escargots est-il biodisponible pour un prédateur ? Si oui, représente-t-il un risque pour le prédateur ?

Section I.

Le cadmium "non-disponible" d'un sol est biodisponible pour les escargots : preuve expérimentale par la technique de dilution isotopique

Cet article est sous presse dans la revue *Environmental Science and Technology*. Les auteurs sont Renaud Scheifler, Christophe Schwartz, Guillaume Echevarria, Annette de Vaufleury, Pierre-Marie Badot et Jean-Louis Morel.

Résumé

Les techniques de dilution isotopique ont été initialement utilisées pour évaluer la phytodisponibilité des éléments en trace métalliques (ETM) présents dans les sols. Dans cette expérience, nous avons, pour la première fois, utilisé une technique isotopique pour évaluer la zoodisponibilité du cadmium (Cd). Un invertébré terrestre, l'escargot *Helix aspersa*, a été exposé pendant 14 jours à un sol pollué et marqué au ^{109}Cd. La composition isotopique des tissus des escargots a ensuite été déterminée, permettant de calculer la valeur *L*, qui peut être considérée comme une estimation biologique du pool de Cd biodisponible dans le sol. Il a ainsi été démontré que le pool biodisponible pour *H. aspersa* représente 58,0% du Cd total du sol. La valeur E, une estimation chimique du pool labile de Cd dans le sol, a été estimé grâce à des expériences de cinétique d'échanges isotopiques de court terme et à un modèle décrivant l'échange isotopique en fonction du temps. La valeur $E_{(14\ jours)}$ indique que le pool labile de Cd dans le sol représente 49,6% du Cd total du sol. La valeur *L* est significativement supérieure à la valeur *E*, démontrant que les escargots ont accès au pool non-labile du Cd dans le sol, pourtant généralement considéré non-biodisponible. Le pool non-labile contribue à hauteur de 16% au Cd total accumulé dans les tissus de l'escargot. Ces résultats montrent que l'absorption de Cd non-labile par des organismes du sol n'est pas négligeable et devrait être considérée dans les procédures d'évaluation du risque de sites pollués par les ETM.

"Non-available" soil cadmium is bioavailable to snails: Evidence from isotopic dilution experiments

Abstract

Isotopic dilution techniques were initially used to evaluate the bioavailability of trace metals contained in soils to plants, i.e. the phytoavailability. Here, we use for the first time an isotopic technique to evaluate the zooavailability of cadmium (Cd), i.e. the bioavailability to an animal organism. A terrestrial invertebrate, the snail *Helix aspersa*, was exposed for 14 days to a polluted soil that was spiked with ^{109}Cd. Isotopic composition of snail tissues was then determined, allowing the computing of the *L* value, which can be considered as a biological estimate of the bioavailable Cd pool in the soil. It showed that the bioavailable pool of Cd to *H. aspersa* represented 58% of the total soil Cd. The *E* value, a chemical estimate of the soil Cd labile pool, was calculated with short-term isotopic exchange kinetics experiments and a time-dependent model describing the isotopic exchange over time. The $E_{(14\ \mathrm{days})}$ value indicated that the labile soil Cd pool represented 49.6% of the total soil Cd. The *L* value was significantly higher than the *E* value, showing that snails accessed the non-labile soil Cd pool, generally considered as non-bioavailable. The non-labile pool contributed for 16% to the total Cd accumulated by snails. These results showed that the uptake of Cd in the non-labile pool by soil organisms could be important and should be considered in risk assessment procedures for metal polluted soils.

Introduction

Bioavailability of trace metals strongly influences their uptake by soil organisms. The concept of bioavailability is consequently particularly important for many scopes in ecotoxicological studies although it was not clearly defined until recently. It is now well accepted that the bioavailability of metals must be handled as a kinetic process with at least two distinct phases: the environmental availability –a physico-chemically driven desorption process– and the environmental bioavailability –a species-specific physiologically driven uptake process– (*1-3*).

Numerous techniques and approaches were developed to estimate the bioavailable pools of metals for different soil organisms. The simplest approaches consist of measuring metal concentrations in solutions obtained by chemical extraction (including water-extraction), and to mathematically relate these concentrations to internal concentrations in organisms exposed to the soil. However, despite the large number of extractants used, none of them can satisfactorily describe the bioavailable pools in different soils and for different metals and

organisms. This could easily be explained by the huge diversity of soil physico-chemical characteristics, metal behaviour, exposure routes and uptake mechanisms. Furthermore, even if soil concentrations and organism concentrations are related by a satisfactory relationship, this does not mean that metal ions extracted by the chemicals belong to the same fraction as the bioavailable pool for a particular organism (*4*).

An alternative approach, the so-called pore-water hypothesis or equilibrium partitioning theory (*1, 5, 6*) was recently developed. This approach is based on the assumption that metal uptake by soil invertebrates is governed by transport *via* the soil pore-water and that direct uptake from the soil solid phase is negligible. This hypothesis was shown to be valid to characterise the bioavailability of organic chemicals for soft-bodied organisms like earthworms (*7-9*). However, due to their complex physico-chemical behaviour in soils, evidence for the pore-water hypothesis is only circumstantial for metals (*5, 10*). Moreover, recent studies have found that cadmium (Cd) (*11*) or copper (Cu) (*12*) concentrations in Collembolans exposed to contaminated soils were poorly correlated to soil solution concentrations. In agreement with these studies, Oste et al. (*13*) have recently questioned the pore-water hypothesis for Cd in *Lumbricus rubellus* earthworms and suggested that uptake of Cd from other sources than the pore-water (as the "intestinal uptake of soil particulates", for instance) should not be neglected.

An unequivocal answer to the above debate is of critical importance for risk assessment in metal polluted areas, and a technique to quantitatively evaluate the pool that is actually bioavailable to soil organisms would greatly improve risk assessment procedures. Isotopic dilution techniques (IDT), initially used to characterise the phytoavailability of some macronutrients (e.g., P and K) (*14-18*) were successfully used to evaluate the phytoavailable pool of several metallic trace elements (MTE) such as Cd, Ni and Zn (*4, 19, 20*). However, IDT have never been used to study the zooavailability of MTE.

IDT principle

If a low amount of metal radioisotope (as metal ion in solution) is thoroughly mixed with soil, it is rapidly distributed within the isotopically exchangeable metal pool (*21, 22*) without modifying the chemical equilibrium of the metal between the solid and the liquid phase of the soil. The isotopically exchangeable metal pool, also called the "soil Cd labile pool", corresponds to the pool of the element from the soil solid phase that may supply the soil solution during a given period of time. This pool is characterised by its isotopic composition (ratio of the radioisotope to the stable element), from which the *E* value can be calculated. The *E* value thus corresponds to a chemical estimate of the labile pool and is expressed in $mg.kg^{-1}$. By contrast, the non-isotopically exchangeable metal pool, or "soil Cd non-labile pool", is constituted of Cd strongly bound to the soil solid phase that cannot supply the soil

solution during this time period. Its isotopic composition is 0 since the radioisotope is not able to mix with it within the contact time allowed.

Exposed organisms that take up Cd only from the labile pool would exhibit the same isotopic composition as the labile Cd pool in the soil itself, whereas organisms that are able to mobilise non-labile forms would exhibit lower isotopic composition than the labile Cd pool in the soil. From the isotopic composition of the organism tissues, the *L* value can be calculated for the exposure duration considered. The *L* value thus corresponds to a biological estimate of the actual zooavailable metal pool and is also expressed in $mg.kg^{-1}$. Differences between *L* and *E* values should provide quantitative estimates of the mobilisation of non-labile metal in the soil by the studied organism.

The aims of this work were therefore (1) to use for the first time an isotopic dilution technique to evaluate the bioavailability of Cd to an animal organism, the terrestrial snail *Helix aspersa*, (2) to show whether snails exposed to an industrially polluted soil take up Cd only from the labile pool or from both labile and non-labile pools; and (3) to quantitatively estimate the size of the bioavailable pool in this soil. It was however not aimed in this study at distinguishing the possible exposure routes (i.e. mainly dermal and oral routes). The final objective of this work is to provide a novel technique for estimating metal bioavailability to soil invertebrates.

Experimental section

Animals. Juvenile garden snails (*Helix aspersa* Müller) aged 1 month and weighing (average fresh mass ± standard deviation, n = 40) 0.98 ± 0.08 g were obtained from our standardised laboratory rearing (*23*). The initial Cd concentration in snail tissues was 0.79 ± 0.42 $mg.kg^{-1}$.

Experimental designs.

Main experiment. In a first design, 10 snails were exposed to a polluted ^{109}Cd-spiked soil. The soil was collected in the Ap horizon of an agricultural site aerially polluted by a former lead and zinc smelter in northern France (*Région Nord-Pas de Calais*). The physico-chemical characteristics of this soil are presented in Table 1. The soil was air-dried and sieved to < 5mm, then was spiked at 1.4×10^5 $Bq.kg^{-1}$ of soil using 100 ml of an ultrapure water solution containing carrier-free radioactive $CdCl_2$ (New England Nuclear, purity grade: 99.0 %, specific activity: 14.775×10^6 $Bq.\mu g^{-1}$ Cd). The quantity of Cd added to 1 kg of spiked soil was 0.0095 µg. The soil was manually mixed with the radioactive solution for 15 minutes to ensure homogeneity. Then, the soil was incubated for 6 hours and used to fill polystyrene

crystal boxes (24 x 10 x 8 cm, volume of 1.6 dm^3, IFFA CREDO, ref. 08.0001). Each box was filled with 300 g (dry mass) of soil. The humidity of the soil was fixed at 80% of the water holding capacity (WHC). The snails were exposed for 14 days in the boxes, which were kept under controlled conditions (20 ± 1°C, 18/6 h day/night cycle). During this 14-day period, the WHC was maintained constant by spraying ultrapure water, which also maintained snails active.

TABLE 1. Physico-chemical characteristics of soils.

Characteristic	Polluted soil	Unpolluted soil
Clay, $g.kg^{-1}$ †	202	215
Organic matter, $g.kg^{-1}$	42.1	29.6
C/N ‡	16.8	9.1
PH_{H2O}§	6.2	7.0
Total $CaCO_3$, $g.kg^{-1}$¶	< 1	< 1
P_2O_5, $g.kg^{-1}$#	0.024	0.020
CEC, $cmol.kg^{-1}$††	13.3	12,3
Total Cu, $mg.kg^{-1}$	83.9	12.5
Total Zn, $mg.kg^{-1}$	3253.6	47.9
Total Ni, $mg.kg^{-1}$	23.3	22.0
Total Pb, $mg.kg^{-1}$	988.6	15.8
Total Cd, $mg.kg^{-1}$	20.31	0.08

† Granulometric analysis (standard NF X 31-107, AFNOR, 1983).
‡ C/N: organic carbon determined by sulfochromic oxidation (standard NF X 31-109), N by dry combustion (standard NF ISO 13878, AFNOR, 1993, 1998).
§ pH: standard NF ISO 10390 (AFNOR, 1994).
¶ $CaCO_3$: standard NF X 10693 (AFNOR, 1995).
# P_2O_5: standard NF X 31-161 (AFNOR, 1993).
†† CEC: cationic exchange capacity (standard NF X 31-130, AFNOR, 1993).

Additional experiments. Additional experiments were used (1) as control to assess the possible toxicity (with growth and food consumption as endpoints) of high soil metal concentrations and radioactive labelling to snails and (2) to provide data that will be used in the calculations of the isotopic composition of snail tissues, as described further. In these additional experiments, snail groups (10 individual each) were exposed, in the same conditions than those used for the main experiment, to the polluted but non-labelled soil or to a non-polluted and non-labelled agricultural soil. The non-polluted agricultural soil displayed physico-chemical properties similar to those of the polluted soil (Table 1) and was collected

from the Ap horizon of a cultivated field, located far from any source of metallic pollution in north-eastern France (*Région Lorraine*).

Snail feeding. In main as well as in additional experiments, snails were fed with a known quantity of fresh lettuce (cv. "Reine de Mai"). The Cd concentration of the lettuce leaves offered to the snails was 0.13 ± 0.04 $mg.kg^{-1}$. The lettuce was distributed in small glass containers (7 cm diameter, 4 cm high) to avoid contact with the soil. Lettuce was cultivated on the non-polluted soil moistened to 80% of its water-holding capacity (WHC, measured at 0.01 MPa). Pots were placed in a growth chamber at 16/8h day/night cycle photoperiod (16-24°C), relative humidity 80% and light intensity 500 µmol $photons.m^{-2}.s^{-1}$. The water content of soils was maintained at 80% WHC by daily watering with deionised water. Fertilisation was applied on all pots after 15 days of culture (NH_4NO_3 0.17 $g.L^{-1}$, NaH_2PO_4 0.086 $g.L^{-1}$, KOH 0.308 $g.L^{-1}$, $Ca(NO_3)_2$, $4H_2O$ 0.094 $g.L^{-1}$).

Determination of snail growth and consumption and snail sampling. In main as well as in additional experiments, individual snail fresh mass was measured at the beginning and at the end of the experiment to estimate growth. At each feeding, the unconsumed lettuce was sampled, dried in an oven (80°C) to constant mass then weighed. This mass was subtracted from the estimated dry mass corresponding to the known quantity of fresh lettuce given at the previous feeding. The dry mass was estimated from the fresh mass with the following equation describing the relationship between fresh (x) and dry (y) mass of 18 samples of lettuce ($y = 0.1019x + 0.0008$, $R^2 = 0.952$, $p < 0.0001$). The consumption was expressed as mg of dry mass of lettuce consumed per snail. In all experiments, the snails were sampled once, after 14 days of exposure, sacrificed by deep-freezing and analysed as described in the "Chemical analysis" paragraph of this section.

Calculation of soil parameters: the isotopic composition of Cd in the soil solution, IC_s, and the quantity factor at time t, $E_{(t)}$.

Calculation of IC_s. The isotopic composition of Cd in the soil solution, IC_s, is defined by the following equation (Eq. [a]) *(20)*:

$$IC_s = \frac{\left(r_t / R_s \right)}{Cd_s} \qquad [a]$$

Where r_t is the radioactivity in the soil solution a time t (Bq), R_s is the total radioactivity introduced in 1 kg of dry soil at time $t = 0$ (Bq), Cd_s is the quantity of Cd (mg) in soil solution. IC_s is expressed as mg^{-1}. In order to compare IC_s with the isotopic composition of snail tissues (IC_a), r_t must be divided by R_s. To simplify the calculations and to allow valid comparisons, all values are related to 1 kg of dry soil.

In a soil spiked with a small enough quantity of ^{109}Cd not to disturb the chemical equilibrium of the stable element, r_t, the radioactivity in the soil solution, cannot be measured after several hours because of its sharp decrease with time due to the fast dilution of ^{109}Cd ions in the soil solid phase. The parameter r_t / R_s must therefore be extrapolated to the experiment duration from a fitted mathematical model describing the decrease of radioactivity in the soil solution with time. This model takes into consideration the natural Brownian movement of molecules in biphasic systems (*4*) and has been successfully verified for elements that have very different behaviours and fate in the soil such as Ca, Cd, K, Na, Ni, P and Zn (*4, 17, 18, 24*). This model has been described in detail (*4*) and has the following form (Eq. [b]):

$$\frac{r_t}{R_s} = \frac{r_1}{R_s}\left[t + \left(\frac{r_1}{R_s}\right)^{\frac{1}{n}}\right]^{-n} + \frac{Cd_s}{Cd_T} \qquad [b]$$

Where Cd_T is the total soil Cd (related to 1 kg and expressed as mg) and r_1 / R_s and n are 2 parameters that describe the decrease of radioactivity in soil solution with time. r_1 / R_s corresponds to the ratio of the radioactivity in soil solution after 1 min to the total radioactivity introduced in the system at t = 0 and n is the coefficient of the linear regression between ln(r_t / R_s) and ln(t). The linear regression is fitted by data provided by a short-term (100 min) isotopic exchange kinetics (IEK) experiment.

IEK Experiments. Soil to water ratios of 10 g of soil in 99 mL deionised water were used (five replicates). To reach chemical stationary state and a constant Cd concentration in the solution, the suspensions were shaken for 18 h on an end-over-end shaker. One ml of a carrier-free $^{109}CdCl_2$ solution (corresponding to 9.10^5 Bq) was injected into each of the five replicate suspensions under constant stirring. Three aliquots of the suspension were sampled with a syringe after exchange times of 1, 10, 40 and 100 min., and immediately filtered on cellulose nitrate (porosity 0.2 µm). The radioactivity in the solution was then measured by γ–spectrometry (Packard Cobra Auto-Gamma Counting Systems, Packard Instrument Company, Meriden, CT). At the end of each sampling series, samples of the suspension were filtered at the same porosity to measure stable Cd concentrations in solution.

Calculation of $E_{(t)}$. The quantity factor $E_{(t)}$ represents the quantity of Cd from the soil that is able to exchange with Cd in the soil solution during the time t. It can be extrapolated to the experiment duration or any other duration with Eq. [c]. This equation can be derived from Eq. [a] with the hypothesis that the specific radioactivity of the isotopically exchangeable Cd pool

(i.e. the ratio R_s / $E_{(t)}$) is the same as that of the soil solution over time (i.e. the ratio r_t / Cd_s). Therefore, the Eq. [a] can be expressed (Eq. [c]):

$$\frac{r_t / R_s}{Cd_s} = \frac{R_s / R_s}{E_{(t)}} = \frac{1}{E_{(t)}} = IC_s \qquad [c]$$

Since $E_{(t)}$ is the inverse of IC_s and is related to 1 kg of soil, its unit is the mg.kg^{-1}.

Calculation of isotopic composition of Cd in animals (IC_a) and *L* value.

Calculation of IC_a. After introduction into the soil, ^{109}Cd is diluted into various pools through the process of isotopic exchange. When animals take up Cd from the soil zooavailable pools, they absorb a portion of ^{109}Cd. The IC_a value reflects the dilution of ^{109}Cd in the total Cd quantity accumulated by the animals and is expressed as follows (eq. [d]):

$$IC_a = \frac{r_a / R_a}{Cd_a} \qquad [d]$$

Where r_a is the radioactivity in snail tissues (Bq), R_a is the total radioactivity introduced into 1 kg of dry soil used to expose snails (Bq), and Cd_a is the quantity of Cd (mg) accumulated in snail soft tissues (related to 1 kg of dry soil). As IC_s, IC_a is expressed as mg^{-1}. To allow valid comparison with IC_s, r_a is divided by R_a.

To take into account the initial amount of Cd in snail tissues and the Cd provided by the lettuce during the experiment, Cd_a was calculated by subtracting the amount of Cd accumulated in snails exposed to the non-polluted soil (one of the additional experiments) to the amount of Cd accumulated in snails exposed to the polluted one (main experiment). Previous experiments that are not described in this paper suggested that this estimate was accurate enough to be used in the calculations.

Calculation of L value. A biological estimate of the bioavailable pool of Cd in soil, called the *L* value, can be calculated from the *IC* of the studied animal:

$$\frac{r_a / R_a}{Cd_a} = \frac{R_a / R_a}{L_{(t)}} = \frac{1}{L_{(t)}} = IC_a \qquad [e]$$

As for the calculation of $E_{(t)}$, Eq. [e] assumes that the specific radioactivity of Cd accumulated by the organism is the same as the specific radioactivity of bioavailable Cd in soil. Since $L_{(t)}$ is the inverse of IC_a and is related to 1 kg of soil, its unit is the mg.kg^{-1}.

If snails take up non-labile (unlabelled) Cd, this will cause a decrease in the specific activity of the isotope in the snail tissues and an increase of the *L* value over the *E* value. Thus, the difference between *L* and *E* values would provide a quantitative estimate of the mobilisation of non-labile metal by the snail.

Chemical analysis. Total Cd concentrations in the soil were determined after digestion of samples by HF and $HClO_4$, using Inductively Coupled Plasma (Yvon-Jobin, JY 238-ICP, calculated detection limit: 1.1 $\mu g.kg^{-1}$). At the end of the experiment, snails were starved for 48 hours before being frozen at –20°C. After defrosting, soft tissues were removed from their shells. Care was taken during dissection to check that the gut was actually empty (soil particulates or lettuce in the gut can easily be seen because of the transparency of the digestive system walls in juvenile snails). The tissues were then oven dried at 80°C to constant mass, ground, and digested in 4 mL HNO_3 in a drying oven at 60°C for 48 hours. Total Cd concentrations were measured by ICP and radioactive Cd by γ–spectrometry. Validity of analytical methods was checked by means of standard biological reference materials (TORT-2, lobster hepatopancreas from NRCC-CNRL, Canada). Cd values were consistently within 5% of the certified values; the average percentage of recovery (calculated as the ratio of the found concentration to the certified concentration multiplied by 100) was 102.1%.

Statistical treatments. The snail growth and soil consumption among the different experiments were compared with the non-parametric test of Kruskal-Wallis (*25*). To compare IC_a and IC_s, the non-parametric Mann-Whitney for comparison of 2 independent samples was used (*25*).

Results and Discussion

Effect of polluted soil and labelling on snails. No mortality occurred during the experiments. Snail growth was significant (mean gain of fresh mass per snail within the 2 weeks of experiment: 0.39 g), without any difference among groups (Table 2). No differences in activity and behaviour among the different snail groups were observed, suggesting that the snails exposed to the contaminated and/or labelled soil did not try to avoid the contact with soil. In all boxes, snails were equally found dwelling on the soil or on the plastic box walls or eating lettuce in the glass container. The lettuce consumption by snails was very similar among treatments, without any significant difference among groups (Table 2). Therefore, neither soil contamination nor soil labelling were shown to have toxic effects on snail growth and consumption in these experimental conditions. These results are in agreement with numerous studies that have shown the high tolerance of *H. aspersa* snails to trace metals, including Cd (*26, 27*).

TABLE 2. Initial and final snail fresh mass (g) of *Helix aspersa* snails exposed for 14 days to the soils and dry mass (g) of consumed lettuce (n = 10, mean ± standard deviation).

	Labelled polluted soil	Non-labelled polluted soil	Non-polluted soil
Initial mass	0.98 ± 0.10	0.97 ± 0.06	1.00 ± 0.08
Final mass	1.40 ± 0.18	1.31 ± 0.14	1.41 ± 0.17
Consumption	0.291 ± 0.042	0.283 ± 0.022	0.284 ± 0.053

Soil parameters. In short-term IEK experiments, the isotopic composition of Cd in the soil solution decreased sharply with time. This isotopic exchange was well described by the linear regressions fitted with the IEK data. The coefficients of these linear regressions were always significant ($p < 0.02$) and varied from 0.965 to 997. The regression parameters (i.e. r_1 / R_s and n, Table 3) were used to fit the time-dependant mathematical model describing the isotopic exchange over time. The model allowed calculation of E values for different durations (Table 3). The $E_{(0-1\ min)}$ value, corresponded to 4.4 mg.kg^{-1}, i.e. 21.7% of the total soil concentration. This $E_{(0-1\ min)}$ is usually considered as the capacity factor in isotopic studies, i.e. the capacity of the soil to supply the solution with Cd. The $E_{(0-1\ min)}$ value found in the present study is two times higher than the values measured with the same technique by Gérard *et al.* (*20*) for limed silt loam soils, showing that the buffer power of the studied soil is high. The $E_{(1\ min-14\ days)}$ value represented 5.7 mg.kg^{-1}, i.e. 28% of the total Cd concentration in the soil. The $E_{(0-14\ days)}$ value, which corresponds to the exposure duration of snails, was 10.1 mg.kg^{-1}, i.e. 49.7% of the total Cd concentration. This proportion of labile Cd on the total soil Cd is in agreement with the values reported by Ahnstrom and Parker (*28*) in 4 soils with high Cd concentrations coming from different sources. In this latter study, the E values for 14 days ranged from 13 to 49% of total Cd concentrations in the soils (*28*). In the study of Gérard *et al.* (*20*), the labile pool represented 40.5 to 66.5% within 30 days, which is also in agreement with the present value. However, the lability of Cd across diverse soil types and Cd sources was shown to be extremely different, from a few % to the totality of Cd in soil (*28-30*). With half of the soil Cd being isotopically exchangeable after a relatively short period of 14 days, the environmental availability of Cd in the present soil can be considered high.

TABLE 3. Isotopic exchange kinetics parameters obtained from short-term IEK experiments and time dependent isotopically exchangeable pools of soil Cd (n = 5, mean ± standard deviation). The percentage of isotopically exchangeable Cd from total soil Cd is indicated in brackets.

Cd_s (mg)	0.0095 ± 0.0068
r_1 / R_s	0.0085 ± 0.0009
n	0.128 ± 0.019
$E_{(0-1\ min)}$	4.40 ± 0.40 (21.7%)
$E_{(1\ min-14\ days)}$	5.68 ± 1.02 (28.0%)
$E_{(0\ min-14\ days)}$	10.08 ± 1.27 (49.7%)
$E_{(>14\ days)}$	10.23±1.27 (50.3%)

$E_{(t)}$ unit in mg.kg^{-1} soil.

Comparison of soil and snail isotopic compositions. From the snail parameters (Table 4), the mean IC_a value was calculated. The IC_a value (5.07 mg^{-1}) was significantly lower (Mann-Whitney test, $p < 0.05$) than the mean IC_s value (6.03 mg^{-1}) of the studied soil, showing that snails were able to access the Cd non-labile pool (Figure 1). The corresponding L value was 11.85 mg.kg^{-1} and corresponded to 58% of the total soil concentration. The L value exceeded the $E_{(0-14\ days)}$ value by a factor of 1.18. This result demonstrates, for the first time, that a terrestrial invertebrate is able to take up Cd from the non-labile pool, which is usually thought to be non-bioavailable. From the isotopic composition of snail tissues (5.07 mg^{-1}) and of the labile (6.03 mg^{-1}) and non-labile (theoretically 0) pools, we calculated the contribution of labile and non-labile pools to the snail bioavailable pool. This calculation showed that 84% of Cd came from the labile pool but that the contribution of the non-labile (16%) was not negligible (Figure 1). This result is of particular importance since it shows that the pore-water hypothesis and the partitioning equilibrium concept could significantly underestimate the bioavailable metal pool to soil invertebrates.

TABLE 4. Snail parameters (n = 10, mean ± standard deviation).

Cd concentration (mg.kg^{-1}, dry mass)	Cd_a (mg)	r_a/R_a	L (mg.kg^{-1} soil)
25.8 ± 13.9	0.0090 ± 0.0053	0.00075 ± 0.00042	11.85 ± 0.40

Some characteristics of nutrient uptake by snails from the environment may explain their ability to take up Cd partly from the soil solid phase. As other soft-bodied soil invertebrates like earthworms (*13*), terrestrial snails take up metals in soils by intestinal and cutaneous uptake (*31-33*). Terrestrial snails, which can consume important quantities of soil in their diet

(*34, 35*), have a complex digestive system (oesophagus, salivary glands, oesophageal crop, gastric pouch, digestive gland, intestine) in which the ingested material is submitted to long trituration and attack by numerous enzymes produced by the digestive system itself or associated bacteria (*36*). Some of these enzymes were shown to be strong enough to degrade tough material such as cellulose or chitin (*36*), thus may be able to dissociate Cd strongly bound to soil particulates. Moreover, certain digestive and cutaneous cells of terrestrial molluscs are capable of endocytosing particulate matter (*37-38*), which may contain non-labile Cd.

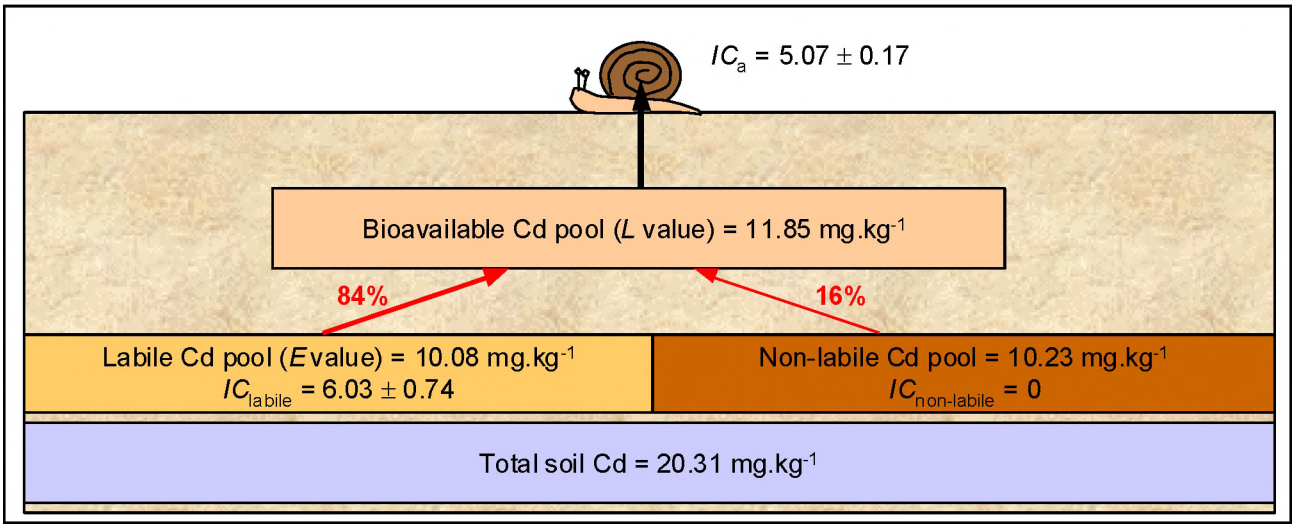


FIGURE 1. Theoretical representation of Cd pools in soil: total soil Cd, labile and non-labile pools and bioavailable pool to *H. aspersa* snails for a 14-day exposure period. The percentages represent the contribution of the labile and non-labile pool in the snail bioavailable pool.

This work provides the first data on the bioavailability of a metal to a soil invertebrate obtained with the isotopic technique. Therefore, no comparison with similar studies can be made. Works on Cd phytoavailability showed that the studied plant species accessed only the labile Cd pool in soil, even though they were able to modify the physico-chemical properties in the rhizosphere to mobilise metals (alteration of pH or production of metal-solubilising root exudates, (*39*)). Lettuce *Lactuca sativa* and rye-grass *Lolium perenne* were shown to take up metals only in the labile Cd pool in 4 soils with very different total Cd concentrations (*20*). Surprisingly, hyperaccumulator species like *Thlaspi caerulescens*, which take up and accumulate large quantities of Cd in their tissues, were also shown to access the labile pool only (*20, 40*). We found only one study that reported *L* values higher than *E* values, suggesting that the plant (wheat), grown in a range of 10 Belgian soils, accessed non-labile Cd pool (*41*). However, these soils had very small levels of Cd contamination and more than 95% of the total soil Cd was labile.

Further studies are needed to assess whether some plants are able, like snails in the present experiment, to take up metals in the non-labile pool of polluted soil. It is also necessary to extend the use of this technique to other soil invertebrates to test whether

terrestrial snails, which are macroconcentrators of Cd (*31*), constitute a particular case among soil fauna or if other soil invertebrates are also able to access non-labile Cd in soils. On the basis of these studies, isotopic techniques would greatly improve knowledge on metal zooavailability and, thus, risk assessment procedures.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the members of the Laboratoire Sols et Environnement, and especially S. Colin, J. Fismes, A. Rakoto and P. C. Vong for technical assistance. Special thanks are due to S. Massoura for invaluable help in IEK experiments. We thank M. Cœurdassier, J.-C. Fardeau, P. Giraudoux, L. Gomot and F. Raoul for many fruitful discussions. Three anonymous referees are warmly thanked for their very helpful suggestions to improve the manuscript. This research was financially supported by ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Paris 75737, project no. 963019) and by the Conseil Régional de Franche-Comté.

Literature cited

AFNOR. NF ISO 10390 standard. Qualité du sol. Détermination du pH. AFNOR, Paris. 1994.

AFNOR. NF ISO 10693 standard. Qualité du sol. Détermination de la teneur en carbonate. Méthode volumétrique. AFNOR, Paris. 1995.

AFNOR. NF ISO 13878 standard. Qualité du sol. Détermination de la teneur totale en azote par combustion sèche (analyse élémentaire). AFNOR, Paris. 1998.

AFNOR. NF X 31-107 standard. Qualité des sols. Analyse granulométrique par sédimentation. Méthode de la pipette. AFNOR, Paris. 1983.

AFNOR. NF X 31-109 standard. Qualité des sols. Détermination du carbone organique par oxydation sulfochromique. AFNOR. NF X 31-161 standard. Détermination du phosphore soluble dans une solution d'oxalate d'ammonium. AFNOR. NF X 31-130. Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC) et des cations extractibles. AFNOR, Paris. 1993.

(1) Hamelink, J. L.; Landrum, P. F.; Bergman, H. L.; Benson, W. H. *Bioavailability. Physical, chemical, and biological Interactions*; CRC Press: Boca Raton, FL, 1994.

(2) Peijnenburg, W. J. G. M.; Posthuma, L.; Zweers, P. G. C.; Baerselman, R.; De Groot, A.; Van Veen, R. P. M.; Jager, T. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1999**, 43, 170-186.

(3) Peijnenburg, W. J. G. M.; Baerselman, R.; De Groot, A.; Jager, T.; Posthuma, L.; Van Veen, R. P. M. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1999**, 44, 294-310.

(4) Echevarria, G.; Morel, J.-L.; Fardeau, J. C.; Leclerc-Cessac, E. *J. Environ. Qual.* **1998**, 27, 1064-1070.

(5) Spurgeon, D. J. In *Bioavailability as a key property in terrestrial ecotoxicity assessment and evaluation*; Fraunhofer IRB Verlag: 1997; 71-84.

(6) Peijnenburg, W. J. G. M.; Posthuma, L.; Eijsackers, H. J. P.; Allen, H. E. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1997**, 37, 163-172.

(7) Belfroid, A. C. *Toxicokinetics of hydrophobic chemicals in earthworms*. PhD Thesis, University of Utrecht, Utrecht, 1994.

(8) Van Gestel, C. A. M.; Ma, W. C. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **1988**, 15, 289-297.

(9) Van Gestel, C. A. M.; Ma, W. C. *Chemosphere* **1990**, 21, 1023-1033.

(10) Belfroid, A.; Sijm, D.; Van Gestel, C. A. M. *Environ. Rev.* **1996**, 4, 276-299.

(11) Crommentuijn, T.; Doornekamp, A.; Van Gestel, C. A. M. *Appl. Soil Ecol.* **1997**, 5, 261-271.

(12) Bruus Pedersen, M.; Temminghoff, E. J. M.; Marinussen, M. P. J. C.; Elmegaard, N.; Van Gestel, C. A. M. *Appl. Soil Ecol.* **1997**, 6, 135-146.

(13) Oste, L. A.; Dolfing, J.; Ma, W. C.; Lexmond, T. M. *Environ. Toxicol. Chem.* **2001**, 20, 1785-1791.

(14) Fardeau, J. C. *Cinétiques de dilution isotopique et phosphore assimilable des sols*. PhD Thesis, Université Paris VI, Paris, 1981.

(15) Fardeau, J. C.; Guiraud, G.; Hetier, J. M. In *Proc. of the First European Symposium, Treatment and use of sewage sludge*; Alexandre, D., Ott, H. Eds.; Commission of the European Communities, DG for Research Science and Education XII/255/81, Brussels, Belgium, 1979.

(16) Fardeau, J.-C.; Jappé, J. *C. R. Acad. Sci. Paris* **1976**, 282, 1137-1140.

(17) Frossard, E.; Fardeau, J. C.; Brossard, M.; Morel, J.-L. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1994**, 58, 846-851.

(18) Sinaj, S.; Frossard, E.; Fardeau, J. C. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1997**, 61, 1413-1417.

(19) Sinaj, S.; Mächler, F.; Frossard, E. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1999**, 63, 1618-1625.

(20) Gérard, E.; Echevarria, G.; Sterckeman, T.; Morel, J.-L. *J. Environ. Qual.* **2000**, 29, 1117-1123.

(21) Tiller, K. G. In *Isotopes and radiation in research on soil-plant relationships*; International Atomic Energy Agency, Vienna, IAEA-SM-2350/50, 1979.

(22) Tiller, K. G.; Honeysett, J. L.; de Vries, M. P. C. *Soil Res.* **1972**, 10, 151-164.

(23) Gomot-de Vaufleury, A. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2000**, 46, 41-50.

(24) Fardeau, J. C.; Morel, C.; Boniface, R. *Agronomie* **1991**, 11, 787-797.

(25) Siegel, S.; Castellan, N. J. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*; Mc Graw-Hill International Editions: New York, NY, 1988.

(26) Berger, B.; Dallinger, R. *Environ. Monit. Assess.* **1993**, 25, 65-84.

(27) Gomot, A. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1997**, 33, 209-216.

(28) Ahnstrom, Z. A. S.; Parker, D. R. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 121-126.

(29) Nakhone, L. N.; Young, S. D. *Environ. Pollut.* **1993**, 82, 73-77.

(30) Young, S. D.; Tye, A.; Carstensen, A.; Resende, L.; Crout, N. *Eur. J. Soil Sc.* **2000**, 51, 129-136.

(31) Dallinger, R. In *Ecotoxicology of metals in invertebrates*; Dallinger, R., Rainbow, R., Eds; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1993; 245-289.

(32) Van Straalen, N. M.; Van Gestel, C. A. M. In *Handbook of Ecotoxicology*; Calow, P., Ed.; Blackwell Science: Oxford, 1998; 251-277.

(33) Gomot-de Vaufleury, A.; Bispo A. *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 1865-1870.

(34) Chevalier, L.; Desbuquois, C.; Le Lannic, J.; Charrier, M. *C.R. Acad. Sc. Paris* **2001**, 324, 979-887.

(35) Elmslie, L. J. *J. Moll. Stud.* **1998**, 64, 400-401.

(36) Dimitriadis, V. K. In *The Biology of Terrestrial Molluscs*; Barker, G. M., Ed.; CABI Publishing: Oxon, 2001; 237-257.

(37) Ryder, T. A.; Bowen, I. D. *Cell Tiss. Res.* **1977**, 181, 129-142.

(38) Simkiss, K.; Mason, A. Z. In *The Mollusca: Environmental Biochemistry and Physiology*; Hochachka, P. W., Ed.; Academic Press: New York, NY, 1983; 101-163.

(39) Grinsted, M. J.; Hedley, M. J.; White, R. E.; Nye, P. H. *New Phytol.* **1982**, 91, 19-29.

(40) Hutchinson, J. J.; Young, S. D.; McGrath, S. P.; West, H. M.; Black, C. R.; Baker, A. J. M. *New Phytol.* **2000**, 146, 453-460.

(41) Smolders, E.; Brans, K.; Földi, A.; Merckx, R. *Soil Sc. Soc. Am. J.* **1999**, 63, 78-85.

Section II.

Transfert du cadmium depuis des plantes et des farines végétales vers l'escargot *Helix aspersa* : bioaccumulation et effets

Cette expérience a fait l'objet d'un article publié en 2002 dans la revue *Ecotoxicology and Environmental Safety* (53: 148-153). Les auteurs sont Renaud Scheifler, Annette Gomot-de Vaufleury et Pierre-Marie Badot.

Résumé

Des escargots (*Helix aspersa*) juvéniles ont été exposés pendant 4 semaines à des feuilles de colza (*Brassica napus*), contaminées en surface (pour simuler un dépôt atmosphérique) par des concentrations croissantes en cadmium (Cd). Les concentrations des feuilles sont de 0,1 $\mu g.g^{-1}$ de Cd pour les témoins et de 38,4; 93,1 et 177,2 $\mu g.g^{-1}$ pour les feuilles contaminées. Les concentrations dans les tissus des escargots augmentent avec l'augmentation des concentrations dans leur nourriture. Les facteurs de bioaccumulation (FBAs) vont de 4,8 pour le groupe témoin à 2,4 pour le groupe exposé à la plus forte concentration. Ces FBAs montrent qu'une biomagnification survient dans cette chaîne alimentaire simplifiée. La croissance des groupes d'escargots exposés est réduite de 17, 24 et 43%, respectivement, par rapport aux témoins. La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus chez des escargots exposés à une farine végétale contaminée à des concentrations similaires montre que la bioaccumulation et les effets sont similaires, ce qui indique que la biodisponibilité du Cd dans les 2 types d'aliment (feuilles et farines végétales) est comparable. Les tests d'écotoxicité utilisant des escargots *H. aspersa* exposés à des farines végétales ou à des plantes fraîches contaminées par des éléments en trace métalliques peuvent constituer de bons outils dans une perspective d'évaluation du risque.

Ecotoxicology and Environmental Safety **53**, 148–153 (2002)
Environmental Research, Section B
doi:10.1006/eesa.2002.2216

Transfer of Cadmium from Plant Leaves and Vegetable Flour to the Snail *Helix aspersa:* Bioaccumulation and Effects

R. Scheifler, A. Gomot-de Vaufleury,[1] and P.-M. Badot

Université de Franche-Comté, Institut des Sciences et Techniques de l'Environnement, Laboratoire de Biologie et Ecophysiologie, EA 3184 MRT USC INRA, Place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France

Received November 1, 2001

Juvenile *Helix aspersa* snails were exposed for 4 weeks to fresh rape leaves (*Brassica napus*), contaminated by simulating superficial deposits of increasing concentrations of cadmium (Cd). The Cd concentration in leaves was 0.1 in control and 38.4, 93.1, and 177.2 $\mu g \cdot g^{-1}$ (dry mass) in Cd-treated food. The concentration in snail tissues increased with increasing Cd concentrations in the food. The bioaccumulation factors ranged from 4.8 (control) to 2.4 (highest exposed group), indicating a biomagnification of Cd in this food chain. The growth of the snails treated with Cd was reduced by 17, 24, and 43% respectively, compared to the control group. Comparison of these results with those obtained with snails exposed to similar Cd concentrations in a vegetable flour revealed that accumulation and effects were relatively consistent, demonstrating a comparable bioavailability of Cd in the two diets. Tests using growing *H. aspersa* snails exposed to metals in flour or fresh leaves can be useful for risk assessment purposes. © 2002 Elsevier Science (USA)

Key Words: **cadmium; transfer; bioavailability; bioaccumulation; effects.**

INTRODUCTION

Cadmium and Cd-containing compounds are mainly used for nickel/cadmium batteries, anticorrosive coating of metals, and pigments, and as stabilizers for plastic (Stoeppler, 1991). The total annual input of Cd into the atmosphere is estimated at approximately 7000 tons per year with more than 90% coming from anthropogenic sources (Nriagu and Pacyna, 1988). Some of the cadmium emitted from smelters, waste incineration plants, and other sources is deposited far from the source, leading to a low but steady increase in background Cd levels. However, another part of the emitted Cd is deposited close to the point source and can lead to rapid and heavy soil and plant contamination. Indeed, the Cd concentrations in soil and in some cultivated plants such as lettuce or cabbage leaves can reach more than 100 $\mu g \cdot g^{-1}$ (Kabata-Pendias and Pendias, 1992).

Among terrestrial invertebrates, *Helix aspersa* snails have been extensively used in laboratory experiments to study the accumulation and/or deleterious effects of Cd (Russell *et al.*, 1981; Laskowski and Hopkin, 1996a, b; Gomot, 1997; Gomot-de Vaufleury and Kerhoas, 2000). In these experimental studies, the diets used to expose snails to Cd were artificial food (agar-based) or vegetable flours in which the Cd was homogeneously distributed. However, these types of food and exposure are different from the real ecological situation, in which a large proportion of the Cd is present on plants as superficial deposits (Roberts, 1972; Little, 1973). It is not known whether the Cd accumulation and the resulting effects obtained in experiments using such complex diets are comparable to what could be obtained with a more representative diet, i.e., fresh leaves mainly contaminated by superficial deposits of Cd.

The aim of this study was first to evaluate the transfer and the effects of Cd from leaves, contaminated by deposits of Cd on their surface, to the garden snail *H. aspersa*. Rape (*Brassica napus*), a widely cultivated plant, was chosen as food for the snails. Second, the bioavailability of Cd between this food and a vegetable flour was compared, using snail material from a previous experiment (Gomot, 1997), where snails were exposed to Cd-contaminated Helixal flour and then stored at $-20°C$ until further analysis in the present study. Since this Helixal flour is used in standardized tests to evaluate the effects of pollutants on the growth of juvenile snails (NFX 31-255-1, 2001a; NFX 31-255-2, 2001b), it seemed important to test whether the bioavailability of Cd in the flour differs from that in fresh plant leaves.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Procedure

Juvenile brown garden snails *H. aspersa aspersa* Müller from the authors' laboratory were reared under standard conditions, as described elsewhere (Gomot-de Vaufleury,

[1]To whom correspondence should be addressed. Fax: + 33(0)381 665 797. E-mail: annette.devaufleury@univ-fcomte.fr.

0147-6513/02 $35.00
© 2002 Elsevier Science (USA)
All rights reserved.

2000). For the study, the snails were 1 month old and weighed 1.17 ± 0.16 g (fresh mass). The experiment was performed over 4 weeks under controlled conditions at room temperature (20 ± 1°C) and a 18/6-h light:dark cycle. The snails were randomly split into groups of five snails kept in transparent polystyrene containers (E1DBBAC001, Iffa-Credo, l'Arbresle, France). A high relative humidity was maintained with the layer of wet absorbent paper placed on the floor of the containers. All experimental conditions were strictly identical to those used by Gomot (1997), allowing accurate comparison between the two experiments.

Cadmium Administration

Three times a week, the snails were fed uncontaminated fresh rape leaves (control snails) or Cd-contaminated leaves (treated snails). The leaves were soaked in 0, 10, 50, and 100 $\mu g \cdot ml^{-1}$ Cd solutions (as $CdCl_2$, Aldrich) for 1 min. These concentrations were chosen to obtain Cd concentrations in the rape leaves similar to those for some of those tested by Gomot (1997) (i.e., 0, 50, 100, and 200 $\mu g \cdot g^{-1}$). Uncontaminated leaves were soaked in ultrapure water. After soaking, the fresh leaves were drained and cut into small pieces (about 1 cm^2). Then, 3.0 ± 0.1 g of this food was given to the snails in a Petri dish laid down in each housing container. Five replicates of five snails were used for the control group and three replicates of five snails were used for each Cd-exposure treatment, respectively, referred to as S_{10}, S_{50}, and S_{100} groups throughout this article.

The snails of the experiment of Gomot (1997) were exposed to Cd-contaminated Helixal (special food in the form of flour for snail rearing) at concentrations ranging from 0 to 800 $\mu g \cdot g^{-1}$. The food was contaminated by adding a fine powder of anhydrous $CdCl_2$ (Aldrich), given *ad libitum* and renewed three times a week, as in the present experiment with leaves.

Estimation of Growth and Feeding Rate

Growth was evaluated every week by weighing the snails to within ± 0.1 g. A percentage of growth inhibition (P_{gi}) was calculated to compare the growth of exposed groups with that of the control group,

$$P_{gi} \text{ for } S_X \text{ group} = \frac{(m_{Ctn} - m_{Ct0}) - (m_{Xtn} - m_{Xt0})}{(m_{Ctn} - m_{Ct0})} \times 100,$$

where S_X group is the S_{10}, S_{50}, or S_{100} snail groups; m_{Ctn} is the mass of control group at $t = n$ weeks; m_{Ct0} is the mass of control group at the beginning of the experiment; m_{Xtn} is the mass S_X group at $t = n$ weeks; and m_{Xt0} is the mass of S_X group at the beginning of the experiment.

Unconsumed leaves were collected and oven-dried at 60°C to a constant mass. Since the same mass of fresh food was given to all groups, the unconsumed dry mass of food was used as an estimation of the consumption rate. The results are expressed in grams of dry mass of unconsumed leaves per gram of fresh snail per week.

Determination of Cadmium Concentrations

At the end of the experiment, the snails were starved for 48 h and then frozen at -20°C. After defrosting, the snails were removed from their shells and the bodies were cut into two parts, foot and viscera, which were oven-dried at 60°C to constant mass. Then, the tissues were analysed by atomic absorption spectrophotometry (flame and graphite furnace, Perkin-Elmer 3100), as previously described by Gomot and Pihan (1997). Samples of leaves were also analyzed by AAS.

Snails exposed to Cd in Helixal flour at concentrations similar to those tested in the present study (i.e., 0, 50, 100, and 200 $\mu g \cdot g^{-1}$) were analyzed with the same methods. The validity of the analytical method was checked using standard biological reference material (TORT-2, lobster hepatopancreas from NRCC-CNRL, Canada). Values for Cd were consistently within 5% of the certified values. Bioaccumulation factors (BAFs) were calculated for foot, viscera, and whole animals as the ratio of the Cd concentrations in the tissue to the Cd concentration measured in the food.

Statistical Analysis

Statistically significant differences among groups were assessed for growth and feeding rate with a nonparametric Kruskal–Wallis test (suitable for comparison of K groups with $K > 2$). When significant differences were detected ($P < 0.05$), this test was followed by a multiple comparison test to know which group(s) differed from the control (Siegel and Castellan, 1988; Sokal and Rohlf, 1998). Differences in Cd accumulation in snails between leaves and vegetable flour experiments were analyzed using the nonparametric Mann–Whitney test. The same test was used to compare growth between weeks n and $n - 1$.

RESULTS

Cadmium Concentrations in Food and Bioaccumulation in Snail Feet and Viscera

In the experiment using leaves as food, the Cd concentrations measured in the soaked leaves were higher than those of the soaking solutions and increased with increasing Cd concentration in the solutions (Table 1). In snail tissues, the Cd concentrations were much higher than in the leaves and increased with increasing levels of contamination in the food, for whole animals as well as for foot and viscera (Table 1). The Cd concentrations in the viscera were consistently higher than those in the corresponding feet for all groups. The BAFs calculated for whole snails were consistently

TABLE 1

Cadmium Concentrations ($\mu g \cdot ml^{-1}$ or $\mu g \cdot g^{-1}$, Dry Mass, Mean ± Standard Deviation) in the Solutions, Food (Soaked Leaves), and Tissues (Foot, Viscera, and Soft Body) of *H. aspersa aspersa* Snails fed Cd-Contaminated Rape Leaves for 4 Weeks, and Bioaccumulation Factors

Snail group	Soaking solution	Leaves	Foot	BAF	Viscera	BAF	Soft body	BAF
Control	0	0.14 ± 0.02	0.20 ± 0.03	1.43	0.98 ± 0.01	7.00	0.67 ± 0.03	4.79
S_{10}	10	38.40 ± 17.57	59.38 ± 11.69	1.55	222.74 ± 41.83	5.80	155.03 ± 38.54	4.04
S_{50}	50	93.12 ± 38.30	156.61 ± 56.38	1.68	486.32 ± 112.86	5.22	359.96 ± 70.47	3.87
S_{100}	100	177.24 ± 55.33	222.26 ± 49.18	1.25	589.74 ± 136.78	3.33	434.75 ± 75.07	2.45

higher than 2 but decreased from 4.79 for the control group to 2.45 for the highest exposed group, S_{100}. If the different tissues are considered, the BAFs of the viscera clearly decreased with Cd concentration in the food although this trend was not observed for the foot.

In the experiment using Helixal flour as food, the Cd concentrations in the foot, the viscera, and the whole body increased with increasing Cd concentrations in the flour, with values in the viscera consistently higher than in the corresponding feet (Table 2). The BAFs decreased also with increasing Cd concentrations in the food for viscera and whole body, although this trend was not observed for the foot. For both experiments, these results demonstrate a biomagnification of Cd in the plant material/snail food chain and confirmed the high Cd accumulation of *H. aspersa* snails.

Comparison of the results obtained at similar Cd concentrations in the two diets reveals that Cd concentrations in the exposed snails are relatively consistent between the two experiments. For viscera and whole body, significant differences ($P < 0.05$) were found only between S_{10} group and snails fed flour contaminated at 50 $\mu g \cdot g^{-1}$. The variations were higher for foot but differed significantly only between S_{50} snails and those fed flour contaminated at 100 $\mu g \cdot g^{-1}$. These results indicate that the bioavailability of Cd in the two types of food was relatively similar for *H. aspersa* snails. The BAFs exhibited similar values in the two experiments except for the foot. In snails fed flour, the BAF in foot was consistently lower than 1, while it was higher than 1 for the snails fed rape leaves.

TABLE 2

Cadmium Concentrations ($\mu g \cdot g^{-1}$, Dry Mass, Mean ± Standard Deviation) in the Food and the Tissues (Foot, Viscera, and Soft Body) of *H. aspersa aspersa* Snails fed Cd-Contaminated Helixal Meal for 4 Weeks, and Bioaccumulation Factors

Food	Foot	BAF	Viscera	BAF	Soft body	BAF
Control	0.85 ± 0.33	—	2.80 ± 0.48	—	1.9 ± 0.4	—
50	35.20 ± 15.75	0.70	341.24 ± 50.95	6.82	198.1 ± 20.4	3.96
100	67.57 ± 19.11	0.68	495.55 ± 125.47	4.96	292.0 ± 88.8	2.92
200	179.50 ± 34.77	0.90	679.87 ± 94.38	3.40	443.2 ± 38.4	2.22

Effects of Cadmium in Snails Exposed to Contaminated Leaves

During the whole experiment, mortality was very low, with only 3 deaths out of 70 juvenile snails (4.3%). The mortality occurred for 1 individual in the S_{50} group during the first week of the experiment. Two individuals died during the third week in the S_{100} group.

All groups had a slight but significant (Mann–Whitney, $P < 0.05$) growth over the experiment. At the end of the experiment, snail mass had a tendency to decrease with increasing Cd concentration in the food, although no significant differences were noted (except after the first week of experiment) (Fig. 1). However, the calculated percentages of growth inhibition for S_{10}, S_{50}, and S_{100} groups reflected the decline in snail mass, as inhibition was 17, 24, and 43%, respectively.

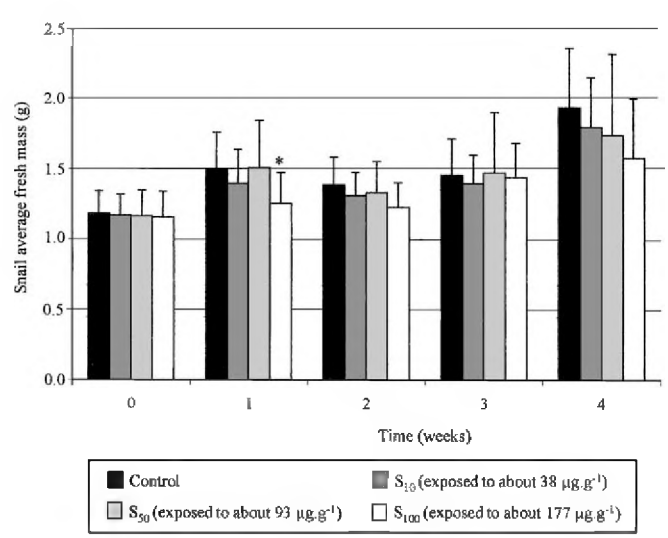


FIG. 1. Effect of a range of cadmium concentrations in food (rape leaves) on growth of *H. aspersa aspersa* snails over 4 weeks. Bars represent standard deviation. *Significantly different from the control value (test of multiple comparison, $P < 0.05$).

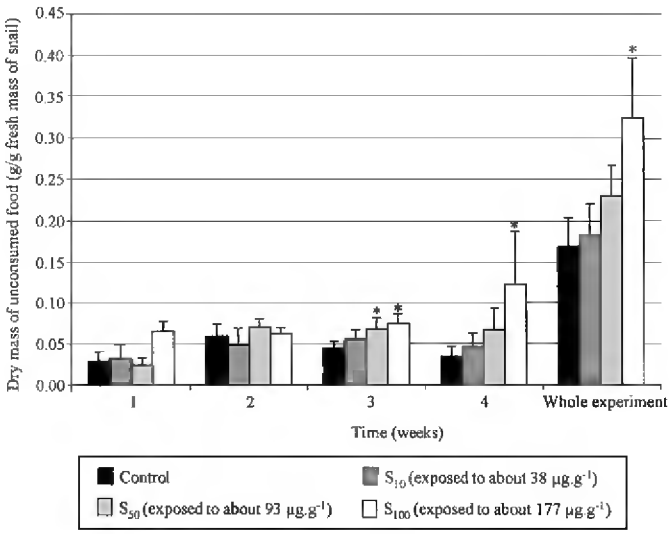


FIG. 2. Dry mass (mean ± SD) of unconsumed food for *H. aspersa aspersa* snails exposed to different concentrations of cadmium in their food. *Significantly different from the control value (test of multiple comparison, $P < 0.05$). Whole experiment data correspond to the sum of the 4 weeks.

A significant reduction of consumption rate was found between the S_{50} group and the control group at the third week and between the S_{100} group and the control one from the third week (Fig. 2). If we consider the whole experiment, the mean unconsumed food mass was minimal for the control group and increased with increasing Cd concentration in the food (Fig. 2). The reduction of consumption was significant for the highest exposed S_{100} group, demonstrating an antifeeding effect of Cd.

DISCUSSION

Cd Transfer and Accumulation in Snails

This study presents original data on the transfer of Cd from leaves, contaminated by simulating superficial deposits, to a primary consumer, the snail *H. aspersa*. The present results indicate an increase of Cd concentrations from contaminated food to snail tissues, demonstrating a biomagnification of Cd in this food chain. In contrast, a deconcentration of Cd from plant material (lettuce and carrot contaminated by soaking) to the slug *Deroceras reticulatum* was shown by Gräff *et al.* (1997). *H. pomatia* snails fed Cd-enriched lettuce (around 160 $\mu g \cdot g^{-1}$) for 28 days exhibited a whole soft body Cd concentration of 48.3 $\mu g \cdot g^{-1}$, i.e., lower than that of the food (Dallinger and Wieser, 1984). Compared to *D. reticulatum* and *H. pomatia* exposed to similar diets and Cd concentrations, *H. aspersa* appears to be a more sensitive indicator for Cd contamination.

However, Russell *et al.* (1981) observed that the Cd concentrations in *H. aspersa* snails, exposed to Cd in a rodent diet, were lower than in their food. In adults of the same species exposed for 3 months to 146 $\mu g \cdot g^{-1}$ of Cd in agar-based food, a BAF value of 1.05 was found (Laskowski and Hopkin, 1996a). This value is lower than that (2.45) found in the present experiment for a similar concentration (154 $\mu g \cdot g^{-1}$) in the food. The main differences between the latter and the present study lie in the age of the snails and their diet. Since Beeby and Eaves (1983) demonstrated that Cd concentrations in *H. aspersa* snails of different age classes do not differ significantly, the differences in Cd accumulation may be attributed to a difference in bioavailability of Cd in the various diets. These possible differences in Cd bioavailability in the diets used in ecotoxicity tests should be considered when studies are compared, and extrapolation from such tests for a priori risk assessment should be handled with care.

Present results showed that the BAFs decreased with increasing Cd concentration in the food for viscera and whole body. A similar trend was reported in *H. aspersa* snails for Cd, Cu, and Zn (Laskowski and Hopkin, 1996a) and for Cr (Cœurdassier *et al.*, 2000) and was also found in earthworms for Cd, Cu, Pb, Ni, and Zn (Neuhauser *et al.*, 1994). In the latter study, the authors suggested an increase of elimination rate with increasing metal concentration in the soil.

Although the Cd concentrations in the contaminated leaves correspond to ecologically relevant contamination levels in plant, litter, or soil from polluted areas (Kabata-Pendias and Pendias, 1992), the present Cd concentrations found in the snail tissues exceed the maximum values reported by Coughtrey and Martin (1976) in *H. aspersa* snails sampled in the vicinity of a smelting works at Avonmouth, United Kingdom (64.7 ± 7.6 $\mu g \cdot g^{-1}$ in the whole body). However, when considering the BAF values, the present results are in agreement with field studies. Martin and Coughtrey (1982) reported BAFs for Cd in terrestrial snails ranging from 1.37 to 7.37 (calculated with the Cd concentration of the litter which was considered the food source). In their study of the metal contamination of a car park in central London, Beeby and Eaves (1983) reported Cd bioaccumulation in soft tissues of 18.0 $\mu g \cdot g^{-1}$. The Cd concentrations measured in dandelion leaves, one of the species of their diet, was about 6 $\mu g \cdot g^{-1}$. Consequently, the calculated BAF value would be approximately 3, which is in agreement with the BAFs found in the present work.

In the present study, the results obtained with the two different diets were relatively consistent. The main differences occurred for the foot, in which BAFs were higher than 1 in snails fed fresh leaves while they were lower than 1 in snails fed flour. This difference could be explained by a cutaneous transfer of soluble deposits of Cd from leaf surfaces to snail foot. The similarity between the two diets and between the BAFs observed in this experiment and those reported in field works, suggests the possible use of such diets for ecotoxicological tests in *H. aspersa* snails.

Mortality and Sublethal Effects of Cd in Snails Fed Fresh Leaves

The low snail mortality observed in the present work (4.3%) is similar to that (5%) observed in the experiment of Gomot (1997). This mortality rate is also close to those reported by Laskowski and Hopkin (1996b), who found, respectively, 6.7 and 1.9% mortality in subadult (about 4 months old) and adult *H. aspersa* snails exposed to Zn, Cu, Pb, and Cd (alone or in combination) in agar-based food. In agreement with these studies, results of the present study reveal that mortality cannot be considered a sensitive parameter for studying the harmful effects of environmental Cd pollution, over a 1-month period.

The decrease of consumption rate observed in the highest Cd-exposed group ($177\,\mu g \cdot g^{-1}$) compared to the control group is in agreement with the results of Russell *et al.* (1981), who reported that consumption was strongly depressed in *H. aspersa* snails exposed to Cd above $100\,\mu g \cdot g^{-1}$. These authors also reported that growth reduction was closely correlated with the observed feeding rates ($r = 0.98$). Moreover, Laskowski and Hopkin (1996b) reported consumption rates significantly lower than control above $60\,\mu g \cdot g^{-1}$. Whether food consumption reduction or a direct metal toxic effect is responsible for growth reduction is still unclear (Laskowski and Hopkin, 1996b; Gomot, 1997) although both are probably responsible for the effects observed under laboratory conditions.

The group exposed to the highest Cd levels in the present experiment ($177\,\mu g \cdot g^{-1}$) exhibited 43% growth reduction. These data are in agreement with previous works on Cd effect on growth in snails, since the EC_{50} value was $140\,\mu g \cdot g^{-1}$ at 4 weeks (Gomot, 1997). Other studies found dose-dependent growth reductions due to Cd intoxication but comparisons are less pertinent, since the animals were of different age (subadult *H. aspersa* in Russell *et al.* (1981) and Laskowski and Hopkin (1996a)) or different species (*H. engaddensis* in Swaileh and Ezzughayyar (2000)).

CONCLUSION

Snails exposed to fresh leaves contaminated by surface deposits of Cd exhibited high Cd concentrations with BAFs higher than 2 in viscera and whole body. This bioaccumulation was accompanied by sublethal effects on growth and consumption. Comparison with snails fed vegetable flour contaminated with similar Cd concentration revealed that accumulation and effects are comparable, demonstrating a similar bioavailability in the two diets. The BAFs exhibited by snails with the two diets are in agreement with field data, which suggest that this experimental setup can be useful for risk assessment purposes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank J. Dat and M. Cœurdassier for many fruitful discussions. C. Lovy and M.-L. Toussaint are gratefully acknowledged for technical assistance. This work was supported by grants from the French Agency for the Environment and Energy Management (ADEME), Paris, and from the Conseil Régional de Franche-Comté.

REFERENCES

Beeby, A., and Eaves, S. L. (1983). Short-term changes in Ca, Pb, Zn and Cd concentrations of the garden snail *Helix aspersa* Müller from a central London car park. *Environ. Pollut.* **30,** 233–244.

Cœurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A., and Badot, P.-M. (2000). Dose-dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa aspersa. Environ. Toxicol. Chem.* **19,** 2571–2578.

Coughtrey, P. J., and Martin, M. H. (1976). The distribution of Pb, Zn, Cd, and Cu within the pulmonate mollusc *Helix aspersa* Müller. *Oecologia* **23,** 315–322.

Dallinger, R., and Wieser, W. (1984). Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd, and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol. C* **78,** 117–124.

Gomot, A. (1997). Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33,** 209–216.

Gomot, A., and Pihan, F. (1997). Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **38,** 85–94.

Gomot-de Vaufleury, A. (2000). Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa. Ecotoxicol. Environ. Saf.* **46,** 41–50.

Gomot-de Vaufleury, A., and Kerhoas, I. (2000). Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa. Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **64,** 434–442.

Gräff, S., Berkus, M., Alberti, G., and Köhler, H. R. (1997). Metal accumulation strategies in saprophagous soil invertebrates: a quantitative comparison. *Biometals* **10,** 45–53.

Kabata-Pendias, A., and Pendias, H. (1992). *Trace Elements in Soils and Plants.* CRC Press, Boca Raton, FL.

Laskowski, R., and Hopkin, S. P. (1996a). Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): implications for predators. *Environ. Pollut.* **91,** 289–297.

Laskowski, R., and Hopkin, S. P. (1996b). Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **34,** 59–69.

Little, P. (1973). A study of heavy metal contamination of leaf surfaces. *Environ. Pollut.* **5,** 159–172.

Martin, M. H., and Coughtrey, P. J. (1982). *Biological Monitoring of Heavy Metal Pollution. Land and Air.* Applied Science Publishers, London, UK.

Neuhauser, E. F., Cukic, Z. V., Malecki, M. R., Loehr, R. C., and Durkin, P. R. (1994). Bioconcentration and biokinetics of heavy metals in the earthworm. *Environ. Pollut.* **89,** 293–301.

NFX 31-255-1. (2001a). *Qualité du sol: Effets des polluants vis à vis des escargots juveniles (Helix aspersa). Partie 1. Détermination des effets sur la croissance par contamination alimentaire.*

NFX 31-255-2. (2001b). *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.*

Nriagu, J. O., and Pacyna, J. M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **333,** 134–139.

Roberts, T. M. (1972). *Spread and Accumulation in the Environment of Toxic Non-ferrous Metals from Urban and Industrial Sources*. Ph.D. thesis, University College of Wales, Swansea.

Russell, L. K., DeHaven, J. I., and Botts, R. P. (1981). Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **26,** 634–640.

Siegel, S., and Castellan, N. J. (1988). *Nonparametric Statistics for the Behavioural Sciences*. McGraw–Hill International Editions, New York.

Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. (1998). *Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research*. Freeman, New York.

Stoeppler, M. (1991). Cadmium. In *Metals and Their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance* (E. Merian and T. W. Clarkson, Eds.), pp. 803–851. VCH, New York.

Swaileh, K. M., and Ezzughayyar, A. (2000). Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **47,** 253–260.

Section III.

Transfert et effets du cadmium dans une chaîne alimentaire expérimentale impliquant l'escargot *Helix aspersa* et le coléoptère carabidé *Chrysocarabus splendens*

Cette expérience a fait l'objet d'un article publié en 2002 dans la revue *Chemosphere* (48: 571-579). Les auteurs sont Renaud Scheifler, Annette Gomot-de Vaufleury, Marie-Laure Toussaint et Pierre-Marie Badot.

Résumé

Le transfert et les effets toxiques du Cd ont été étudiés dans une chaîne alimentaire expérimentale impliquant l'escargot *Helix aspersa* comme organisme proie et un de ses prédateurs naturels, le coléoptère carabidé *Chysocarabus splendens*. Des escargots juvéniles sont nourris avec une farine végétale contaminée par du Cd (0, 10, 50 and 100 $\mu g.g^{-1}$) pour être utilisés comme proies pour nourrir les larves de carabe. Ces dernières sont exposées aux escargots contaminés de leur éclosion à leur métamorphose. Les concentrations en Cd dans les tissus des escargots augmentent en fonction de la concentration en Cd dans la nourriture et de la durée d'exposition. Les facteurs de bioaccumulation vont de 1,87 à 3,39; montrant que les escargots de l'espèce *H. aspersa* sont macroconcentrateurs de Cd dès leur plus jeune âge. La consommation d'escargots par les carabes n'est pas affectée par la concentration en Cd. Les concentrations en Cd dans les larves de carabes sont très faibles (moins de 1 $\mu g.g^{-1}$ pour tous les groupes), montrant une grande capacité de régulation du Cd par les larves. Cependant, les concentrations des individus les plus exposés sont supérieures à celles mesurées chez les témoins. Les quantités de Cd chez les adultes de carabes sont inférieures à celles des larves, indiquant qu'une perte de Cd a eu lieu pendant la métamorphose. En dépit des faibles concentrations mesurées dans les carabes, leur exposition aux proies contaminées provoque 31% de mortalité chez les individus les plus exposés. La mortalité survient pendant la métamorphose. Ces résultats démontrent que les escargots présents dans des sites fortement pollués peuvent représenter un risque d'empoisonnement secondaire chez des prédateurs invertébrés. Ces résultats constituent des données quantitatives originales sur le transfert de Cd entre 2 compartiments d'un réseau trophique terrestre.

PERGAMON

Chemosphere 48 (2002) 571–579

CHEMOSPHERE

www.elsevier.com/locate/chemosphere

Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*

R. Scheifler [a,b], A. Gomot-de Vaufleury [a,b,*], M.-L. Toussaint [a,b], P.-M. Badot [a,b]

[a] *Laboratoire de Biologie et Ecophysiologie, Institut des Sciences et Techniques de l'Environnement, Université de Franche-Comté, EA 3184 MR USC INRA, Place du Maréchal Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France*

[b] *Pôle Universitaire, Place Tharradin, BP 427, F-25211 Montbéliard, France*

Received 3 September 2001; received in revised form 13 February 2002; accepted 28 February 2002

Abstract

The transfer and the toxic effects of Cd were studied in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* as prey organism and one of its natural predators, the carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. Juvenile snails were fed plant-based food enriched with 0, 10, 50 and 100 $\mu g\,g^{-1}$ of Cd, then were offered as prey to beetle larvae from egg hatching to pupation stage. Cd concentrations in snail tissues increased with increasing Cd concentration in food and with duration of exposure. Bioaccumulation factors ranged from 1.87 to 3.39, showing that *H. aspersa* snails, even in their early life stages, belong to macroconcentrator species for Cd. No significant reduction of snail consumption by beetles was found in exposed groups. Cd concentrations in beetle larvae remained very low (lower than 1 $\mu g\,g^{-1}$ for all groups), demonstrating a very effective regulation capacity in beetle larvae. However, Cd concentrations in highest exposed groups were higher than those found in control groups. Cd contents in adult beetles were lower than in larvae, showing a loss of Cd during metamorphosis. Despite the low Cd concentrations found in beetles, their exposure to Cd contaminated snails led to 31% of mortality, which occurred only during pupation and for the highest exposure level. No clear sublethal effects were found. These results showed that snails inhabiting heavily polluted areas may represent a risk of secondary poisoning for predatory invertebrates and provided quantitative data on the transfer of Cd between two compartments of a terrestrial food chain. © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Ecotoxicology; Bioaccumulation; Terrestrial invertebrates; Heavy metal

1. Introduction

Among terrestrial invertebrates, pulmonate gastropods are known for their ability to accumulate heavy metals to very high concentrations. Several snail species are thus readily used for bioindication of metallic contaminations in the field (Coughtrey and Martin, 1977; Beeby and Eaves, 1983; Berger and Dallinger, 1993; Newman et al., 1994; Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2000) as well as for laboratory experiments on effects (Russell et al., 1981; Laskowski and Hopkin, 1996a; Gomot, 1997) and bioaccumulation (Cooke et al., 1979; Dallinger and Wieser, 1984; Laskowski and Hopkin, 1996b; Gomot and Pihan, 1997) of metals.

Terrestrial snails represent prey species for many predators of different groups: invertebrates (like carabid beetles), amphibians in terrestrial forms, reptiles, birds (like thrushes) and mammals (Peake, 1978). With

* Corresponding author. Address: Laboratoire de Biologie et Ecophysiologie, Institut des Sciences et Techniques de l'Environnement, Université de Franche-Comté, EA 3184 MR USC INRA, Place du Maréchal Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France. Tel.: +33-381-665-709; fax: +33-381-665-797.

E-mail address: annette.devaufleury@univ-fcomte.fr (A. Gomot-de Vaufleury).

0045-6535/02/$ - see front matter © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
PII: S0045-6535(02)00116-9

populations capable of reaching 1000 individuals per m^2, snails may be an important link in the transfer of heavy metals in terrestrial ecosystems (Beeby, 1985; Laskowski and Hopkin, 1996b), thereby constituting a risk of secondary poisoning as demonstrated for pesticides residues in earthworms (Cooke et al., 1992). For Cd, a particularly toxic and mobile metal (Stoeppler, 1991), it is now well known that the binding of metal ions to low molecular-weight proteins (such as metallothioneins) is the main detoxification mechanism in snails (Dallinger and Berger, 1993). As suggested earlier by Morgan et al. (1986) in a general food chain approach, Laskowski and Hopkin (1996b) hypothesised that, since these proteins are easily soluble, the Cd bound to metallothioneins (or metallothionein-like proteins) in snail tissues should be readily available for their predators.

However, to date, no experiment was undertaken to expose a predator to Cd contaminated snails in an ecologically relevant prey–predator relationship to quantitatively study the Cd transfer and its effects. The aim of this work was to investigate the transfer of Cd from the garden snail *Helix aspersa* Müller to the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens* Olivier and the resulting effects (mortality, consumption, mass, duration of larval stage) on the predator. *H. aspersa* is a macroconcentrator for Cd (Dallinger, 1993) and Cd concentrations in individuals sampled in polluted areas reached more than 60 $\mu g\,g^{-1}$ (Coughtrey and Martin, 1977). *C. splendens* was chosen because the larvae as well as the adults are most exclusively snail predators which eat all of the soft tissues. *C. splendens* and *H. aspersa* coexist in the south of Europe so the prey–predator relationship involving these species is ecologically relevant and they can both be reared in laboratory conditions.

2. Materials and methods

2.1. Snail rearing and Cd exposure

Eggs of garden snails (*H. aspersa* Müller) were obtained from our standardised laboratory rearing (Gomot-de Vaufleury, 2000). The newly hatched young snails were immediately fed plant-based food (Helixal® first age, Philicot Co., Clairvaux-lès-Lacs, 39130, France), either uncontaminated for the control group (control) or contaminated with 10, 50 and 100 $\mu g\,g^{-1}$ Cd (S_{10}, S_{50} and S_{100}), by adding a fine powder of anhydrous $CdCl_2$ (Aldrich 99.99%). All Cd concentrations were chosen to reflect the possible contamination of soils, litter and plants in urban or industrial areas (Kabata-Pendias and Pendias, 1992). The contamination was performed prior the start of the experiment and the meals were conserved in tightly closed glass bottles in a cool and dry environment. Samples of uncontaminated and contaminated food were analyzed for total Cd concentration as described later.

Two groups of snails were prepared, one group was made of "small" one-week-old snails (i.e. exposed to Cd for one week since hatching) and was given to first- and second-stage beetle larvae. A second group of "large" two-weeks-old snails (i.e. exposed to Cd for two weeks since hatching) was prepared and was given to third-stage beetle larvae. A pool of 16 "small" snails and a pool of 10 "large" snails was sampled. The snails were starved for 48 h (to excrete the gut content), killed by freezing at −20 °C, dried at 60 °C to constant dry mass and weighed. The average snail dry mass (body without shell) was determined for each group and was used to estimate the beetles food consumption.

In order to provide beetles with fresh snails throughout the experiment, the snails were kept in aestivation (at 20 ± 1 °C in a dry environment) in small petri dishes. The aestivation is characterised by a drastic reduction in snail activity (no movement, no feeding activity, no excretion) and may appear naturally during dry periods. This can be artificially induced by depriving the snails of water in order to keep them alive for several weeks.

2.2. Beetle rearing

Adults of *C. splendens* Olivier were collected in April in a forest of the Aude département, France. The beetles were kept in plastic boxes (35 × 23 × 13 cm^3) filled with about 7 cm of "terre de bruyère" (from COMPO SANA®, Roche-lès-Beaupré, 25220, France, pH: 4.81, organic matter: 18.98%, cation-exchange capacity: 15.5 meq/100 g). This substrate, commonly used in horticulture, was recommended for carabid beetles rearing (Malausa, 1977). The boxes were kept in controlled conditions at 20 ± 2 °C, under a 12/12 h night/day cycle (Malausa, 1977). Eggs were collected each week by carefully digging through the soil in the rearing boxes. Each egg was put down in a petri dish with a layer of damp paper. The petri dishes were kept in a dark room at ambient temperature. Newly hatched larvae were used for experiments.

2.3. Beetle exposure

Sixteen larvae per treatment were reared in controlled conditions (20 ± 2 °C, 12/12 h night/day cycle) from egg hatching to adult emergence. Each larva was reared separately (to prevent cannibalism and to accurately assess the consumption) in a translucent custom made plastic box (9 cm diameter, 10 cm high) filled with about 7 cm of "terre de bruyère". A glass fibre netting (mesh size: 1 mm) was securely fitted over the top of the box. A piece of bark was put in each box to provide shelter for

the larva. A small piece of apple was put in each box as a source of water for beetle larvae and to attract the snails in the range of predation of the larvae. Finally, in each box, a known number of uncontaminated snails or Cd contaminated snails were given to the corresponding larvae groups (respectively called "control", "C_{10}", "C_{50}" and "C_{100}"). Empty snail shells were counted three times a week then removed from the box and replaced by new fresh snails.

2.4. Moulting date determination

Three times a week, the larvae or slough were searched to determine the larval stage and the moulting date. If larvae or slough were not visible, the soil was not dug out to avoid disturbing development due to excessive manipulation, though such a case was very rare throughout the experiment.

2.5. Beetle sampling for Cd analysis

Just before pupation (i.e. when third-stage larvae became inactive and buried themselves in the soil), a first sample of eight larvae (except for the control group where $n = 4$) was taken for analysis of the whole body Cd concentration. A second sample of eight (except for control group where $n = 4$ and for C_{100} group where $n = 3$ due to mortality) adults was taken just after their emergence.

2.6. Determination of Cd concentrations

Tissues of snails and beetles were dried at 60 °C to constant dry mass. After digestion, determination of Cd concentration was carried out by furnace atomic absorption spectrometry with the methods reported previously (Gomot and Pihan, 1997). Since shells are not eaten by beetles, snail Cd concentrations were determined on soft tissues only. The validity of the analytical method was checked by means of standard biological reference materials (TORT-2, lobster hepatopancreas from NRCC–CNRL, Canada). Cd values were consistently within 5% of the certified values.

2.7. Estimation of the transfer

2.7.1. Calculation of the amount of Cd ingested by beetles

The number of "small" (N_s) and "large" (N_l) snails consumed (mean value shown in Table 2), their average dry mass (M_s and M_l) (Table 1) and their average Cd concentration (C_s and C_l) (Table 1) were used to calculate the amount (A) of Cd ingested per each larva with the formula (1):

$$A = (N_s M_s C_s) + (N_l M_l C_l) \quad (1)$$

2.7.2. Calculation of bioaccumulation factors in snails and beetles

The BAF in snails were calculated using the formula (2):

$$\mathrm{BAF} = C_{(\mathrm{s\,or\,l})}/C_{\mathrm{f}} \quad (2)$$

with C_f, mean concentration of snail food (Table 1) and $C_{(\mathrm{s\,or\,l})}$, average Cd concentration in "small" or "large" snails (Table 1).

BAF in beetles were calculated for each larva and for each adult, taking into account their measured consumption. Thus, the Cd concentration in snail tissues (C_{snail}) consumed by each beetle was determined as followed (3):

$$C_{\mathrm{snail}} = A/[(N_s M_s) + (N_l M_l)] \quad (3)$$

Then BAF were calculated with the formula (4):

$$\mathrm{BAF} = C_{(\mathrm{larva\ or\ adult})}/C_{\mathrm{snail}} \quad (4)$$

with $C_{(\mathrm{larva\ or\ adult})}$, Cd concentration in beetle larva or adult (Table 3).

2.8. Statistical analysis

Significant differences among the four groups were analysed using the non-parametric Kruskal–Wallis test for comparisons of mass, larval stage duration, consumption, Cd content and concentration. When significant differences were detected ($p < 0.05$), this test was followed by a multiple comparison test to know which group(s) differed from the control (Siegel and Castellan, 1988). The non-parametric Mann–Whitney test was used to compare larvae and adults for Cd content and concentration (Siegel and Castellan, 1988). The differences in percentage of mortality among groups were searched using the chi-square test.

3. Results

3.1. Cd concentrations and contents in H. aspersa

Average Cd concentrations and Cd contents increased with increasing Cd concentration in the food and with duration of exposure (Table 1). The resulting BAF increased also with increasing Cd concentration in the food (except for "small" S_{50}) and with duration of exposure. The BAF values in snails were consistently higher than 1 (except in control group of "large" snails), close to 2 after one week of exposure and reached three after two weeks of exposure. These results indicate that *H. aspersa* snails are able to concentrate Cd even in their early life stages. These snails constituted increasingly Cd contaminated preys for the beetle exposure experiment.

Table 1
Nominal and measured cadmium concentrations ($\mu g\,g^{-1}$ dry mass, mean ± SD) in the food used to fed *H. aspersa* snails for one and two weeks, average dry mass (g) of the soft tissues of a snail and Cd concentration ($\mu g\,g^{-1}$ dry mass), BAF and Cd content (μg) in snail tissues

Group	Snail food		"Small" snails (exposed one week)				"Large" snails (exposed two weeks)			
	Nominal concentration	Measured concentration (C_f)	Average dry mass (M_s)	Concentration (C_s)	BAF_s	Content	Average dry mass (M_l)	Concentration (C_l)	BAF_l	Content
Control	0	0.12 ± 0.01	0.008	0.16	1.33	0.001	0.024	0.07	0.58	0.002
S_{10}	10	13.00 ± 1.32	0.009	24.31	1.87	0.219	0.025	38.11	2.93	0.950
S_{50}	50	54.76 ± 18.14	0.008	99.67	1.82	0.797	0.019	174.61	3.19	3.318
S_{100}	100	83.20 ± 13.07	0.007	237.91	2.86	1.665	0.012	282.33	3.39	3.388

3.2. Consumption, Cd concentrations and contents in the carabid beetle C. splendens

The number of "large" snails and the total number of snails consumed by beetle larvae were significantly higher in C_{100} group compared to the control group (Table 2). However, since the highest contaminated snails (S_{100}) had a lower dry mass (Table 1), the mean dry mass of consumed snail tissues was not significantly different among all groups (Table 2).

The calculation of the resulting Cd amount ingested by beetles showed a dramatic increase with increasing Cd concentration in their food. The Cd amounts ingested by C_{10}, C_{50} and C_{100} groups were respectively 346-, 1467- and 2474-fold higher than the amount ingested by control beetle larvae (Table 2).

However, the Cd concentrations and contents in larva and in adult beetles remained very low (always lower than 1 $\mu g\,g^{-1}$ and 0.1 μg respectively) but increased with the increasing level of exposure (Table 3). In beetle larvae, Cd concentration and content in C_{100} group were significantly higher than control group. After metamorphosis, the newly emerged adults of C_{50} and C_{100} groups exhibited significantly higher Cd concentrations and contents than control group. The BAF values were also very low and of the same order of magnitude for all exposed groups (i.e. 0.001–0.002). The percentages of Cd retained in beetle tissues in relation to the calculated amount of Cd ingested were respectively 61% and 4% in larvae and adults of control group, lower or equal to 0.1% in larvae of all exposed groups and lower than 0.05% in adults of all exposed groups. These results show a very strong capacity of Cd regulation in beetle larvae although these processes were not able to maintain Cd concentrations in certain highly exposed group at a similar level than in unexposed group.

After metamorphosis, Cd concentrations were lower in emerged adults than in larvae sampled just before pupation but this difference was significant only for control group. However, Cd contents were significantly lower in adults than in larvae for all groups except C_{100} for which the difference was not significant (Fig. 1). This was probably in relation with the low number of data available for the C_{100} group due to mortality. Except for C_{100} group whose data should be interpreted with care, these data showed that beetles lost a portion of their Cd content during the pupation stage.

3.3. Cd effects in the carabid beetle C. splendens

In group C_{100}, a significant mortality occurred: five larvae (31%) died during the pupation stage. No mortality was observed in the other groups.

The duration of the first larval stage was significantly delayed in C_{100} group when compared to the control group (Fig. 2). After the second larval stage, this delay in C_{100} group was not found but the C_{10} group exhibited a significantly shortened stage duration. No significant effect was found for the last stage (Fig. 2).

No clear effect of Cd treatment was observed on the mean mass of beetles, neither on larvae sampled just before pupation nor on emerged adults (Fig. 3).

Developmental abnormalities associated with high Cd concentrations were observed in two beetles. One individual of the C_{10} group was unable to reach the second larval stage and exhibited a Cd concentration (2.28 $\mu g\,g^{-1}$) more than 30-fold higher than the mean Cd concentration of its group (Table 3). Similarly, a larva of the C_{100} group was unable to perform its pupation and exhibited a very high Cd concentration (3.27 $\mu g\,g^{-1}$) compared to those of the other individuals of its group. Due to the abnormality of their development, the Cd concentrations of these larvae were excluded from the calculations (Table 3). A particularly high Cd concentration of 28.97 $\mu g\,g^{-1}$ was determined in a larva of the C_{100} group but it was, when sampled, at its normal developmental stage (third larval stage). We also removed this extreme data (compared to the seven other Cd concentrations of this group) from the calculations since the statistical treatments and the general interpretations of the data were not modified.

Table 2
Number and total dry mass (mean ± SD) of consumed snails and resulting Cd amount ingested per larva of *C. splendens*

Group	Number of snails consumed			Dry mass of snail tissue consumed (g)			Amount of Cd ingested (μg)		
	"Small" N_s	"Large" N_l	Total	"Small"	"Large"	Total	"Small"	"Large"	Total
Control	9.63 ± 0.72	7.13 ± 1.63	16.76 ± 1.53	0.08 ± 0.01	0.17 ± 0.04	0.25 ± 0.04	0.012 ± 0.001	0.011 ± 0.003	0.023 ± 0.002
C_{10}	9.40 ± 0.99	6.20 ± 1.26	15.60 ± 1.50	0.08 ± 0.01	0.16 ± 0.03	0.24 ± 0.03	2.056 ± 0.216*	5.906 ± 1.205*	7.961 ± 1.197*
C_{50}	10.06 ± 1.61	7.75 ± 1.29	17.81 ± 2.10	0.08 ± 0.01	0.15 ± 0.02	0.23 ± 0.03	8.026 ± 1.285*	25.710 ± 4.283*	33.736 ± 4.520*
C_{100}	10.67 ± 2.00	11.56 ± 2.51*	22.23 ± 3.99*	0.07 ± 0.01	0.14 ± 0.03	0.21 ± 0.04	17.763 ± 3.331*	39.146 ± 4.488*	56.909 ± 10.729*

*The value is significantly different from control value ($p < 0.05$).

These results showed that the highest Cd exposure resulted in a clear lethal effect in the beetle larvae during their pupation. Lower Cd exposure levels did not result in clear effects.

4. Discussion

4.1. Cd transfer from H. aspersa snails to C. splendens beetles

This study showed that *H. aspersa* snails exposed since hatching for one and two weeks to Cd contaminated food exhibited BAF values increasing from 1.87 to 3.39 with increasing Cd concentration in their food and with the duration of exposure. Such ability of *H. aspersa* snails to concentrate Cd was demonstrated for adult individuals (Coughtrey and Martin, 1976) and this species, according to the classification of Dallinger (1993), is considered as macroconcentrator for Cd (BAF higher than 2). Our results showed that *H. aspersa* snails, even just after hatching, have the same ability than adults to concentrate Cd and thus, that very young snails inhabiting polluted areas may constitute heavily Cd contaminated preys for predatory invertebrates.

Despite these high concentrations in snail tissues, the present results showed that the consumption of snails by beetles was not significantly reduced. The absence of antifeedant effect was observed in another carabid beetle, *Poecilus cupreus*, exposed to Cu via contaminated soft part of Diptera pupae (Bayley et al., 1995). These authors pointed out that, contrarily to the hypothesis of Bengtsson and Rundgren (1984), adverse effects observed in beetles in their experiment were due to direct toxic effect of Cu rather than to an indirect effect due to starvation. Since snail consumption by beetles was not reduced in the present study, our results tended to confirm that Cd itself led to the observed effects rather than starvation. However, it is hard to say whether the effects were due to the direct toxicity of Cd or to the potential energy cost of detoxification. The potentiality of a physiological cost of tolerance to toxicants remains a debated phenomenon (van Straalen and Hoffmann, 2000).

Our results showed also that beetles of highest exposed group ate significantly more snails, maintaining the mass of tissue consumed at a similar level to that of other groups. Consequently, beetles inhabiting polluted areas, where preys are less numerous or exhibit a lower individual mass than in unpolluted areas, may be forced to improve their predation behaviour, which may alter their fitness (higher energy allocation to predation, higher exposition to predators, etc.). Although relatively subtle, such indirect effects of pollutants at individual, population or community level need to be considered in

Table 3
Cadmium concentration ($\mu g\,g^{-1}$ dry mass, mean ± SD) and BAF in larvae and adults of *C. splendens* exposed to increasing Cd concentrations via their preys

Group	Larvae		Adults	
	Concentration	BAF	Concentration	BAF
Control	0.13 ± 0.11	1.383	0.01 ± 0.01	0.128#
C_{10}	0.07 ± 0.04	0.002	0.04 ± 0.01	0.001
C_{50}	0.25 ± 0.11	0.002	0.21 ± 0.10*	0.001
C_{100}	0.63 ± 0.35*	0.002	0.53 ± 0.16*	0.002

*The value is significantly different from the control value ($p < 0.05$).
#Adult group significantly different from corresponding larva group ($p < 0.05$).

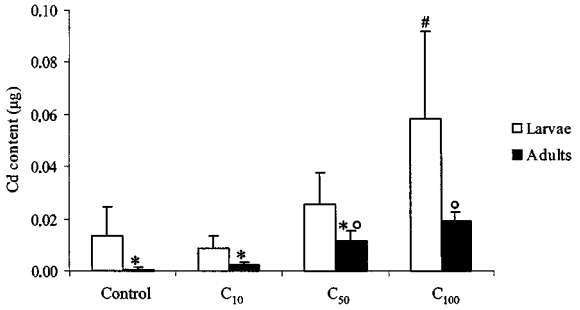


Fig. 1. Cd content (mean and SD) of larvae and adults of *C. splendens* beetles exposed to increasing Cd concentrations via their preys: * indicates adult groups significantly different from the corresponding larvae groups ($p < 0.05$); # indicates larva group significantly different from control ($p < 0.05$); o indicates adult groups significantly different from control ($p < 0.05$).

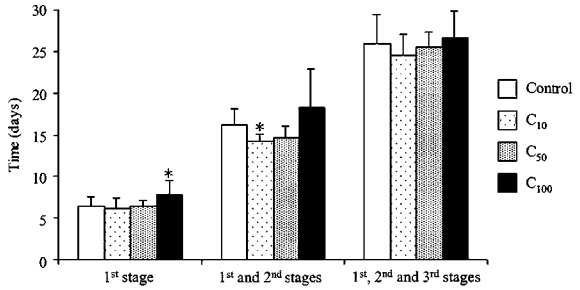


Fig. 2. Effect of Cd treatment on cumulated larval stage durations of *C. splendens* beetles (mean and SD): * indicates groups significantly different from control ($p < 0.05$).

ecotoxicological approaches as recently underlined by Kramarz and Laskowski (1999).

In spite of the important exposure to Cd via the snail tissues, very low concentrations were found in the predator at the end of its development (just before pupation). These results demonstrated that, even during their early life stages, carabid beetles have a high capacity to regulate effectively Cd. This was shown for adults of another carabid beetle species, *Notiophilus biguttatus*,

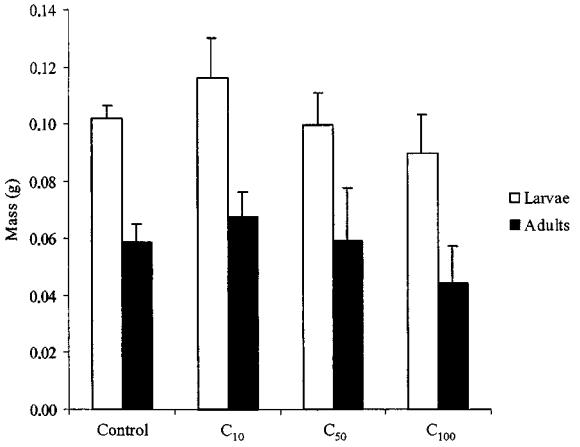


Fig. 3. Dry mass (mean and SD) of larvae and adults of *C. splendens* beetles exposed to increasing Cd concentrations via their preys.

exposed to contaminated collembolans (Janssen et al., 1991) and in *P. cupreus* exposed to Cd via contaminated housefly larvae (Kramarz, 2000). Lindqvist et al. (1995) provided data on the physiological mechanisms of excretion of several metals in adult carabid beetles (*Pterostichus niger*). For Cd, they showed that a portion was directly excreted without absorption although another portion was first absorbed by gut epithelium cells then excreted when these cells were renewed. Significantly higher Cd concentration and content were found in the higher exposed group of larvae (C_{100} group) compared to the control group. This may result from a difficulty of regulation processes to deal with the high amount of Cd ingested although the percentage of Cd retained remains lower than 0.1% as in the other exposed groups.

The Cd contents in adult beetles were significantly lower than those in the larvae, showing a loss of Cd during metamorphosis. Such loss of Cd has been reported for several insect species (Lindqvist et al., 1995) and these authors showed that, in the beetle *Tenebrio molitor*, two pools of Cd could be distinguished in the tissues (Lindqvist and Block, 1995). One pool, associated

with the gut epithelium, was lost to a large part during metamorphosis because the epithelium was renewed (the same phenomenon occurred during moulting but only for a small percentage of the Cd content). Another one, which has penetrated into other tissues through the gut epithelium, was not lost during metamorphosis. In the present study, after metamorphosis, the two highest exposed groups of beetles (C_{50} and C_{100}) exhibited higher Cd concentration and content than control group (Table 3). According to Lindqvist and Block (1995), the Cd remaining in the beetle bodies after metamorphosis was probably the portion that has penetrated into the beetle tissues through the gut epithelium and one can suspect further deleterious effects in adults at cellular level (Swiergosz, 2000).

Two beetle larvae had particularly high Cd concentrations which were associated with developmental disturbances. These particular responses of individuals to Cd remain unclear but demonstrate an absence or a lower ability of these individuals to regulate the metal. Another beetle larva exhibited a very high Cd concentration, but was at its normal developmental stage when it was sampled for analysis. Consequently, we do not know whether this larva would have been able to perform its metamorphosis or not. Although still poorly understood, these inter-individuals variations in response to pollutants have attracted interest in ecotoxicological researches and need to be further studied (Depledge, 1990).

4.2. Effects of Cd exposure via the preys on C. splendens

The present study showed that *C. splendens* exposure to Cd contaminated snails led to 31% of mortality at the highest level of exposure. The mortality observed in the present study occurred during pupation, which is in agreement with results of Bayley et al. (1995). Indeed, the mortality observed in *Pterostichus cupreus* exposed to Cu via their preys appeared mainly during pupation (Bayley et al., 1995). These results illustrated the high sensitivity of these holometabolous insects to heavy metals during the pupal stage. In contrast, no effect on mortality was detected in *P. cupreus* exposed to concentrations of Zn and Cd reaching 6400 and 800 $\mu g\,g^{-1}$ respectively (Kramarz and Laskowski, 1997; Kramarz, 2000). These differences may be explained by species-specific resistance to heavy metals.

The data on Cd treatment effect on larval stage duration were different, depending on the considered larval stage. The first stage was significantly lengthened for the C_{100} group although this difference did not appear for the next stages. In the second stage, however, the only effect observed was a significant shortening of development in the lowest exposed C_{10} group. The lengthening of larval stage durations (or total larval development) was successfully used as endpoint to evaluate the toxicity of Zn in isopods (Drobne and Štrus, 1996) and of Cu and Cd in *P. cupreus* (Bayley et al., 1995; Kramarz, 2000). Read et al. (1987) also reported delayed maturation in carabid populations inhabiting woodlands polluted by heavy metals. Such delays in the development (and/or sexual maturity) may have repercussions on exposed populations (Caswell, 2000). The shortening of the larval stage duration may be attributed to a "hormesis" phenomenon, which has been observed in numerous experiments at low level exposure with different pollutants (Hoffman and Parsons, 1994). This phenomenon was also evoked by Kramarz and Laskowski (1997) and Kramarz (2000) to explain the modifications of larval development duration of beetles exposed respectively to Zn and Cd. The term hormesis describes a stimulatory effect of subinhibitory concentrations of toxic substances and it is presumed that this effect is also beneficial (Moriarty, 1999). In the present case, the shortening of the larval stage duration may bring forward the date of first reproduction, which could be beneficial at individual and population levels.

5. Conclusion

Cd macroconcentrator organisms such as *H. aspersa* snails inhabiting polluted areas may represent a risk of secondary poisoning for predatory invertebrates, such as the carabid beetle *C. splendens*. Mortality was the most important effect observed on the beetle and occurred only for the highest exposure level and during metamorphosis, a critical life stage in holometabolous insects. Clear sublethal effects such as modification of larval stage duration were not observed in the present study but this is in agreement with some previous studies on other metals and/or species. Although Cd in snails is thought to be readily available since it is mainly stored by linkage to soluble proteins (Laskowski and Hopkin, 1996b), high capacity of beetle larvae to regulate Cd, even at high exposure level, allowed them to maintain very low Cd concentrations in their body. These data reinforce previous studies (Janssen et al., 1991; Laskowski and Maryanski, 1993) which showed that studies on transfer of metals in food chains should not considered only storage forms (i.e. bioavailability) of metals in preys but also the physiology of the predator.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the French Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME), contract no. 98 93 021. Special thanks are due to J.-Y. Robert and F. Maillot (Museum de Besançon) for providing us with *C. splendens* and for

much helpful advice on carabid beetle rearing. We are grateful to C. Lovy and D. Rieffel for technical assistance. We thank M. Cœurdassier, T. Déforêt, P. Giraudoux, L. Gomot and F. Raoul from the Biology and Ecophysiology Department for many fruitful discussions. The authors are also indebted to J. Dat for improving the English.

References

Bayley, M., Baatrup, E., Heimbach, U., Bjerregaard, P., 1995. Elevated copper levels during larval development cause altered locomotor behavior in the adult carabid beetle *Pterostichus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). Ecotoxicol. Environ. Saf. 32, 166–170.

Beeby, A., 1985. The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfer of lead through a polluted ecosystem. J. Appl. Ecol. 22, 267–275.

Beeby, A., Eaves, S.L., 1983. Short-term changes in Ca, Pb and Zn concentrations of the Garden Snail *Helix aspersa* Müller from a Central London car park. Environ. Pollut. 30, 233–244.

Bengtsson, G., Rundgren, S., 1984. Ground-living invertebrates in metal-polluted forest soils. Ambio 13, 29–33.

Berger, B., Dallinger, R., 1993. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental pollution. Environ. Monitor. Assess. 25, 65–84.

Caswell, H., 2000. Life table response experiments in ecotoxicology. In: Kammenga, J., Laskowski, R. (Eds.), Demography in Ecotoxicology. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 43–55.

Cooke, A.S., Greig-Smith, P.W., Jones, S.A., 1992. Consequences for vertebrate wildlife of toxic residues in earthworm prey. In: Greig-Smith, P.W., Becker, H., Edwards, P.J., Heimbach, F. (Eds.), Ecotoxicology of Earthworms. Intercept, Hants, UK, pp. 139–155.

Cooke, M., Jackson, A., Nickless, G., Roberts, D.J., 1979. Distribution and speciation of cadmium in the terrestrial snail *Helix aspersa*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 2, 445–454.

Coughtrey, P.J., Martin, M.H., 1976. The distribution of Pb, Zn, Cd and Cu within the pulmonate mollusc *Helix aspersa* Müller. Oecologia (Berl.) 23, 315–322.

Coughtrey, P.J., Martin, M.H., 1977. The uptake of lead, zinc, cadmium, and copper by the pulmonate mollusc *Helix aspersa* Müller and its relevance to the monitoring of heavy metal contamination of the environment. Oecologia (Berl.) 27, 65–74.

Dallinger, R., 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Dallinger, R., Rainbow, P.S. (Eds.), Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. Lewis, Boca Raton, FL, USA, pp. 245–289.

Dallinger, R., Berger, B., 1993. Function of metallothioneins in terrestrial gastropods. Sc. Tot. Environ. (Suppl.), 607–615.

Dallinger, R., Wieser, W., 1984. Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L.. Comp. Biochem. Physiol. 79, 117–124.

Depledge, M.H., 1990. New approaches in ecotoxicology: can inter-individual physiological variability be used as a tool to investigate pollution effects? Ambio 19, 251–252.

Drobne, D., Štrus, J., 1996. Moult frequency of the isopod *Porcellio scaber* as a measure of zinc-contaminated food. Environ. Toxicol. Chem. 15, 126–130.

Gomot, A., 1997. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 33, 209–216.

Gomot-de Vaufleury, A., 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb and pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 46, 41–50.

Gomot, A., Pihan, F., 1997. Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 38, 85–94.

Gomot-de Vaufleury, A., Pihan, F., 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. Chemosphere 40, 275–284.

Hoffman, A.A., Parsons, P.A., 1994. Evolutionary Genetics and Environmental Stress. Oxford University Press, Oxford, UK.

Janssen, M.P.M., Bruins, A., De Vries, H., Van Straalen, N.M., 1991. Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 20, 305–312.

Kabata-Pendias, A., Pendias, H., 1992. Trace Elements in Soils and Plants. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Kramarz, P., 2000. Cadmium and zinc accumulation and its demographic effects in invertebrates. In: Kammenga, J., Laskowski, R. (Eds.), Demography in Ecotoxicology. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 91–111.

Kramarz, P., Laskowski, R., 1997. Effect of zinc contamination on life history parameters of a ground beetle, *Poecilus cupreus*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 59, 525–530.

Kramarz, P., Laskowski, R., 1999. Toxicity and possible food-chain effect of copper, dimethoate and a detergent (LAS) on a centipede (*Lithobius variegatus*) and its prey (*Musca domestica*). Appl. Soil Ecol. 13, 177–185.

Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996a. Effect of Zn, Cu, Pb and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). Ecotoxicol. Environ. Saf. 34, 59–69.

Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996b. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*): implications for predators. Environ. Pollut. 91, 289–297.

Laskowski, R., Maryanski, M., 1993. Heavy metals in epigeic fauna: trophic-level and physiological hypotheses. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 50, 232–240.

Lindqvist, L., Block, M., 1995. Excretion of cadmium during moulting and metamorphosis in *Tenebrio molitor* (Coleoptera; Tenebrionidae). Comp. Biochem. Physiol. 111, 325–328.

Lindqvist, L., Block, M., Tjälve, H., 1995. Distribution and excretion of Cd, Hg, methyl-Hg and Zn in the predatory beetle *Pterostichus niger* (Coleoptera: carabidae). Environ. Toxicol. Chem. 14, 1195–1201.

Malausa, J.C., 1977. L'élevage des coléoptères *Carabidae*: dans la perspective d'une multiplication de masse. Ann. Zool. Ecol. Anim. 9, 497–505.

Moriarty, F., 1999. Ecotoxicology, The Study of Pollutants in Ecosystems. Academic Press, London, UK.

Morgan, A.J., Morris, B., James, N., Morgan, J.E., Leyshon, K., 1986. Heavy metals in terrestrial macroinvertebrates:

species differences within and between trophic levels. Chem. Ecol. 2, 319–334.

Newman, M.C., Mulvey, M., Beeby, A., Hurst, R.W., Richmond, L., 1994. Snail (*Helix aspersa*) exposure history and possible adaptation to lead as reflected in shell composition. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27, 346–351.

Peake, J., 1978. Distribution and ecology of the Stylommatophora. In: Fretter, V., Peake, J. (Eds.), Pulmonates, Systematics, Evolution and Ecology. Academic Press, London, UK, pp. 429–526.

Read, H.J., Wheather, C.P., Martin, M.H., 1987. Aspects of the ecology of carabidae (coleoptera) from woodlands polluted by heavy metals. Environ. Pollut. 48, 61–76.

Russell, L.K., DeHaven, J.I., Botts, R.P., 1981. Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). Bull. Environ. Contam. Toxicol. 26, 634–640.

Siegel, S., Castellan Jr., N.J., 1988. Nonparametric Statistics for the Behavioral Sciences. McGraw-Hill International Editions, New York, USA.

Stoeppler, M., 1991. Cadmium. In: Merian, E. (Ed.), Metals and their Compounds in the Environment: Occurrence, Analysis and Biological Relevance. VCH Publishers, Weinheim, Germany, pp. 803–851.

Swiergosz, R., 2000. Tissue changes in animals and their population effects. In: Kammenga, J., Laskowski, R. (Eds.), Demography in Ecotoxicology. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 241–261.

van Straalen, N.M., Hoffmann, A.A., 2000. Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants. In: Kammenga, J., Laskowski, R. (Eds.), Demography in Ecotoxicology. John Wiley and Sons, Chichester, UK, pp. 147–161.

Section IV.

Transfert d'éléments trace métalliques (Cd, Cu, Ni, Pb et Zn) dans une chaîne alimentaire "sol – plante – invertébré" en microcosme

Cet article est en préparation. Les auteurs sont Renaud Scheifler, Annette de Vaufleury, Nadia Crini et Pierre-Marie Badot.

Résumé

Dans cette étude, des microcosmes cylindriques en acier inoxydable ont été développés et utilisés au laboratoire pour évaluer les transferts de 5 éléments trace métalliques (ETM), le Cd, le Cu, le Ni, le Pb et le Zn, dans une chaîne alimentaire simplifiée "sol – plante (Laitue *Lactuca sativa*) – invertébré (escargot *Helix aspersa*)". Deux sols agricoles ont été utilisés, un non-pollué et un contaminé, la laitue a été cultivée pendant 8 semaines, puis les escargots ont été introduits dans les microcosmes ("escargots M") et exposés pendant les 8 semaines suivantes. Lors d'expériences complémentaires, des escargots ont été élevés en containers plastiques ("escargots C") ne contenant pas de sol et ont été nourris avec de la laitue prélevée dans les microcosmes contenant le sol pollué ou non-pollué. La croissance des escargots a été mesurée toutes les 2 semaines et les concentrations en ETM ont été mesurées dans les tissus, après 4 semaines d'exposition dans les systèmes non-pollués et après 2, 4 et 8 semaines dans les systèmes pollués. Aucun effet des ETM sur la croissance n'a été mis en evidence. Après 4 semaines d'exposition, les concentrations dans les tissus des escargots exposés dans les systèmes pollués sont beaucoup plus élevées que celles mesurées dans les escargots exposés dans les systèmes non-pollués, sauf pour le Cu et le Ni. Les concentrations en Cd et en Zn dans les escargots exposés aux systèmes pollués montrent une augmentation régulière au cours du temps, les concentrations en Pb augmentent rapidement dans les 2 premières semaines puis restent stables, les concentrations en Cu restent stables pendant toute l'expérience, et les concentrations en Ni diminuent rapidement dans les 2 premières semaines puis restent faibles jusqu'à la fin de l'expérience. La comparaison des concentrations entre les escargots M et C a permis d'estimer la contribution relative du sol et de la plante dans l'accumulation totale en ETM. La contribution du sol est supérieure à 80% dans le cas du Pb et est d'environ 30% dans le cas

du Zn, pour toutes les durées d'exposition. La contribution du sol dans l'accumulation du Cd n'a pas été régulière au cours du temps. Les microcosmes utilisés dans cette étude, simples, d'un coût modéré et efficaces, fournissent un outil susceptible d'être utilisé dans des procédures d'évaluation du risque.

Transfer of metallic trace elements (Cd, Cu, Ni, Pb and Zn) in a "soil – plant – invertebrate" food chain : a microcosm study

Abstract

In this study, stainless steel cylindrical microcosms were developed and used in laboratory conditions to evaluate the transfer of five metallic trace elements (MTE), Cd, Cu, Ni, Pb and Zn, in a simplified food chain "soil – plant (lettuce *Lactuca sativa*) – invertebrate (snail *Helix aspersa*)". Two field agricultural soils were used, an unpolluted one and a contaminated one. Lettuce was cultivated for 8 weeks, then snails were introduced into the microcosms (M-snails) and exposed for the 8 following weeks. In parallel experiments, snails were reared in containers (C-snails) without soil and were exposed only to lettuce leaves, which were cultivated on the unpolluted or the polluted soil used in the microcosm experiment. Snail growth was assessed every 2 weeks and snail tissues were analysed for MTE concentrations after 4 weeks of exposure in unpolluted systems and after 2, 4 and 8 weeks in polluted systems. No effect of MTE on snail growth was found. After 4 weeks of exposure, concentrations in snails exposed to polluted systems were much higher than those measured in snails exposed to unpolluted systems, except for Cu and Ni. Cd and Zn concentrations in snails exposed to polluted environment showed a regular increase over time, Pb concentrations rapidly increased in the first 2 weeks, which then remained stable, Cu concentrations remained stable during all experiment and Ni concentrations rapidly decreased in the first 2 weeks. Comparison concentrations between M- and C-snails allowed estimating the relative contribution of soil and plant in the total bioaccumulation in snail tissues. The contribution of soil was higher than 80% for Pb and around 30% for Zn for all exposure durations. Contribution of soil in Cd accumulation was not consistent over time. The microcosms used in this study, simple, cheap and efficient, provide a useful tool for food chain transfer risk assessment purposes.

Introduction

Transfer of metallic trace elements (MTE) in food chains of terrestrial ecosystems is a topical subject of concern in industrial (Hendricks *et al.* 1995; Müller and Anke 1994), mining (Gnamus *et al.* 2000; Laurinolli and Bendell-Young 1996) and heavy-traffic roadside areas (Muskett and Jones 1980; Wade *et al.* 1980). The problem concerns also agricultural areas when sewage sludge, whose production is increasing in many countries (Bruce *et al.* 1999; McGrath *et al.* 1999; IFEN 2001), are applied.

Present techniques to monitor the transfer of MTE in food chains are principally based on biomonitoring studies, in which soils, plants and organisms are sampled and MTE concentrations determined. The data provided by these studies can subsequently be used in modelling approaches, whose objective is to derive environmental quality criteria able to protect all food chain components (Gorree *et al.* 1995; Jongbloed *et al.* 1996; Traas *et al.* 1996). However, field studies cannot determine accurately the diet of the studied organisms, then cannot define the different transfer routes of MTE and their relative importance. Moreover, these studies generally do not provide any information on the effects resulting from the MTE transfer in the various organisms studied. Therefore, modelling approaches, in part because of this lack of adequate data, suffer from a relatively high degree of uncertainty.

Microcosms may represent interesting tools to improve the knowledge on pollutant transfer in food chains. Most microcosm studies were dedicated to impact of pollutants on microarthropod or microbe communities (Parmelee *et al.* 1997) and to the transfer of pollutants from the soil to earthworms. In the latter case, both field (Baker *et al.* 1996; Svendsen and Weeks 1997a, b) and laboratory microcosms (Edwards *et al.* 1996) were successfully used. Microcosm studies dealing with pollutant transfer along food chains including other organisms are scarce.

Though, terrestrial gastropod molluscs should represent, as earthworms, a possible pathway for pollutants along food chains. Indeed, they are surface-dwelling herbivorous and detritivorous invertebrates, which also eat a substantial proportion of soil in their diet (Chevalier *et al.* 2001; Iglesias and Castillejo 1999; Speiser 2001). Many gastropod species are MTE macroconcentrators (Dallinger 1993) and constitute prey for many invertebrate (predatory insects like carabid beetles) and vertebrate (amphibians in terrestrial forms, reptiles, birds and mammals) predators (Peake 1978). Although molluscs were used for both laboratory (Laskowski and Hopkin 1996a; Gomot-de Vaufleury and Bispo 2000; Scheifler *et al.* 2002b) and field (Berger and Dallinger 1993; Beeby and Richmond 1998; Gomot-de Vaufleury and Pihan 2000) ecotoxicological works, little is known about their diet in the field (Speiser 2001). Martin and Coughtrey (1982), for instance, reported Bioaccumulation Factors (BAFs) for Cd in terrestrial snails ranging from 1.37 to 7.37, arbitrarily considering the litter as the only food source. In their study of the metal contamination of a car park in central London, Beeby and Eaves (1983) took Dandelion leaves as the major food of *H. aspersa*. Both studies neglected the soil as another food – and pollutant – source. In laboratory conditions, it was found that juvenile *Helix aspersa* snails fed contaminated plant leaves accumulated Cd to higher concentrations in their tissues than in the contaminated food, with BAFs decreasing from 4.8 to 2.4 with increasing Cd concentration in the food (Scheifler *et al.* 2002b). At the highest concentration (177 $\mu g.g^{-1}$), growth and food consumption were reduced. Coeurdassier *et al.* (2002) exposed juvenile snails to OECD Cd contaminated substrate and found dose-dependent bioaccumulation and effects on growth in *H. aspersa*

snails. However, the relative contribution of soil and plant in MTE bioaccumulation in snail tissues was never studied, neither in the field nor in laboratory studies.

Therefore, the aims of this study were (1) to develop a microcosm design in which an experimental food chain soil – plant –snail could be studied, (2) to evaluate the transfer of Cd, Cu, Pb, Ni and Zn in this experimental food chain, (3) to assess the possible effects on snail growth of the MTE transfer and (4) to determine the relative contribution of soil and plant in the total MTE accumulation in snail tissues.

Materials and Methods

Animals

H. aspersa snails came from our standardised laboratory rearing described elsewhere (Gomot-de Vaufleury 2000) The individuals used in the test were 2 months-old and weighed 3.2 ± 0.4 g.

Plant

The lettuce (*Lactuca sativa* var. "Reine de mai", biological agriculture, Vilmorin) was chosen as vegetal model because this vegetable is a growing subject of concern in human intoxication by MTE, especially in private kitchen garden close to urban or industrial areas (Schwartz *et al.* 2000). Moreover, this vegetable is well accepted as food source by *H. aspersa* and its cultivation in laboratory conditions is easy and fast.

Soils

Two agricultural soils were used in this study. The first one came from an agricultural area of the northern France and was a brown (FAO classification: Cambisol) soil polluted by aerially deposition of various MTE coming from surrounding metallurgic industries. The second soil, unpolluted, is a brown soil (FAO classification: Luvisol), which came from the "Bouzule" experimental farm of the French INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) located in northeastern France. The farm is far from any important source of pollution (industrial, mining or heavy traffic areas). Both soils were air-dried, sieved to 5 mm and humidified with ultra-pure water to about 70% of their respective water holding capacity before their use in the experiment. Physico-chemical properties and MTE total concentrations of both soils are given in Table 1.

Table 1. Physico-chemical characteristics of soils.

Characteristic	Polluted soil	Unpolluted soil
Clay, $g.kg^{-1}$	152	284
Silt, $g.kg^{-1}$	533	529
Sand, $g.kg^{-1}$	315	187
Organic matter, $g.kg^{-1}$	64.3	109
C/N	20.9	10.0
pH_{H2O}	7.9	6.0
Total $CaCO_3$, $g.kg^{-1}$	18	< 1
P_2O_5, $g.kg^{-1}$	0.176	0.136
CEC, $cmol.kg^{-1}$	11.9	15.3
Total Cd, $mg.kg^{-1}$	23.4 ± 1.4	0.9 ± 0.1
Total Cu, $mg.kg^{-1}$	52.2 ± 5.3	18.1 ± 0.9
Total Ni, $mg.kg^{-1}$	11.5 ± 0.8	45.8 ± 4.0
Total Pb, $mg.kg^{-1}$	1212.7 ± 50.4	32.2 ± 3.2
Total Zn, $mg.kg^{-1}$	1823.7 ± 85.7	100.3 ± 4.3

Snail exposure: microcosm and container designs

In a first design (Fig. 1. a.), snails were exposed in stainless-steel cylindrical microcosms (diameter and height: 0,25 m) filled with about 5 cm of carefully washed gravel (to constitute a draining layer) and 9.8 Litres of soil. Each microcosm, whose bottom is open, was placed on a plant tub. Every 2 to 3 days, the microcosms were watered with 500 ml of distilled water in the plant tub and with 200 ml distributed by simulating rain with a watering can as homogeneously as possible. Four replicate microcosms per soil were used. Fifteen seeds of lettuce were planted in each microcosm. After 4 weeks of culture, the sturdier 5 plants were kept in each microcosm. After 8 weeks of culture, 12 *H. aspersa* snails were introduced in each microcosm. A lid made of a PVC structure and a glass fibre netting (mesh size: 1 mm) was securely fitted over the top of the microcosms. Snails exposed in microcosms will be called M-snails further in this paper.

In a second design (Fig. 1. b.), snails were reared in transparent polystyrene containers of 3200 cm^3 (E1DBBAC001, IFFA-CREDO, 69 L'Arbresle, France). Four snails were reared in each container. A layer of damp paper was put down on the bottom of the containers to maintain a high humidity. The paper was renewed 3 times a week throughout the experiment. Snails were fed on the same days by lettuce leaves randomly sampled in microcosms containing polluted or unpolluted soils. Thus, in this modality, snails were exposed to lettuce only, which will allow calculating the relative contribution of plant and soil in the MTE bioaccumulation in snail tissues. Snails exposed in containers will be called C-snails further.

Fig. 1. a. Microcosm design: global aspect of 4 replicate microcosms. **b.** Container design: detail of a polystyrene cristal box.

During the 8 first weeks of experiment (corresponding to the lettuce cultivation), microcosms were in a growth chamber at 14/10h day/night cycle photoperiod (light intensity: 300 µmol photons.m^{-2}.s^{-1}). When snails were introduced and until the end of the experiment (the next following 8 weeks), the photoperiod was modified to an 18/6h day/night cycle, which is better suited for snail growth (Gomot 1994). During all the experiment (i.e. 16 weeks), the temperature was 23°C during the day and 17°C during the night.

In microcosms, the snails, which avoid high light intensity, could stay under the cover of lettuce leaves during the day.

The containers were placed in the same growth chamber, close to the microcosms. However, since containers contained no shelter under which snails could avoid excess of light, the containers were covered with a translucent plastic plate to provide snails with acceptable light conditions.

Snail and lettuce sampling for MTE analysis and snail growth assessment

Exposure durations were 4 weeks for unpolluted systems and 2, 4 and 8 weeks for polluted systems to study the kinetics of MTE bioaccumulation in snail tissues. At each sampling, 4 snails were taken in the first microcosm of each series for MTE analysis. At 4 weeks of exposure, 4 snails were sampled in 3 microcosms to assess the repeatability among replicate microcosms. At each sampling, snails reared in a corresponding container were also sampled to measure the MTE concentrations in snails exposed to plant leaves only.

Plant samples were taken when snails were introduced in the system (8 weeks of cultivation) and after 4 and 8 weeks of exposure (corresponding respectively to 12 and 16 weeks of cultivation) for polluted soil and after 4 weeks for unpolluted one (12 weeks of cultivation).

Snails in all microcosms and containers were weighed within 0.1 g every 2 weeks to assess growth.

Chemical analysis

At each sampling, snails were starved for 48 hours in containers without paper nor food. Then, the snails were sacrificed by deep-freezing and stored at –20°C until analysis. After defrosting, snails were removed from their shell and the soft tissues were oven-dried (60°C) to constant dry mass. Snail samples were digested with 4 ml nitric acid (HNO_3 50%) in an oven (60°C) for 48 hours in tightly closed polystyrene crystal tubes. Plants were oven-dried (60°C) to constant dry mass and samples of about 0.3 g were digested in 3.4 ml nitric acid (HNO_3 65%) and 0.6 H_2O_2 30% in the same way than snail samples. The tissues were analysed by inductively coupled plasma emission spectrometry (ICP, Yvon-Jobin 238-ICP). The validity of analytical method was checked using standard biological reference material (TORT-2, lobster hepatopancreas from NRCC-CNRL, Canada). Values for the different MTE were consistently within 5% of the certified values for all MTE, except for Pb, for which the measures were within 25% of the certified values.

Statistical analysis

Differences in snail fresh masses, MTE concentrations and contents in the different compartments of unpolluted and polluted systems were analysed with the non-parametric Mann-Whitney test (Sokal and Rohlf 1997). Differences between microcosms and containers were also analysed with this test. Repeatability for growth and MTE bioaccumulation among replicate microcosms was analysed with the non-parametric Kruskal-Wallis test (Sokal and Rohlf 1997).

Results

Mortality

The mortality was extremely low (< 1%), showing that the microcosm design used in this experiment provided snails with well-being conditions.

Snail growth

With regard to snail growth, repeatability was satisfactory since no significant differences among replicate microcosms or containers were found, for unpolluted as well as for polluted systems (data not shown). Therefore, data from replicate microcosms were added for further statistical treatments. In unpolluted systems, the snail fresh mass increased in the first 2 weeks, then decreased slightly but significantly in the next 2 weeks (Table 2). In polluted

systems, the growth was also significant in the first 2 weeks and the masses remained constant until the end of the experiment (Table 2). The comparison between unpolluted and polluted systems showed a significant difference in snail fresh mass for the 2-weeks exposure duration only (Table 2). No differences were found between M- and C-snails whatever the exposure duration (Table 2).

Table 2. Evolution of fresh mass (g, mean ± standard deviation) of *H. aspersa* snails exposed in microcosms (M-snails) or in containers (C-snails) to polluted or unpolluted soil.

		Exposure duration (weeks)				
		0	**2**	**4**	**6**	**8**
Unpolluted	M-snails	3.2 ± 0.5	5.2 ± 0.9	4.7 ± 1.0	ND[a]	ND
	C-snails	3.2 ± 0.3	4.7 ± 0.4	5.0 ± 0.5	ND	ND
Polluted	M-snails	3.2 ± 0.3	4.8 ± 0.5*	4.8 ± 0.7	4.8 ± 0.9	4.5 ± 0.8
	C-snails	3.3 ± 0.4	4.4 ± 0.7*	4.2 ± 0.8	5.2 ± 0.3	5.5 ± 1.8

* indicates significant differences between snails exposed to polluted and unpolluted soil
[a] ND: no data

MTE concentrations in the 3 compartments of the food chain

MTE concentrations in unpolluted and polluted soils

The polluted soil exhibits total Cd, Cu, Pb and Zn concentrations respectively 26, 2.9, 37.7 and 18.2-fold higher than those of the unpolluted soil (Table 1). By contrast, this last soil, developed on Ni-rich bedrocks in eastern France, shows 4.0 times higher Ni concentrations than the polluted soil.

MTE concentrations in lettuce

After 8 weeks of cultivation, Cd and Pb concentrations were significantly higher in lettuce grown on the polluted soil than those measured in lettuce grown on the unpolluted soil (Figure 2). After 12 weeks of cultivation, only Cd concentrations remained significantly higher in lettuce grown on the polluted soil. Differences in Zn concentrations were not significant, neither after 8 weeks of cultivation nor after 12 weeks. Cu and Ni concentrations were higher in lettuce grown on the unpolluted soil compared to that grown on the polluted one. For Ni, this result is in agreement with the higher Ni concentration in the unpolluted but naturally Ni-rich soil. However, for Cu, whose concentration is about 3 fold higher in the polluted soil, this can be explained by a difference in Cu phytoavailability between the 2 soils.

Kinetic data showed that all MTE concentrations increased significantly between 8 and 12 weeks of cultivation in lettuce grown on the unpolluted soil. In lettuce grown on the polluted soil, only Cu and Zn increased significantly between the first and the second sampling date. All MTE concentrations except Cu increased between the second and the third sampling

date. At the end of the experiment, all MTE concentrations except Ni were higher than at the first sampling date. The increase of MTE concentrations was particularly important for Cd, Ni, Pb and Zn and suggested that the increase of lettuce metabolism due to blooming (which indeed occurred in the fourth month of cultivation) was accompanied by a high increase of MTE uptake. BAFs in lettuce are presented in Table 3. a. Lettuce grown in unpolluted soil had BAFs higher than 1 for Cd and Zn, BAFs for Cu were intermediate (around 0.7) and BAFs for Ni and Pb were largely lower (< 0.3). For lettuce grown on the polluted soil, BAFs reached nearly 1 for Cd and BAFs for all other MTE were lower than 0.3.

Table 3. a. Bioaccumulation Factors (BAFs) for Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in lettuce (*Lactuca sativa*) grown in the unpolluted and the polluted soil. **b.** Bioaccumulation Factors (BAFs) for Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in and snails (*Helix aspersa*) exposed to unpolluted or polluted environment (microcosms, M-snails or containers, C-snails).

a. Lettuce		**Unpolluted soil**		**Polluted soil**		
Cultivation time		8 weeks	12 weeks	8 weeks	12 weeks	16 weeks
BAFs in lettuce	Cd	0.988	1.616	0.570	0.562	0.942
	Cu	0.621	0.787	0.101	0.206	0.217
	Ni	0.131	0.274	0.102	0.112	0.164
	Pb	0.057	0.158	0.006	0.004	0.074
	Zn	0.738	1.251	0.053	0.106	0.239

b. Snails		**Unpolluted systems**	**Polluted systems**	
Exposure duration		4 weeks	4 weeks	8 weeks
BAFs in C-snails	Cd	1.333	2.035	3.123
	Cu	15.129	23.659	15.832
	Ni	0.359	1.567	0.672
	Pb	0.731	5.531	0.421
	Zn	2.658	2.613	1.529
BAFs in M-snails calculated with soil concentration	Cd	2.924	1.918	3.006
	Cu	10.894	3.981	4.585
	Ni	0.100	0.154	0.127
	Pb	0.616	0.197	0.191
	Zn	2.893	0.384	0.497
BAFs in M-snails calculated with lettuce concentration	Cd	1.809	3.413	3.191
	Cu	13.851	19.369	21.176
	Ni	0.366	1.372	0.777
	Pb	3.894	44.189	2.578
	Zn	2.313	3.632	2.081

MTE concentrations in snails

Kinetic of MTE bioaccumulation in snails exposed to the polluted environment.

The evolution of MTE concentrations in snail tissues over time was very different, depending on the element considered. Cd and Zn concentrations increased regularly over time in M- as well as in C-snail groups, with concentrations significantly higher in M-snails during the first 4 weeks of experiment but no more after 8 weeks of exposure (Fig. 3. a. and e.). Cu concentrations in M- and C-snails were slightly higher for the three exposure duration than at $t = 0$, with no differences between the 2 M- and C-snails (Fig. 3. b.). Ni concentrations decreased dramatically in M- and C-snails (Fig. 3. d.). The decrease was significant between each sampling dates for M-snails. Pb concentrations increased dramatically and quickly (within the 2 first weeks) in M-snails then remained stable (Fig. 3. d.). Concentration of Pb in C-snails increased significantly within the first 2 weeks (but to a much lower extent than in M-snails) and then showed a slow (non-significant) increase in the end of the experiment. A large difference in Pb concentrations was always found between M- and C-snails.

Comparison of MTE concentrations between snails exposed to unpolluted and to polluted environments

Comparisons showed that Cd, Pb and Zn concentrations were significantly higher in M-snails exposed to the polluted environment than in M-snails exposed to the unpolluted one (Table 4). The differences were significant in C-snails for Cd and Pb but not for Zn ($p = 0.08$). Ni concentrations were higher in M- and C-snails exposed to the unpolluted but naturally Ni-rich soil, compared to those measured in snails exposed to the polluted soil (Table 4). No differences were found for Cu concentrations, neither between M- nor between C-snails (Table 4).

Table 4. Comparison of MTE concentrations ($\mu g.g^{-1}$, dry mass, mean ± standard deviation) in snails exposed for 4 weeks to unpolluted or polluted systems, in microcosms (M-snails) or in containers (C-snails).

		Cd	Cu	Ni	Pb	Zn
M-snails	Polluted	44.8 ± 15.9[a]	207.9 ± 64.2	1.8 ± 0.3[a]	239.2 ± 57.3[a]	699.9 ± 101.5[a]
	Unpolluted	2.6 ±0.9	196.8 ± 30.9	4.6 ± 1.6	19.8 ± 6.1*	290.2 ± 35.4
C-snails	Polluted	26.7 ± 7.7[a]	254.2 ± 57.5	2.0 ± 0.5[a]	29.7 ± 9.5[a]	508.5 ± 133.2
	Unpolluted	1.9 ± 0.6	215.0 ± 60.0	4.5 ± 0.8	3.7 ± 1.2	333.5 ± 60.0

[a] indicates concentration in snails exposed to polluted environment significantly different from that of snails exposed to unpolluted environment ($p < 0.05$)

BAFs in snails and calculations of relative contribution of lettuce and soil in the total MTE bioaccumulation in snail tissues

BAFs in snails are presented in Table 3. b. For M-snails, which were exposed to soil and lettuce, BAFs were calculated with soil then with plant concentrations, to allow comparison with some literature data presented in the Tables 5, 6 and 7.

From the differences between concentrations in M- and in C-snails, the theoretical contribution of soil and lettuce was calculated, considering that concentrations in M-snails represented 100% of the MTE bioaccumulation in snail tissues. The contribution of soil for Cd was 40% for 2 and 4 weeks of exposure and only 2% for the last exposure duration. For Pb, the contribution of soil ranged from 81 to 89% for all exposure durations. For Zn, the soil contributed to 46%, 28% and 27% in the total Zn bioaccumulation in snail tissues for 2, 4 and 8 weeks of exposure, respectively.

Repeatability

The repeatability (measured after 4 weeks of exposure) among replicate microcosms for both polluted and unpolluted systems was remarkably good since no significant differences were found, neither in growth data (Table 2) nor in accumulation data (data not shown).

Discussion

In this work, we developed a simple microcosm design in which the transfer of five MTE in a soil – plant – snail food chain was studied. The main originalities of the present study are (1) the use of a surface-dwelling invertebrate exposed to both soil and plant contamination and (2) the use of the container exposure modality to separate exposure sources. Therefore, the present data constitute the first results about the relative importance of the different sources of exposure to MTE for a terrestrial gastropod. This study provides also the first kinetic data on MTE bioaccumulation in *H. aspersa* snails.

Transfer of Cd

Cd transfer in the soil – plant – snail food chain was high, showing that Cd in soil was phytoavailable to lettuce and that Cd in lettuce was bioavailable to snail.

The capacity of lettuce leaves to accumulate high concentrations of Cd may constitute a risk of poisoning for human. Such a risk may be high for lettuce cultivated in private kitchen gardens because of gardening practices, which were shown to be the main contamination source by Cd, and/or non-point sources of pollution when gardens are located close to urban, mining or traffic areas (Schwartz *et al.* 2000). In the present experiment, the Cd concentration in lettuce grown of polluted soil is much higher than the mean Cd

concentration (0.6 µg.g^{-1}) found by (Schwartz *et al.* 2000), in lettuce grown in 32 garden soils of France and Germany. Cd concentrations in lettuce grown on the unpolluted soil are in the range (0.2 to 4.7 µg.g^{-1}) found by (Schwartz *et al.* 2000).

BAFs values for Cd in C-snails exposed to contaminated lettuce were 2 to 3 (Table 3. b.), showing that Cd contained in lettuce leaves was readily bioavailable. The Cd concentrations found in M-snails tissues in the present study are in the same order than maximum values reported in snails sampled in heavily polluted areas (see literature data in Table 5). These BAFs values correspond to the classification of (Dallinger 1993), in which snails are considered as Cd macroconcentrators (i.e. BAF higher than 2). In a laboratory study, Laskowski and Hopkin (1996a) obtained a BAF of 2.1 in snails exposed for four months to 25.9 µg.g^{-1} of Cd in artificially contaminated food but found a BAF lower than 1 in snails exposed for the same duration to a mixture of Cd, Cu, Pb and Zn (Table 6, Laskowski and Hopkin 1996a). This lower BAF may be due to the interaction between Cd and Zn in the mixture. Indeed, in our experiment, the Zn:Cd ratio in the contaminated lettuce is around 4 to 5 times lower than that found in the food used by Laskowski and Hopkin (1996a). This lower ratio probably led to a lower interaction between these two MTE and may explain the high BAF value found for Cd in C- and M-snails. This interaction is well known to influence Cd and Zn bioaccumulation in and their toxicity to soil organisms, with antagonistic or additive effects, depending on the MTE, the endpoints (bioaccumulation, growth, reproduction,...) and the species studied (Van Gestel and Hensbergen 1997; Weltje 1998).

The comparison of concentrations measured in C- and in M-snails suggests that the soil contributed to 40% in the total Cd bioaccumulation in snail tissues during the first four weeks of exposure. The transfer of Cd from soil to snails is known to occur by 2 exposure routes: digestive (Gomot-de Vaufleury and Pihan 2002) and dermal route (Coeurdassier *et al.* 2002). However, the contribution of soil in the total bioaccumulation of Cd was never studied. Present data give only partial answer because the much lower contribution of soil at the last sampling date (only 2%) is difficult to interpret.

The regular increase of Cd concentration in snail tissues with time is in agreement with a study on *H. pomatia* exposed for 32 days to lettuce contaminated with Cd, Cu, Pb and Zn (Dallinger *et al.* 1984).

Transfer of Zn

As Cd, Zn was phytoavailable and the concentrations increased regularly in lettuce and in snails. In their kinetic study, Dallinger *et al.* (1984) observed a similar increase in *H. pomatia*. The concentration values reached for Zn in snail tissues are within the range of concentrations measured in individuals sampled in the field (Table 5), which is extremely large. Experimental data showed even a larger range, with concentrations capable to reach more than 3,800 µg.g^{-1} (Table 6: Gomot-de Vaufleury and Pihan 2002). The calculation of the

relative contribution of soil and plant showed relatively consistent data over time and it can be assumed that the contribution of soil and plant in the total bioaccumulation of Zn by snails in the field could be around 30-40% and 70-60%, respectively.

Transfer of Cu

Cu concentrations in C- as well as in M-snails exposed to polluted environment were unstable and did not show a clear increase. With around 20 and 50 $\mu g.g^{-1}$ (Table 1) none of these 2 soils can be considered polluted by Cu (Kabata-Pendias and Pendias 1992). As showed by the lower Cu concentrations in lettuce grown on the polluted soil, the phytoavailability of Cu in this soil was lower than in unpolluted one. From data of Tables 5 and 7, it can be concluded that the concentrations found in the present study correspond to the range of concentrations measured in field individuals. The variations of Cu concentrations with time observed in the present study as well as the discrepancies of Cu values in field individuals (Table 5) may be explained by a periodic loss of Cu, which was observed in slugs (Marigomez *et al.* 1986) and may also occur in the hepatopancreas and the mantle of *H. pomatia* (Dallinger *et al.* 1984). The regulation of Cu concentrations in snails is not more straightforward from experimental data. Laskowski and Hopkin (1996a) showed that snails exposed to a mixture of MTE in their food had Cu concentrations ranging from 100 to 300 $\mu g.g^{-1}$, even if the Cu concentration in the food was extremely high (more than 1300 $\mu g.g^{-1}$). However, in the same experiment, the contamination of the food with Cu only led to much higher concentrations in snail tissues, suggesting that the presence of high concentrations of other MTE may increase the Cu regulation.

Transfer of Ni

The present results show that Ni concentrations in snail tissues decreased dramatically in the 2 first weeks, then remained very low. It should be underlined that Ni concentrations in snails exposed to the naturally Ni-rich unpolluted soil decreased less than snails exposed to the polluted soil. The initial high Ni concentration in snail tissues (9 $\mu g.g^{-1}$) may be related to an unusual high Ni concentration of the food used for the snail rearing before the experiment (the usual Ni concentration of this food being 0.1 $\mu g.g^{-1}$). Lettuce grown on the unpolluted but naturally Ni-rich soil had Ni concentrations ranging from 6.0 to 12.5, showing that (1) Ni was phytoavailable and (2) that lettuce does not seem to regulate Ni. Despite these high concentrations in lettuce, the concentrations in snail tissues remained under 2 $\mu g.g^{-1}$. This suggests that Ni is efficiently regulated by snails.

Transfer of Pb

Concentrations of Pb in lettuce grown on the polluted soil remained low until the last sampling date, showing, as for Cd, a high increase of Pb uptake during blooming. Pb

concentrations in snails exposed to the polluted systems showed a rapid increase tend to be stable in the rest of the experiment. The fast increase of Pb concentration in the beginning of the exposure has also been observed in a kinetic study of Beeby and Richmond (1988, Table 6). The subsequent stability of the Pb concentrations observed in the present study, however, was not found, neither by Beeby and Richmond (1988) nor by Dallinger *et al.* (1984). The comparison between C- and M-snails showed, in both polluted and unpolluted systems and for every exposure duration, that the contribution of soil was largely predominant in the total Pb bioaccumulation in snail tissues and ranged from 81 to 89%. The capacity of snails to accumulate Pb from soil – at least by digestive route – to relatively high concentrations was shown by the experiment of Gomot-de Vaufleury and Pihan (2002), in which contaminated soil was mixed in the snail food. However, the so large contribution of soil in the Pb bioaccumulation in snail tissues constitutes a rather unexpected result and this original data should be taken into account to improve the risk assessment of Pb for terrestrial gastropods.

Effect of the polluted environment on H. aspersa growth

Despite a high transfer of several MTE from soil and/or plant to the snails, no discernable effect on snail growth was observed. This lack of effect on growth at the studied concentrations is in agreement with previous studies, which showed the remarkable tolerance of most terrestrial gastropod species to MTE intoxication. Indeed, the $EC_{20\ consumption}$ reported for Cd, Cu, Pb and Zn in juvenile 8-month old *H. aspersa* snails were 120; 533; 6,140 and 1,740 $\mu g.g^{-1}$, respectively, in a 3-month exposure experiment (Laskowski and Hopkin 1996b). For the same species, the $EC_{50\ growth}$ values for Cd, Cu and Zn were 140; 1,200 and 5,500 $\mu g.g^{-1}$, respectively, in 1-month experiments (Gomot 1997; Gomot-de Vaufleury 2000). However, it should be underlined that the toxicity of MTE may be dramatically decreased in laboratory experiments compared to what can happens in field conditions. Indeed, laboratory experiments usually do not take into account neither the actual environmental stochasticity nor any important factors like predation or inter-specific competition. The difficulty of extrapolating laboratory data to field conditions was recently stressed by Spurgeon *et al.* (1994).

Importance of MTE in snail tissues in the possible food chain transfer and secondary poisoning

Among the five MTE studied in this work, Zn and Cd are probably the most worrying for potential food chain transfers and secondary poisoning. Indeed, Cd and Zn are subject of concern since both are extremely mobile (Alloway 1995) thus generally highly bioavailable. Both elements may be accumulated to high concentrations in the tissues of several prey species like earthworms (Andersen 1979; Beyer and Cromartie 1985; Morgan and Morgan

1999; Spurgeon and Hopkin 1999) or snails (this study, Berger and Dallinger 1993, references in Tables 5, 6 and 7). Taking into account the Cd contents in tissues of snails exposed to the polluted microcosms for 4 and 8 weeks, we calculated the number of snails, which should be consumed to reach the human daily threshold toxicity value for Cd (1 µg ingested per kg of body mass per day, World Health Organization (1972)). For a man weighing 70 kg, the toxicity value would be reached for a daily consumption of 5.0 snails exposed 4 weeks and only 2.7 snails exposed 8 weeks. Therefore, consumption of snails inhabiting the polluted site from which comes the soil used in this experiment may represent a risk for human health. For animals, however, the Cd concentrations found in tissues of snails exposed to the polluted systems are lower than concentrations found to have a deleterious effect on predatory carabid beetles (Kramarz 2000; Scheifler *et al.* 2002a). However, both of these studies were done in laboratory conditions, which are, as underlined before, much more favourable to the studied organisms than actual field ones. Therefore, field studies should be undertaken to check whether such high Cd concentrations in snail tissues may have deleterious effects on predators, at individual and population level.

Although less toxic, Zn is probably of more environmental concern than Cd due to the much higher quantities released in the environment. The concentrations of Zn in snails were much higher than those of Cd and ranged from 600 to up to 800 $\mu g.g^{-1}$. Detrimental effects on age of first reproduction and fertility were observed in *P. cupreus* from 400 $\mu g.g^{-1}$ of Zn in their diet (Kramarz 2000). Therefore, snails inhabiting highly contaminated areas may represent a risk of secondary poisoning for predatory invertebrates.

Even though it is accumulated to a relatively high concentration in snail tissues, Pb is thought to be non-toxic in his metallic form to many invertebrates (Hopkin 1989). For vertebrates, Cooke *et al.* (1992), in an article dealing with the possible secondary poisoning of predators consuming contaminated earthworms, indicated that toxicity on predators is known only for organolead compounds (in water birds especially). In the present study, Ni and Cu did not show any increase of concentration compared to control, therefore should not raise the problem of secondary poisoning.

Conclusion

The present study allowed the assessment of MTE transfer from soil and/or plant to the snail *H. aspersa* and gave original data about the relative contribution of both sources in the total MTE bioaccumulation in snail tissues. This study paves the road for further researches on the relative importance of the different sources of exposure in terrestrial invertebrates. Such data would be of interest to improve the risk assessment procedures for MTE polluted sites. The microcosm design used in this work is a simple, cheap and efficient design, which could constitute a tool to study the transfer of MTE in a three-link food chain. Indeed, the

microcosms offer realistic exposure conditions to the snails, contrarily to most of the previous experiments in which the rearing design and/or the food were artificial. Moreover, the polluted soil used in this study was sampled in the field and is contaminated by a mixture of MTE, which is very often the case in field polluted areas. The satisfactorily repeatability of both snail growth and MTE bioaccumulation among replicate microcosms is a convincing argument for the possible standardisation of this design to evaluate the transfer and effects of MTE in food chain.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge L. Gomot and M. Cœurdassier for scientific discussions and D. Rieffel for his technical help. Special thanks are due to J.-C. Lambert for his technical help to make the microcosms. This work was supported by ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Paris 75737, project no. 963019) and by the Conseil Régional de Franche-Comté. The polluted soil was kindly provided by Dr E. Vernus (INSAVALOR, Polden division, Lyon, 69, France) and Dr C. Schwartz (ENSAIA/INRA, Vandœuvre-lès-Nancy, 54, France), and was used in the "Polluted soil treatment trials" program from the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME). The unpolluted soil was kindly provided by Drs M.-J. Jourdain and A. Bispo (IRH Environnement, Vandœuvre-lès-Nancy, 54, France) and was used in the "Ecotoxicity of soils and wastes" ADEME program.

References

Alloway, B. J., Ed. (1995) Heavy metals in soils, pp 368. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.

Andersen, C. (1979). Cadmium, lead and calcium content, number and biomass, in earthworms (Lumbricidae) from sewage sludge treated soil. *Pedobiologia* **19**, 309-319.

Baker, G. H., Barrett, V. J., Carter, P. J., and Woods, J. P. (1996). Method for caging earthworms for use in field experiments. *Soil Biol. Biochem.* **28**, 331-339.

Beeby, A. (1985). The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfer of lead trough a polluted ecosystem. *J. Appl. Ecol.* **22**, 267-275.

Beeby, A., and Eaves, S. L. (1983). Short-term changes in Ca, Pb, Zn and Cd concentrations of the garden snail *Helix aspersa* Müller from a central London car park. *Environ. Pollut.* **30**, 233-244.

Beeby, A., and Richmond, L. (1988). Calcium metabolism in two populations of the snail *Helix aspersa* on a high lead diet. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **17**, 507-511.

Beeby, A., and Richmond, L. (1998). Variation in the mineral composition of eggs of snail, *Helix aspersa* between population exposed to different levels of metals contamination. *Environ. Pollut.* **101**, 25-31.

Berger, B., and Dallinger, R. (1993). Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environ. Monit. Assess.* **25**, 65-84.

Beyer, W. N., and Cromartie, J. (1985). A survey of Pb, Zn, Cd, Cr, As and Se in earthworms and soil from diverse sites. *Environ. Monitor. Assess.* **8**, 27-36.

Bruce, L., McCraken, D., Foster, G., and Aitken, M. (1999). The effects of sewage sludge on grassland euedaphic and hemiedaphic collembolan populations. *Pedobiologia* **43**, 209-220.

Chevalier, L., Desbuquois, C., Le Lannic, J., and Charrier, M. (2001). Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata). *C.R. Acad. Sc. Paris* **324**, 979-887.

Coeurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A., and Badot, P.-M. (2002). Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails ? *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **In Press**.

Cooke, A. S., Greig-Smith, P. W., and Jones, S. A. (1992). Consequence for vertebrate wildlife of toxic residues in earthworms prey. In *Ecotoxicology of earthworms* (P. W. Greig-Smith, H. Becker, P. J. Edwards, and F. Heimbach, Eds), pp. 139-155. Intercept, Andover.

Coughtrey, P. J., and Martin, M. H. (1976). The distribution of Pb, Zn, Cd, and Cu within the pulmonate mollusc *Helix aspersa* Müller. *Oecologia* **23**, 315-322.

Coughtrey, P. J., and Martin, M. H. (1977). The uptake of Lead, Zinc, Cadmium, Copper by pulmonate mollusc, *Helix aspersa* Müller, and its relevance to the monitoring of heavy metal contamination of environment. *Oecologia* **27**, 65-74.

Dallinger, R. (1993). Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In *Ecotoxicology of metals in invertebrates* (R. Dallinger, and R. Rainbow, Eds), pp. 245-289. Lewis, Boca Raton.

Edwards, C. A., Subler, S., Chen, S. K., and Bogomolov, D. M. (1996). Essential criteria for selecting bioindicator species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems. In *Bioindicator Systems for Soil Pollution* (N. M. Van Straalen, and D. A. Krivolutsky, Eds), pp. 67-84. Kluwer Academic Publishers.

Gnamus, A., Byrne, A. R., and Horvat, M. (2000). Mercury in the soil-plant-deer-predator food chain of a temperate forest in Slovenia. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 3337-3345.

Gomot, A. (1994). *Contribution à l'étude de la croissance d'escargots du genre Helix : Influence de facteurs de l'environnement, nutrition et composition biochimique, contrôle neuro-endocrine. Thèse n°398, Université de Franche-Comté.*

Gomot, A. (1997). Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**, 209-216.

Gomot-de Vaufleury, A. (2000). Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **46**, 41-50.

Gomot-de Vaufleury, A., and Bispo, A. (2000). Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snail. 1. Sublethal effects on growth. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 1865-1870.

Gomot-de Vaufleury, A., and Pihan, F. (2000). Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere* **40**, 275-284.

Gomot-de Vaufleury, A., and Pihan, F. (2002). Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: metal bioavailability and bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 820-827.

Gorree, M., Tamis, W. L. M., Traas, T. P., and Elbers, M. A. (1995). BIOMAG: a model for biomagnification in terrestrial food chains. The case of cadmium in the Kempen, The Netherlands. *Sci. Total Environ.* **168**, 215-223.

Hendricks, A. J., Ma, W.-C., Brouns, J. J., de Ruiter-Dijkman, E. M., and Gast, R. (1995). Modelling and monitoring organochlorine and heavy metals accumulation in soils, earthworms, and shrews in Rhine-Delta Floodplains. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **29**, 115-127.

Hopkin, S. P. (1989). *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier Applied Science, New York, NY.

IFEN (2001). Les données de l'environnement : sol - agriculture. *Institut Français de l'Environnement* **63**, 1-4.

Iglesias, J., and Castillejo, J. (1999). Field observations on feeding of the land snail *Helix aspersa* Müller. *J. Moll. Stud.* **65**, 411-423.

Jongbloed, R. H., Traas, T. P., and Luttik, R. (1996). A probabilistic model for deriving soil quality criteria based on secondary poisoning of top predators. II. calculations of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and cadmium. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **34**.

Kabata-Pendias, A., and Pendias, H. (1992). *Trace elements in soils and plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Kramarz, P. (2000). Cadmium and zinc accumulation and its demographic effects in invertebrates. In *Demography in ecotoxicology* (J. E. Kammenga, and R. Laskowski, Eds), pp. 73-90. J. Wiley & Sons, Chichester.

Laskowski, R., and Hopkin, S. P. (1996a). Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail *Helix aspersa*: implications for predators. *Environ. Pollut.* **91**, 289-297.

Laskowski, R., and Hopkin, S. P. (1996b). Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **34**, 59-69.

Laurinolli, M., and Bendell-Young, L. I. (1996). Copper, zinc and cadmium concentrations in *Peromyscus maniculatus* sampled near an abandoned copper mine. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **30**, 481-486.

Marigomez, J. A., Angulo, E., and Moya, J. (1986). Copper treatment of the digestive gland of the slug *Arion ater.* 1. Bioassay conduction and histochemical analysis. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **36**, 600-607.

Martin, M. H., and Coughtrey, P. J. (1982). *Biological monitoring of heavy metal pollution. Land and air.* Applied Science Publishers, London, UK.

McGrath, S. P., Knight, B., Killham, K., Preston, S., and Paton, G. I. (1999). Assessment of the toxicity of metals in soils amended with sewage sludge using a chemical speciation technique and a lux-based biosensor. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 659-663.

Menta, C., and Parisi, V. (2001). Metal concentrations in *Helix pomatia*, *Helix aspersa* and *Arion rufus*: a comparative study. *Environ. Pollut.* **115**, 205-208.

Morgan, J. E., and Morgan, A. J. (1999). The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): implications for ecotoxicological testing. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 9-20.

Müller, M., and Anke, M. (1994). Distribution of cadmium in the food chain (soil-plant-human) of a cadmium exposed area and the health risks of the general population. *Sci. Total Environ.* **156**, 151-158.

Muskett, C. J., and Jones, M. P. (1980). The dispersal of lead, cadmium and nickel from motor vehicles and effects on roadside invertebrate macrofauna. *Environ. Pollut.* **23**, 231-242.

Newman, M. C., Mulvey, M., Beeby, A., Hurst, R. W., and Richmond, L. (1994). Snail (*Helix aspersa*) exposure history and possible adaptation to lead as reflected in shell composition. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **27**, 346-351.

Parmelee, R. W., Philips, C. T., Checkai, R. T., and Bohlen, P. J. (1997). Determining the effects of pollutants on soil faunal communities and trophic structure using a refined microcosm system. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1212-1217.

Peake, J. (1978). Distribution and ecology of stylommatophora. In *Pulmonates. Systematics, Evolution and Ecology* (V. Fretter, and J. Peake, Eds), pp. 429-526. Academic Press, London.

Pihan, F., and Gomot-deVaufleury, A. (2000). The snail as a target organism for the evaluation of industrial waste dump contamination and the efficiency of its remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **46**, 137-147.

Russell, L. K., DeHaven, J. I., and Botts, R. P. (1981). Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bull. Environm. Contam. Toxicol.* **26**, 634-640.

Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A., Toussaint, M.-L., and Badot, P.-M. (2002a). Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carbid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* **In Press**.

Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A., and Badot, P.-M. (2002b). Transfer of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: bioaccumulation and effects. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **In press**.

Schwartz, C., Fetzer, K. D., Kubiniok, J., and Morel, J.-L. (2000) Availability of pollutants in garden soils. In First International Conference on Soils of Urban, industrial, Traffic and Mining Areas (SUITMA) (eds W. Burghardt, and C. Dornauf), Essen.

Simkiss, K., and Watkins, B. (1991). Differences in zinc uptake between snails (*Helix aspersa* (Müller)) from metal- and bacteria-polluted sites. *Funct. Ecol.* **5**, 787-794.

Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. (1997). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.* WH Freeman an Compagny, New York.

Speiser, B. (2001). Food and Feeding Behaviour. In *The Biology of Terrestrial Molluscs* EdG. M. Barker, Eds), pp. 259-288. CABI Publishing, Oxon, UK.

Spurgeon, D. J., and Hopkin, S. P. (1999). Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Appl. Soil Ecol.* **11**, 227-243.

Spurgeon, D. J., Hopkin, S. P., and Jones, D. T. (1994). Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* **84**, 123-130.

Svendsen, C., and Weeks, J. M. (1997a). Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure. II. Validation and applicability under field conditions in a mesocosm experiment with *Lumbricus rubellus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **36**, 80-88.

Svendsen, C., and Weeks, J. M. (1997b). A simple and low-cost field mesocosm for ecotoxicological studies on earthworms. *Comp. Biochem. Physiol.* **117C**, 31-40.

Traas, T. P., Luttik, R., and Jongbloed, R. H. (1996). A Probabilistic model for deriving soil quality criteria based on secondary poisoning of top predators. I. Model description and uncertainty analysis. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **34**, 264-278.

Van Gestel, C. A. M., and Hensbergen, P. (1997). Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1177-1186.

Wade, K. J., Flanagan, J. T., Currie, A., and Curtis, D. J. (1980). Roadside gradients of Lead and Zinc concentrations in surface-dwelling invertebrates. *Environ. Pollut.* **1**, 87-93.

Weltje, L. (1998). Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soil: a critical evaluation of data. *Chemosphere* **36**, 2643-2660.

World Health Organization (1972). Evaluation of certain food additives and contaminants mercury, lead and cadmium. *16th report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives, Geneva, April 4-12, WHO Technical Report Series, 505.*

Table 5. Literature data: MTE bioaccumulation (µg.g^{-1} dry mass) data in *H. aspersa* snails (whole body) sampled in the field (passive biomonitoring) and contamination (µg.g^{-1} dry mass) of their environment.

Description of the site		MTE concentrations (mean ± S.D.) in snail tissues				Concentration in soil /food	References
		Cd	Cu	Pb	Zn	Main remarks	
Vicinity of the Avonmouth smelting work	Site 1 (far)	6.0 ± 0.6	46.1 ± 4.0	18.8 ± 8.0	94.7	ND[a] Sampled in September	(Coughtrey and Martin 1976)
	Site 2 (intermediate)	24.1 ± 4.1	32.7 ± 7.8	27.5 ± 4.4	166.5 ± 9.0		
	Site 3 (close)	64.7 ± 7.6	67.9 ± 10.0	28.6 ± 3.4	412.7 ± 46.4		
Vicinity of the Avonmouth smelting work	Site 1 (far)	11.0 ± 5.6	30.4 ± 14.7	24.7 ± 13.9	155.9 ± 55.1	ND	(Coughtrey and Martin 1977)
	Site 2 (close)	52.5 ± 19.2	86.7 ± 24.9	39.0 ± 20.6	403.5 ± 150.6		
Sampling in a car-park of London (UK) NB: concentrations are given for the similar age-class as that of the snails used in the present study		18.0 ± 4.8	ND	358.1 ± 49.7	2,300 ± 171.4	Mean Cd : Pb : Zn concentrations in Dandelion leaves: 6.0 : 85.8 : 651.4 Decline of Pb and Zn with age-class, no effect on Cd	(Beeby and Eaves 1983)
Vicinity of the Avonmouth smelting work and an unpolluted site (UK)	Unpolluted site	4.88 ± 0.62	104 ± 28	5.79 ± 1.06	103 ± 14	ND	(Hopkin 1989)
	1 km from Avonmouth	49.6 ± 10.7	228 ± 43	121 ± 24	418 ± 71		
Snails sampled in a rural non polluted site and near the Avonmouth smelting work	Non-polluted site	9.0 ± 2.2	193.2 ± 49.6	ND	175.8 ± 17.0	ND Sampled in May and July	(Simkiss and Watkins 1991)
	Polluted site	92.2 ± 7.9	396.6 ± 61.0	ND	924.3 ± 112.4	No significant effect of season	
Sampling in 33 sites in a large area of Great-Britain NB: median value		ND	ND	Under detection limits to 411.8	ND	Snails exposed from millennia to high Pb concentrations in their environment a higher shell:soft tissues Pb ratio	(Newman *et al.* 1994)
Rural unpolluted site (Italy)		6.5	43.7	9.4	198.9	ND	(Menta and Parisi 2001)

[a]ND: no data

Table 6. Literature data: MTE bioaccumulation (µg.g^{-1} dry mass) data in *H. aspersa* snails (whole body) exposed in laboratory conditions to contaminated substrate and/or food.

Description of the experiment	MTE concentrations (mean ± S.D.) in snail tissues	Concentration in food or soil	References
Subadult (about 4-month old) snails exposed to rodent food contaminated by $CdCl_2$	Cd < 0.5 / 8.4 / 33.3 / 38.9 / ND / 137.0 / 98.0	Cd concentration in food: 0 / 10 / 25 / 50 / 100 / 300 / 1000	(Russell *et al.* 1981)
Juveniles (1- or 2-year old) sampled in a polluted car-park, fed agar gels containing $PbSO_4$ at different concentrations	Pb 131.1 ± 26.2 151.0 ± 38.4 265.8 ± 59.6 331.8 ± 73.1 136.9 ±23.9 (field)	Pb concentration in the diet: 5.2 9.0 33.4 174.5 47.2 (field)	(Beeby 1985)
Snails collected in the field from a non-polluted site (N-P S) and from a polluted car-park in London (CP S), and fed agar-based food contaminated with $PbSO_4$. Kinetic study.	Pb N-PS / CP S 170 ± 24 / 216 ± 16 380 ± 144 / 434 ± 54 924 ± 312 / 386 ± 69 1,040 ± 283 / 676 ± 46 1,095 ± 152 / 705 ± 60 1498 ± 180 / 984 4.2 ± 1.1 / 47.4 ± 5.3 (field)	Pb: 500 µg.g^{-1}, exposure duration (days): 2 4 8 16 32 64 -	(Beeby and Richmond 1988)
Adult snails exposed for 3 months to a combination of 4 MTE at different concentrations in their food (based on agar powder)	Cd / Cu / Pb / Zn 7.3 ± 2.9 / 101 ± 35 / 22 ± 3 / 131 ± 20 6.1 ± 0.7 / 98 ± 17 / 21 ± 5 / 137 ± 34 6.1 ± 1.7 / 136 ± 35 / 167 ± 213 / 246 ± 98 21.3 ± 7.9 / 300 ± 53 / 251 ± 25 / 645 ± 183 18.6 ± 8.3 / 308 ± 58 / 361 ± 135 / 699 ± 221 9.8 ± 6.5 / 203 ± 65 / 156 ± 105 / 452 ± 183	Cd : Cu : Pb : Zn Control 0.2 : 15 : 0.4 : 39 MIX1 0.4 : 9 : 16 : 43 MIX2 1.2 : 24 : 99 :136 MIX3 5.4 : 67 : 474 : 446 MIX4 25.8 : 294 : 2275 : 2,070 MIX5 132.0 : 1320 : 12,700 : 10,900	(Laskowski and Hopkin 1996a)
Juveniles (1 month-old) snails exposed for four weeks (1) by digestive route to food mixed with different % of contaminated (S1)or non-contaminated soils (S0) and (2) by dermal route to leachate of S1 and S0	Cd / Pb / Zn 1.51 / 0.41 / 161.99 3.20 / 1.50 / 245.95 3.86 / 1.93 / 251.12 54.69 / 17.52 / 1,158.56 101.52 / 38.21 / 3,001.22 77.91 / 117.20 / 3,823.43 0.58 / 0.31 / 160.51 1.68 / 1.01 / 376.76	Food - Cd:Pb:Zn Control – 0.16: 0.94 : 137 S050% - 0.26 : 25.2 : 134 S075% - 0.32 : 37.6 : 132.5 S085% - 0.34 : 42.9 : 131.9 S150% - 5.08 : 420.5 : 1,123 S175% - 7.58 : 620.2 : 1,615 S185% - 8.58 : 714.1 : 1,813 Leachate S0 <0.01 : <0.01 : 0.01 Leachate S1 0.31 : 0.02 : 46.7	(Gomot-de Vaufleury and Pihan 2002)
Snails exposed to increasingly Cd-contaminated food for 1 and 2 weeks from hatching	Cd 1 week: 0.2 / 24.3 / 99.7 / 83.2 2 weeks: 0.1 / 38.1 / 174.6 / 282.3	Cd concentration Nominal: 0 / 10 / 50 / 100 Measured: 0.1 / 13.0 / 54.8 / 83.2	(Scheifler *et al.* 2002a)
Juvenile (1 month-old) snails exposed to rape leaves or vegetable flour increasingly contaminated by Cd	Cd 0.7 ± 0.0 / 155.0 ± 38.5 / 360.0 ± 70.5 / 434.8 ± 75.1 1.9 ± 0.4 / 198.1 ± 20.4 / 292.0 ± 88.8 / 443.2 ± 38.4	Cd concentration Rape leaves: 0.1 / 38.4 / 93.1 / 177.2 Vegetable flour: 0 / 50 / 100 / 200	(Scheifler *et al.* 2002b)
Juvenile (1 month-old) snails exposed for 4 weeks to contaminated OECD substrate by both dermal and digestive route or by digestive route only	Cd 1st week / 2nd week / 3rd week / 4th week 35.3 / 233.1 / 425.7 / 54.4 / 301.1 / 455.4 / 55.3 / 262.2 / 465.3 / 54.4 / 276.8 / 356.4 20.7 / 108.7 / 154.7 / 33.9 / 132.4 / 174.0 / 35.8 / 99.3 / 212.7 / 24.6 / 141.8 / 212.7	Cd Both routes 90.6 / 485.6 / 989.9 Digestive route only 94.3 / 472.7 / 966.7	(Coeurdassier *et al.* 2002)

Table 7. Literature data: MTE bioaccumulation (µg.g^{-1}) data in *H. aspersa* snails coming from laboratory rearing and exposed in the field (active biomonitoring).

Description of the site / experiment	MTE concentrations (mean ± S.D.) in snail tissues					Treatment	References
Juvenile (2-month old) *H. aspersa* snails were exposed for 1 month in microcosms placed in differently polluted areas: rural site and industrial waste dump (IWD)	Whole body concentrations						(Gomot-de Vaufleury and Pihan 2000)
	Cd	Cu	Pb	Zn			
	0.26	131.9	7.6	186.6		Rural site	
	0.30	198.3	43.5	283.6		Urban site	
	0.13	125.7	34.7	298.3		IWD site 1	
	0.26	145.6	40.4	382.8		IWD site 2	
	1.03	228.7	5.3	703.3		Autochthonous sampled in IWD site 2	
Juvenile (2-month old) *H.aspersa* snails were exposed for 1 month in microcosms placed in an industrial waste dumps after remediation	Viscera concentrations						(Pihan and Gomot-deVaufleury 2000)
	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn		
	2.8	131	2.9	0.6	344	Laboratory rearing	
	6.1	72	2.9	5.8	126	Autochthonous	
	21.6	206	3.8	32.4	280	Exposed 1,5 year after remediation	
	2.3	520	1.3	11.5	693	Exposed 2.5 years after remediation	

Section V.

Biodisponibilité, transfert et dégradation de l'isoproturon (herbicide phénylurée) marquée au ^{14}C dans une chaîne alimentaire "sol – plante – invertébré"

Cet article est en préparation. Les auteurs sont Renaud Scheifler, Reiner Schroll, Sabine Kühn, Jürgen Ruoss, Annette de Vaufleury, Pierre-Marie Badot et Jean-Charles Munch.

Résumé

La biodisponibilité, le transfert et la dégradation de l'isoproturon marquée au ^{14}C (herbicide phénylurée), sont étudiés en microcosme dans une chaîne alimentaire constituée de trois compartiments : sol – plante (*Zea mays*) – escargot (*Helix aspersa*). Trois modalités expérimentales sont mises en œuvre : l'isoproturon est appliquée à la surface (1) du sol, (2) du sol et de la plante et (3) de la plante. Les escargots, introduits dans les microcosmes juste après l'application de l'isoproturon marquée, sont exposés pendant 4 semaines. A la fin de l'expérience, le 1er cm du sol, les plantes et les escargots sont prélevés et l'activité totale en ^{14}C est mesurée. L'isoproturon et ses métabolites sont identifiés par HPLC. Les résidus non-extractibles représentent 40% de l'activité totale dans les échantillons de sol. Les résidus extractibles sont constitués de 70% d'isoproturon native, de 11% de monodéméthyl-isoproturon et de métabolites identifiés ou non en plus faibles proportions. L'activité en ^{14}C qui subsiste dans les plantes après les 4 semaines est très faible. Les analyses HPLC suggèrent que les résidus extractibles dans les échantillons de plante sont constitués de 20 à 45% d'isoproturon native et de métabolites non identifiés. L'activité en ^{14}C dans les escargot exposés au sol et à la pante contaminés est la plus forte. Elle est proche de celle mesurée dans les escargots exposés au sol contaminé et est 8 fois supérieure à celle mesurée dans les escargots exposés à la plante contaminée. La nature et/ou la proportion des résidus extractibles dans les échantillons d'escargots varient en fonction de la modalité d'exposition mais également entre réplicas d'une même modalité; mais sont principalement constitués par des métabolites non identifiés. Les microcosmes utilisés dans cette expérience ont permis de démontrer le transfert de l'isoproturon dans cette chaîne alimentaire à trois compartiments et devrait permettre d'étudier le transfert d'autres polluants organiques.

Bioavailability, transfer and degradation of ^{14}C-labelled isoproturon (phenylurea herbicide) in a soil – plant – invertebrate food web

Abstract

Bioavailability, transfer and degradation of ^{14}C-labelled isoproturon, a phenylurea herbicide, were studied in microcosms in a three-link food web "soil – plant (*Zea mays*) – snail (*Helix aspersa*)". Three experimental modalities were used: isoproturon was applied (1) on soil surface, (2) on soil and plant surfaces or (3) on plant surface only. Snails were introduced in the microcosms just after application and exposed for 4 weeks. At the end of the experiment, first cm soil layer, plants and snails were sampled and analysed for total ^{14}C activity. Isoproturon and its metabolites were identified by HPLC. Non-extractable residues in soil represented 40% of the total activity. Extractable residues were 70% native isoproturon, 11% monodemethyl-isoproturon and other identified and non-identified residues in smaller proportions. The ^{14}C activity that remained in plant tissues after the 4 weeks of experiment was very low. HPLC analyses suggest that extractable residues in plant were constituted by 20 to 45% of isoproturon and non-identified residues. ^{14}C activity in snails exposed to plant and soil contaminated was the highest, close to that measured in snails exposed to soil contaminated only and 8 times higher than that measured in snails exposed to plant contaminated only. The nature and/or the proportion of the extractable residues in snails varied among and within the experimental modalities but they were mainly constituted by non-identified metabolites. This original experimental design allowed demonstrating the transfer of isoproturon in this three-link food chain and paves the road for further studies on organic pollutant transfer.

Introduction

Herbicides are widely used as an integral component of agricultural practices. Nowadays, they represent even the most widely used pesticide in agriculture worldwide both in terms of the volumes used and the areas treated (Conacher and Conacher 1986; Freemark and Boutin 1995). There are several concerns relating to the impacts of their use as contamination of soils, surface and ground waters, effects on non-target organisms and transfer in food chains and the potential subsequent impact on human health (contamination of food and/or drinking water).

The evaluation of the bioavailability of herbicides applied to soil and plants and their transfer from these compartments to next links of terrestrial food chains is therefore an

important purpose in ecotoxicological studies. Most of studies dedicated to the bioavailability and the transfer of herbicides from soil and/or plant to non-target organisms concerned soil micro-organisms and earthworms (Meharg 1996, Gevao *et al.* 2001). Among soil organisms, however, earthworms do not constitute the only component that may be endangered by exposure to herbicides and that may represent a risk of transfer in food chain. Indeed, other organisms like terrestrial snails are also preys for many predators, invertebrates (carabid or staphylinid beetles) and vertebrates (birds like thrushes or mammals like hedgehog). Some terrestrial snail species are also eaten by human. As surface-dwelling detritivorous and herbivorous organisms, snails as biomonitors of pollution by herbicides present also the advantage, contrarily to earthworms, to reflect the contamination of soil and plant.

Therefore, the main aims of this study were to evaluate the bioavailability and the transfer of a widely used phenylurea herbicide, isoproturon, from soil and plant to the snail *Helix aspersa*. This herbicide was classified as nocuous for the environment (The Royal Society of Chemistry 1994) and exhibits mutagenicity (at least in plants, Badr and Elkington 1982) and potential hepatocarcinogenicity in mammals (Hoshiya *et al.* 1993). This snail species, which inhabits a broad range of ecosystems, was chosen because it belongs to human diet.

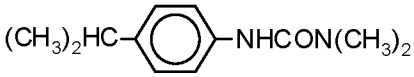
Even though it is well known that soil invertebrates, particularly surface dwelling and soft-bodied organisms like snails, are exposed to soil and plant contamination, very few studies are devoted to the transfer of organic compounds in invertebrate fauna and examined the different sources of exposure, which may be relevant in organism intoxication (plant and/or soil and relative contribution). Studies on earthworms considered only soil contamination (Gevao *et al.* 2001; Meharg 1996). Studies on herbivorous invertebrates like crickets considered soil (Paine *et al.* 1993) or plant exposure source (Deml and Dettner 2001) but we could find only one study that considered both sources in the same experiment (Sousa *et al.* 2000). Therefore, the secondary aim of this work was to evaluate the relative contribution of soil and plant contamination in the transfer of the herbicide to the snail.

Very few data exist on the metabolisation of herbicides in terrestrial invertebrates. One example is the study of Deml and Dettner (2001), in which the hypothetical metabolic pathways of 2,4-D in a caterpillar (*Eupackardia calleta*) was proposed. Such investigation is though of importance since, in some studies in which the organic compound was labelled with ^{14}C, it was not possible to know whether the radiocarbon activity detected in the organism tissues corresponded to $^{14}CO_2$ from complete parent compound degradation or a (still toxic ?) metabolite (Gevao *et al.* 2001). Metabolisation data would be of interest to check the potential toxicity of the radio-labelled compound for the studied organism itself but also for its predators, in a food web transfer point of view. Thus, the last objectives of this study were to determine the nature of the residues found in the snail tissues.

Materials and methods

Chemicals. ^{14}C-labelled isoproturon was purchased from IIM (International Isotopes Munich). Main physico-chemical properties of isoproturon are given in the Figure 1. The specific activity was 1.855 10^9 mCi.µg^{-1}. All solvents and other compounds used for the extractions and preparation of standards and samples were of pesticide grade. The scintillation and sample oxidizer cocktails were obtained from Canberra Packard.

Common name: ISOPROTURON



Chemical formula: $C_{12}H_{18}N_2O$

IUPAC name: 3-(4-isopropylphenyl)-1,1-dimethylurea

Solubility (g.m^{-3}): 65 (22°C)

Log Kow: 2.25

H (Pa m^3 mol): 1.24 x 10^{-5}

T_{50} (soil): 21 days

FIGURE 1. Names, structure and main physico-chemical properties of Isoproturon

Experimental organisms. Juvenile brown garden snails (*Helix aspersa aspersa* Müller) were obtained from our standardised laboratory rearing and descended from a strain collected in the region of Cavaillon (France). The individuals were aged 1 month and weighed 1.01 ±0.13 g (fresh mass). The potential effect of isoproturon (and/or radioactivity) on snail growth was assessed by weighing the snails at the beginning and at the end of the experiment.

Experimental designs. Thirteen stainless steel microcosms (15 cm diameter and 30 cm high) based on those developed and described by Schroll *et al.* (1994) were used (Figure 2). Each microcosm contained 4.5 Litres of homogeneous soil. In each microcosm, a maize seed (*Zea mays*) was planted. After 1 month of cultivation (May 2001), ^{14}C-labelled isoproturon was applied, depending on three modalities and with 4 replicate-microcosms for each modality. In modality 1, isoproturon was applied on the soil surface only; in modality 2, isoproturon was applied on both plant and soil surfaces and in modality 3, isoproturon was applied on plant surface only. No isoproturon was applied in the last microcosm, which was used as a control for growth assessment. With the modalities 1 and 3, snails will be exposed to soil or plant to study each exposure route separately although, in modality 2, snails were exposed in the more ecologically relevant situation, i.e. where both compartments of the

ecosystem are contaminated. This last modality will allow to check whether the 2 exposure routes are additive. ^{14}C-Isoproturon was homogeneously applied with a brush on the entire surface of all leaves of the maize plants and/or on all soil surface. In the following three hours after application, five snails were added to each microcosm. A lid made of a PVC structure and a glass fibre netting (mesh size: 1 mm) was securely fitted over the top of the microcosms to avoid escape of snails (Figure 2). Snails were then exposed for 4 weeks (June 2001) in the microcosms, which were placed in an outdoor but covered (thus protected against rain) place. Soil of each microcosm was carefully watered with 100 or 200 ml of deionised water each 2 or 3 days (depending on the whether) during the whole experiment (plant cultivation as well as snail exposure).

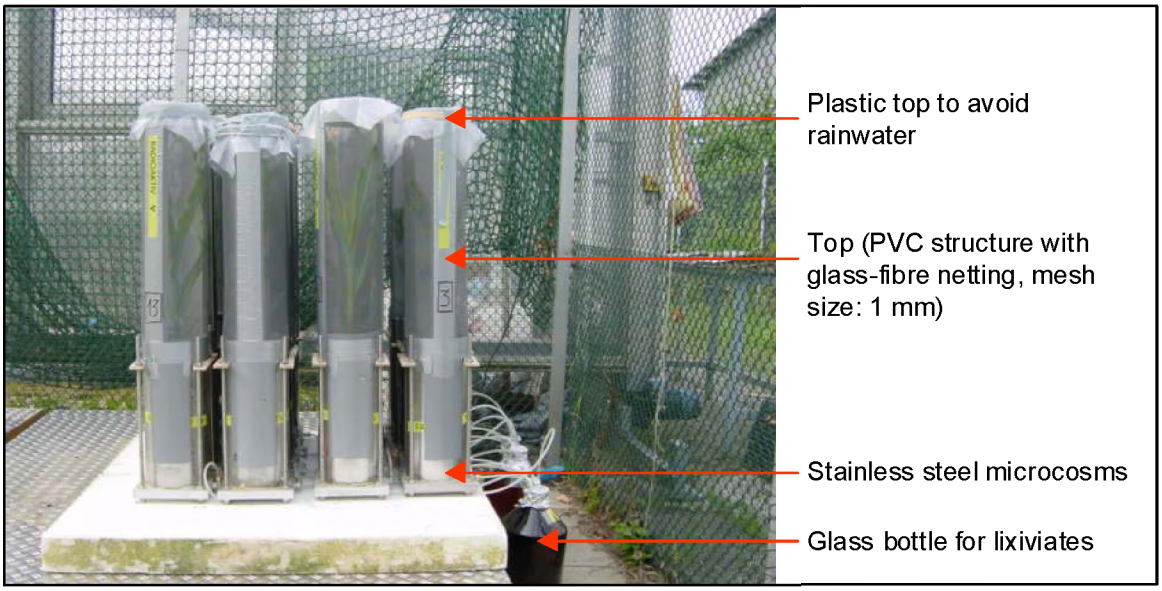


Figure 2. Microcosm design containing each one maize (*Zea mays)* plant and 5 (*Helix aspersa*) snails

Soil. Surface soil was collected from a farm close to München (Germany). The soil was air-dried, passed through a 2 mm sieved, and stored at 4°C for less than 14 days prior to the start of the experiments. Main physico-chemical properties of the soil are: pH: 6.2, organic carbon: 1.2%, clay: 10%, silt: 25% and sand: 65%.

Sample preparation. At the end of the 4-week experiment, soils were defrosted, prepared and analysed as shown on the Figure 3. After defrosting, plant samples were ground in a mortar with Na_2SO_4 and sea sand in a plant sample:Na_2SO_4:sand mass ratio of 1:4:2. The obtained powder was used for analysis as shown on the Figure 3. After defrosting, snails were removed from their shells and the bodies were separated into 2 parts: the viscera (i.e. digestive tract, digestive gland, kidney, heart, gonad and albumen gland) and the foot (i.e. the rest of the body corresponding to muscular sole, mantle edge, oesophagus, salivary glands, anterior part of the genital system and ovispermiduct). Since preliminary radioactivity (RA) counts showed that RA was extremely low in the foot compared to that measured in the

viscera, we only used viscera in further analysis. Moreover, to have enough RA for HPLC analysis, we pooled the viscera of the 5 snails of each microcosm. Pools of snail viscera were then prepared in the same way than plant samples (Figure 3).

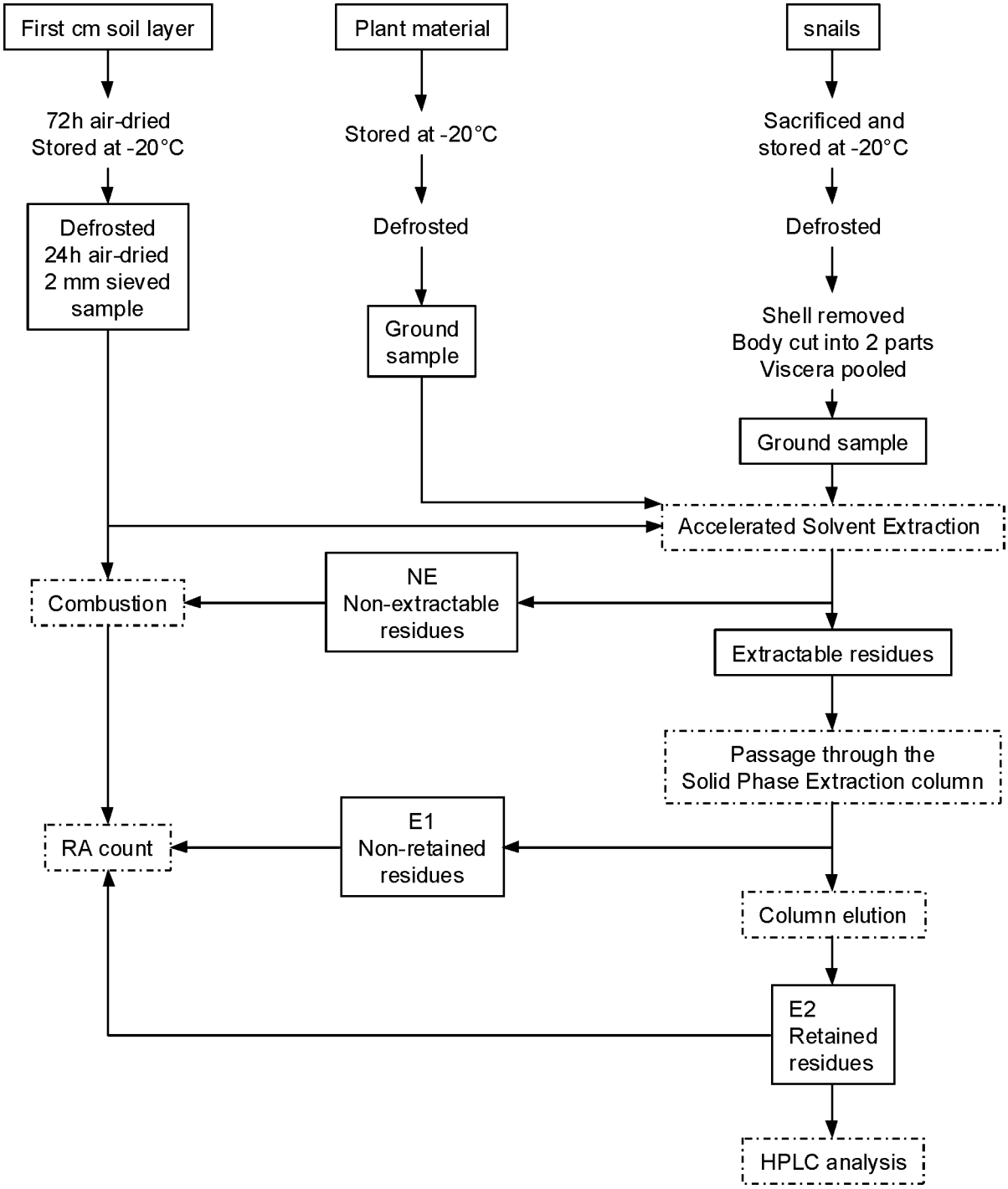


FIGURE 3. Schematic diagram of sample preparation and extractions and analysis performed.

Accelerated Solvent Extraction (ASE) and Solid Phase Extraction (SPE). Soil, plant and snails samples were extracted using the ASE technique (Dionex ASE 200, solvent: methanol, temperature: 90°C, pressure: 100 bars, 5 extraction cycles). Methanol was removed from ASE extracted samples using a rotavapor to a volume of about 1 ml, then the

samples were diluted with deionised water to a volume of 300 ml. After conditioning a 200 mg Bondelut C-18 cartridge (Varian, Harbor City, CA, USA) by loading sequentially 10 ml of methanol and 10 ml of deionised water, the 300 ml samples were passed through the cartridge. Cartridges were dried with a nitrogen stream and eluted with 10 ml of methanol. The volume of the eluted samples was reduced to about 0.1 ml with a rotavapor and a nitrogen stream. Sub-samples of around 30 µl were injected in HPLC analysis.

HPLC analysis. HPLC was performed with a liquid chromatograph with a UV (Merck Hitachi L-4250 UV-VIS detector) and a ^{14}C-detector (PHLC Radioactivity Monitor LB 506 C-1). The stationary phase was a LiChrosphere 100 column (RP-18[5µm]) which was run with a mobile phase of water/acetonitril (gradient program from 95% water and 5% acetonitril to 40% water and 60% acetonitril and backwards). The chromatographic run time was 35 minutes. The qualitative peak identification was done by comparing the retention times (Rt, in minutes) for the sample peaks with those for reference substances and the quantitative determination by radioactivity counting on the ^{14}C-detector. Retention times obtained in these conditions were 13.2 for 2-hydroxy-monodesmethyl-isoproturon, 19.0 for didesmethyl-isoproturon, 20.1 for monodesmethyl-isoproturon, 21.4 for isoproturon, 23.1 for 4-isopropylanilin.

Combustions. Soil and snail samples, after adequate preparation (Figure 3), were combusted with a Packard Oxidizer 306. $^{14}CO_2$ from the total combustion of the sample are automatically trapped in the alkaline solution “Carbosorb” and automatically mixed with the Scintillation cocktail Premablend (2:3, v:v).

Radioactivity counting. Radioactivity was counted with a Packard Scintillation counter Tri-Carb 1900 TR.

Statistical treatments. Differences in ^{14}C activity among treatments were assessed with non-parametric tests: the Mann-Whitney U test for 2 groups and the Kruskal-Wallis test for more than 2 groups (Sokal and Rohlf 1997). In the latter case, a multiple comparison test was used to find which group(s) differed from which other(s) (Sokal and Rohlf 1997). Chi-square test was used to assess the differences in the proportions of ^{14}C activities (non-extractable residues, extractable residues E1 and E2) in snail tissues from the different experimental modalities.

Results and Discussion

Effect of ^{14}C-labelled isoproturon on snails. No mortality occurred during the 4 weeks of the experiment whatever was the experimental modality. The application of ^{14}C-labelled isoproturon did not exert significant toxic effect on snail growth (on the considered exposure duration) since no differences were found in snail fresh mass, neither between control and exposed groups, nor among exposed groups (data not shown). Snail fresh mass decreased from 5 to 10% in all groups, suggesting that the conditions in microcosms were not optimal for growth. To our knowledge, toxicity of this herbicide was never studied in terrestrial molluscs. The absence of acute toxicity on growth is in agreement with however to a recent review on the impacts of agricultural herbicides on terrestrial wildlife, which shows that herbicides are usually not acutely toxic to soil organisms (except TCA and monuron at very high concentrations and some triazine herbicides)(Freemark and Boutin 1995).

Fate of isoproturon in soil. Soil samples were combusted before and after ASE extraction, which allowed calculating the respective proportion of bound residues (i.e. non-extractable, according to the definition used in Burauel and Führ (2000) and Gevao *et al.* (2000)) and extractable ^{14}C-labelled residues in the total soil ^{14}C activity after 4 weeks of experiment (Fig. 4). Since no statistical differences were found in ^{14}C activities between soils from modality 1 and 2, the values of the 8 soils were grouped in Fig. 4. The proportion of non-extractable residues was 40%, which is well within the values of 30 to 65% found by Pieuchot *et al.* (1996) and 55% found by Perrin-Ganier *et al.* (2001).

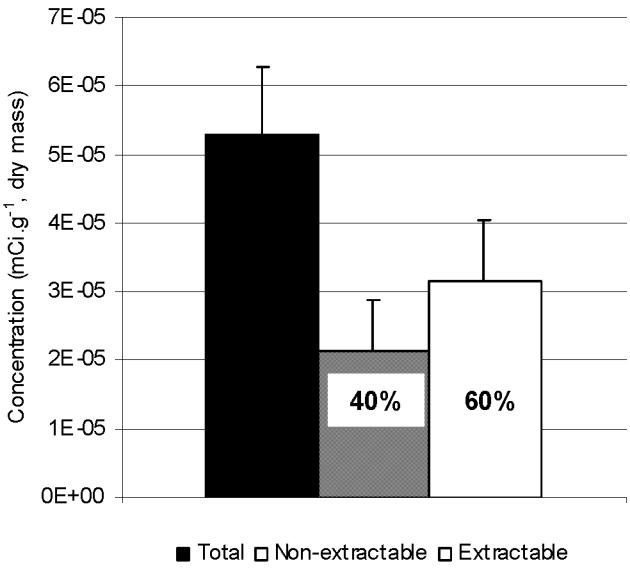


FIGURE 4. Total, extractable and non-extractable ^{14}C activity in soil samples from modalities 1 and 2. Bars represent standard deviation associated with means (n = 8).

No differences in chromatograms of soils from modality 1 or 2 were observed; therefore, data were pooled in Table 1 and following discussion is valid for soils from both modalities. Among soil ^{14}C-residues extracted after 4 weeks of experiment, native isoproturon remained the most abundant compound found, with around 70% of the total extractable ^{14}C-activity (Fig. 5. a., Table 1). The main metabolite was monodemethyl-isoproturon, which represented 11.3% of the extractable activity. Three other identified metabolites, monodemethyl hydroxyl-isoproturon, didemethyl-isoproturon and isopropyl-aniline, were detected but in much lower proportion, less than 1% for each of them (Fig. 5. a., Table 1). Five non-identified metabolites were found, for which retention times were 14.2, 15.3, 18.0, 24.7 and 27.2 min., respectively (Fig. 5. a., Table 1). Two of them could correspond to impurities detected at 14.5 and 24.6 min. in the commercial ^{14}C-labelled isoproturon used in this experiment (Table 2).

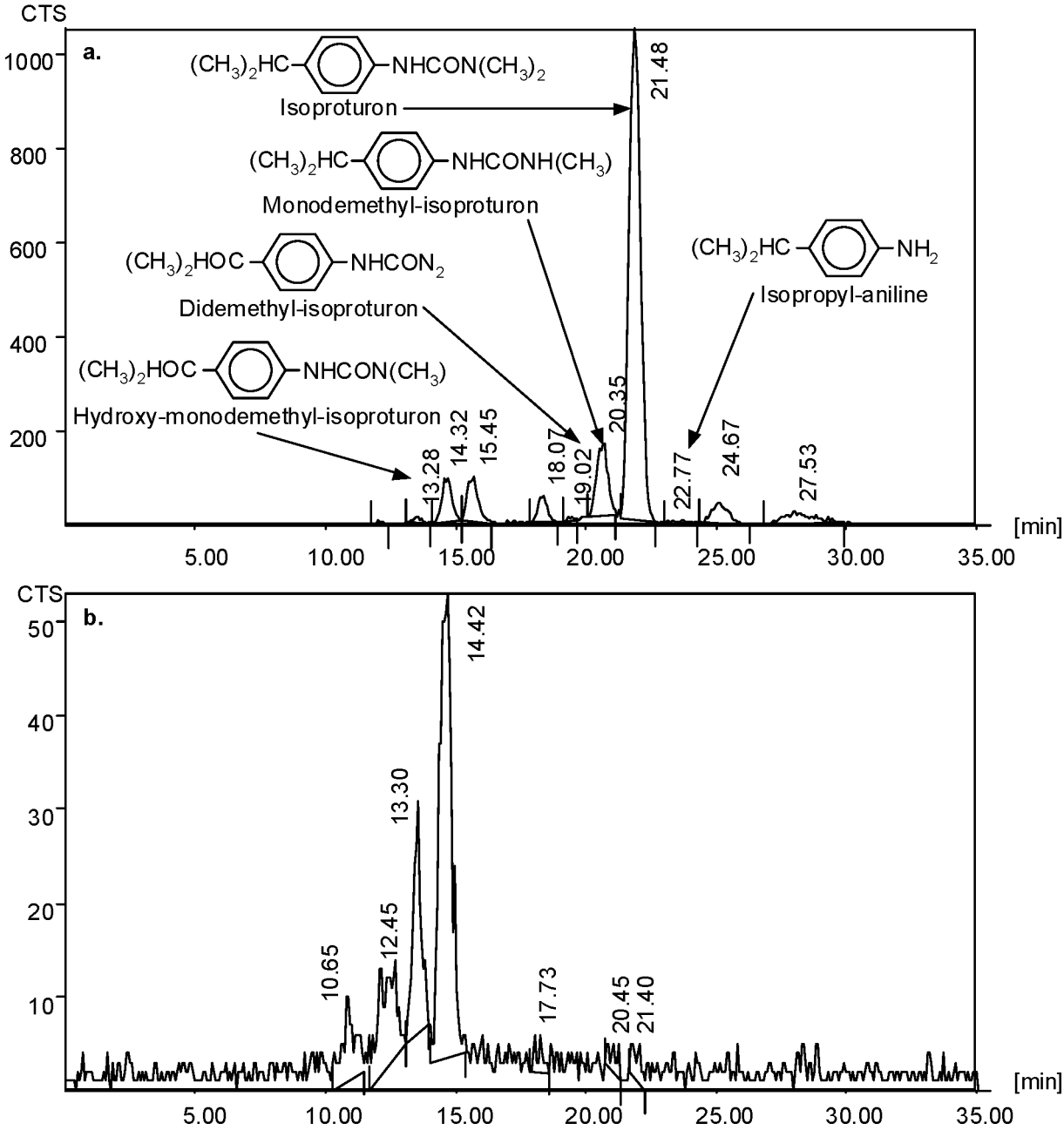


FIGURE 5. a. Radio-HPLC analysis of extractable residues of ^{14}C-labelled isoproturon in soil (from modality 2) after 4 weeks of experiment. **b.** Radio-HPLC analysis of extractable residues in snails (from modality 2) after 4 weeks of exposure.

TABLE 1. Proportion of isoproturon metabolites in soil samples, 4 weeks after ^{14}C-labelled isoproturon application.

Retention time (min.)	Identification	Mean ± standard deviation (%, *n* = 3)
13.2	Hydroxy-monodemethyl-isoproturon	0.5 ± 0.3
14.2	Non-identified	4.8 ± 2.5
15.3	Non-identified	5.6 ± 0.3
18.0	Non-identified	2.0 ± 0.9
19.0	Didemethyl-isoproturon	0.2 ± 0.3
20.1	Monodemethyl-isoproturon	11.3 ± 1.4
21.5	Isoproturon	68.4 ± 2.1
23.1	Isopropyl-aniline	0.3 ± 0.2
24.7	Non-identified	4.0 ± 0.1
27.2	Non-identified	2.6 ± 1.3

TABLE 2. ^{14}C-activity of commercial isoproturon used in the experiment.

Retention time (min.)	Identification	% (count)
1.95	Non-identified	0.18 (636)
13.02	Hydroxy-monodemethyl-isoproturon	0.32 (11332)
14.47	Non-identified	0.27 (957)
17.03	Non-identified	0.04 (154)
19.25	Didemethyl-isoproturon	0.19 (674)
20.02	Monodemethyl-isoproturon	0.33 (1178)
21.23	Isoproturon	95.97 (339160)
23.47	Isopropyl-aniline	0.04 (146)
24.58	Non-identified	2.63 (9296)
26.1	Non-identified	0.02 (68)

The large predominance of the native isoproturon over the ^{14}C activity was also observed in 3 agricultural soils after 4 weeks of incubation (Pieuchot *et al.* 1996). In this latter study, the authors found that 70 to 85 % of the extracted ^{14}C activity corresponded to native isoproturon and that the main metabolite in 2 of the 3 soils studied was the monodemethyl-isoproturon, as in our study. This metabolite is quantitatively the main metabolite according to Fournier *et al.* (1975) and Gaillardon and Sabar (1994) and is the first to appear during isoproturon degradation in soil (Bohnenkamper *et al.* 1994; Mudd *et al.* 1983).

An accurate mass-balance could not have been calculated in our experimental design thus mineralization rate was not assessed. Pieuchot *et al.* (1996) showed that the mineralization of isoproturon in 3 different agricultural soils ranged from 5 to 20 % depending on the soil type, for 1 month of incubation. In another study, dealing with the effects of sludge-amendment or nutrient addition on the biodegradation of isoproturon, Perrin-Ganier *et*

al. (2001) showed that 5 to 11% of the initial applied radioactivity was released within 60 days of incubation in a brown agricultural soil, the extent of release depending on the treatment with sludge or nutrient. Therefore, the mineralization may be estimated to be within a 5 to 20% range in the agricultural soil used in our study.

^{14}C-activity in plant tissues. For technical reasons (oxidizer spirals were broken after the combustion of very few samples), it was impossible to combust plant samples, then to measure the total ^{14}C activity in plant tissues. Extraction of the samples by ASE was extremely difficult and the "maize – sea sand – Na_2SO_4" matrix created many background signals on chromatograms. Three samples could however been analysed by HPLC. Radioactivity in the 3 injected samples was very low, suggesting that radioactivity initially applied on the leaves was quickly removed from the leaves. Two main hypothesis may explain this phenomenon: (1) radioactivity applied on 1-month old leaves could have been "diluted" by leave growth and (2) volatilisation of residues could have been much higher on plant surface than on soil surface (maybe due to a higher temperature on the upper part of the microcosms). Chromatograms suggested that native isoproturon represented 20 to 45% of the extractable residues. Four non-identified metabolites were found. Further studies are needed to assess the fate of the herbicide deposited on leave surfaces in order to improve, in a risk assessment purpose, the knowledge of the exposure of herbivore organisms that fed on contaminated leaves.

Bioavailability of isoproturon residues in snails. Radioactivity detected in snail tissues with regard to experimental modalities is presented in Fig. 6. a. In this figure, the total ^{14}C activity and the activity of non-extractable and E1 and E2 residues are presented (Fig. 6. a.).

A clear transfer of isoproturon residues from soil and/or plant to snail tissues was observed. Total activity in the tissues of snails from modality 2 was higher (but non significantly) than that measured in snails from modality 1 and was more than 8 times higher than that in snails from modality 3. The difference was not significant (multiple comparison test following Kruskal-Wallis test > 0.05) between snails from modalities 1 and 3, although the activity was nearly 7 times higher in snails from modality 1.

Bioaccumulation factors (BAFs) could have been calculated for the modality 1 only since modality 2 had 2 sources of exposure and radioactivity in plant tissues in modality 3 could not have been calculated. As ^{14}C-activity in snail tissues is expressed in fresh mass, we used the average water content of *H. aspersa* viscera (80%, Gomot 1997) to calculate the theoretical ^{14}C-activity in dry mass. The activity is 1.6E-04 $mCi.g^{-1}$, which gives a BAF of 3.0. This BAF is intermediate between those found in *Apporectodea longa* exposed to isoproturon (Gevao *et al.* 2001). Indeed, in this latter experiment, the BAF was 0.8 in earthworms

exposed to soil containing only bound residues and 6.2 in animals exposed to freshly spiked soils.

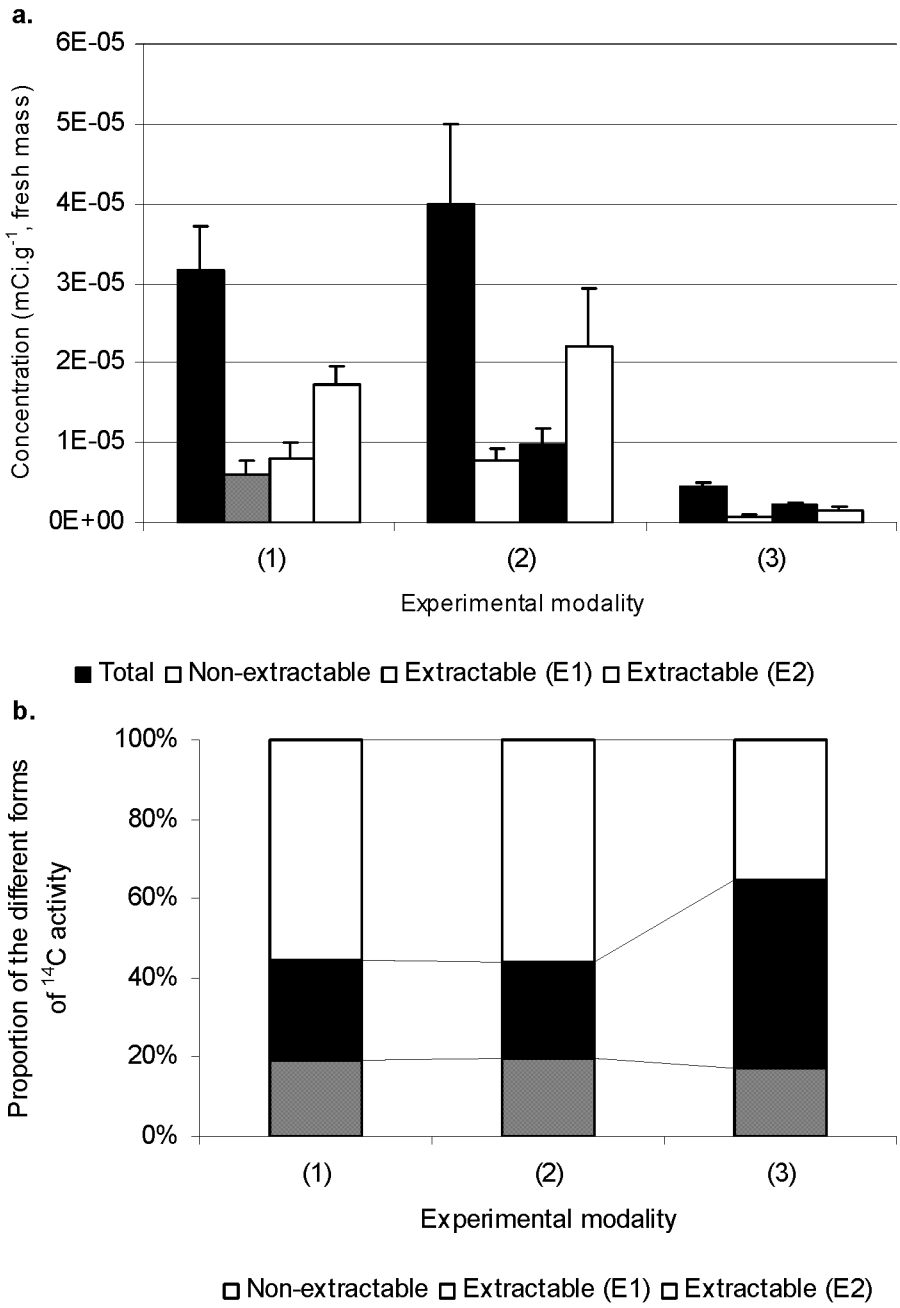


FIGURE 6. a. Concentration of ^{14}C activity in snail tissues according to the experimental modality. Bars represent standard deviation associated with mean (*n*= 3 or 4 pools of 5 snail viscera). **b.** Proportion of the different forms of ^{14}C activity in snail tissues according to the experimental modality.

This high transfer of residues from soil to snails may be explained by the high proportion of extractable residues, which are usually considered as readily bioavailable (Gevao *et al.* 2000; Gevao *et al.* 2001). Bound residues, which were shown to be also bioavailable, to a certain extent, to microorganisms, plants and annelids (Gevao *et al.* 2000; Gevao *et al.* 2001), should however not be neglected. We cannot know, in our experiment, whether bound

residues were bioavailable to snails but one can hypothesise that snails can access the pollutants in both the solution and solid phases of the soil by ingesting and affecting desorption as the soil pass through the gut, as it was suggested for earthworms (Gevao *et al.* 2001).

Another uptake route could also be involved in the transfer of isoproturon residues in snails. Indeed, some data suggest that the cutaneous route could be important, maybe more important than digestive one, in the expression of the toxicity of dimethoate on *H. aspersa* snails (Coeurdassier *et al.* 2002). Indeed, for similar concentrations, the toxicity of this insecticide via the substrate was higher than via the food on the 3 studied endpoints (acetylcholinesterase and carboxylesterase activities and snail growth).

Identification of ^{14}C activity in snail tissues. The concentrations of the different activities are given in the Fig. 6. a. and the relative proportions are presented in the Fig. 6. b. Snails from modalities 1 and 2 showed very similar proportions although proportions in snail from modality 3 were relatively different. Proportions of non-extractable residues were consistent in all groups and represented 17 to 20% of the total radioactivity in snail tissues. The differences lied mainly in the proportions of extractable residues. The proportion of E1 residues was significantly higher (48%) in snails from modality 3 than in snails from modalities 1 and 2 (25 and 26%, respectively). These residues could partly correspond to isoproturon conjugates (Dr Ü. Dorfler, Comm. Pers.). Since conjugation is the second phase of biochemical detoxification processes of organic compounds, present results suggest that isoproturon and/or metabolites were actively detoxified by snails. Further researches are however needed to confirm these findings, by, for instance, determining accurately the nature of theses residues or by assessing the activities of xenobiotic-metabolising enzymes (particularly those involved in conjugation processes like glutathione *S*-transferase), as it was recently done in *H. aspersa* snails exposed to atmospheric naphthalene (Ismert 2000). The differences in the proportions E1 and E2 residues between modalities 1 and 2 and modality 3 suggest that differences in detoxification occurred depending on the snail exposure.

Extractable residues E2 were analysed by HPLC (Fig. 5. b.). Radioactivity levels were enough to perform analyses in good conditions for snails from modalities 1 and 2. By contrast, the radioactivity was too low in snails from modality 3 and the snails from all 4 replicate-microcosms were pooled to be analysed. In these snails, HPLC results suggest that extractable residues were constituted by around 35% native isoproturon and by 2 non-identified metabolites, whose retention times were 13.3 and 14.4, respectively. In snails from the modalities 1 and 2, results were not consistent, neither between modalities, nor within each modality. Isoproturon was not found or found in very low amount (1%) in all samples, except one in which isoproturon represented 30% of the extractable activity. A peak whose retention time was 14.4 was found in all samples and accounted for 43 to 66% of the total

extractable activity (Fig. 5. b.). However, this retention time corresponds to an impurity that was found in the commercial isoproturon used in the experiment (Table 2). Another peak (retention time around 13.3) was found in all samples and accounted for 6 to 30% of the total activity (Fig. 5. b.). This peak may correspond to hydroxy-monodemethyl-isoproturon. Some other non-identified metabolites were found in lower proportions in snail tissues. The HPLC data suggest that isoproturon is quickly degraded in the viscera of snails exposed in modalities 2 and 3. The only identified metabolite found in the tissues was the hydroxyl-monodemethyl-isoproturon, which is known to be one of the first steps of the major pathway of degradation isoproturon in soils (Perrin-Ganier *et al.* 2001; Pieuchot *et al.* 1996). We cannot know, however, if this metabolite was taken up from the soil or if it is was metabolised by snail itself. We could not find any study on the identification of isoproturon metabolites in another animal organism for comparison.

This original experimental design allowed studying the bioavailability, the transfer and the degradation of a widely used organic compound, the phenylurea herbicide isoproturon, in a terrestrial three-link food web. The study shows a clear transfer of isoproturon residues from soil and/or plant to the snail tissues. Presence of high proportions of residues that could be conjugates and the absence of native isoproturon in almost all snails suggest that these gastropods actively detoxify the isoproturon and/or its residues. The present design could be further used to study the transfer of more persistent and/or more toxic compounds (persistent organic compounds like polychlorinated biphenyls or dibenzo-*p*-dioxins) in food webs.

Acknowledgements

We gratefully thank the members of the Department of Soil Ecology of the GSF. Dr M. Coeurdassier and Pr L. Gomot are warmly acknowledged for many fruitful discussions.

Literature Cited

Badr, A., and Elkington, T. T. (1982). Antimitotic and chromotoxic activities of isoproturon in *Allium cepa* and *Hordeum vulgare*. *Environ. Experiment. Bot.* **2**, 265-270.

Bohnenkamper, O., Glassgen, W. E., Hass, M., Kliem, E. D., Komossa, D., Lehr, S., May, R. G., Sandermann, H., and Scheunert, I. (1994) Biodégradation de l'isoproturon dans les plantes et les sols in C.R. In 24ème Congrès du Groupe Français des Pesticides : Biodisponibilité des pesticides et biomarqueurs d'exposition et de résistance (ed P. Soler), pp. 139-142, 18-19 mai 1994, Bordeaux, France.

Burauel, P., and Führ, F. (2000). Formation and long-term fate of non-extractable residues in outdoor lysimeter studies. *Environ. Pollut.* **108**, 45-52.

Coeurdassier, M., Gomot de Vaufleury, A., Saint-Denis, M., Ribera, D., Narbonne, J. F., and Badot, P. M. (2002). Effects of dimethoate on snail B-esterase as a function of dose, time, exposure route in a laboratory bioassay. *Biomarkers* **7**, 138-150.

Conacher, J., and Conacher, A. (1986). Herbicides in agriculture: minimum tillage, science and society. GEOWEST No. 22, University of Western Australia, Nedlands, WA.

Deml, R., and Dettner, K. (2001). Biodegradation and transfer of ingested 2,4-D herbicide by a polyphagous saturniid caterpillar. *Chemosphere* **45**, 783-789.

Fournier, J.-C., Soulas, G., and Catroux, G. (1975). Dégradation microbienne de l'isoproturon dans des modèles de laboratoire. *Chemosphere* **4**, 207-214.

Freemark, K., and Boutin, C. (1995). Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: a review with special reference to North America. *Agric. Ecosyst. Environ.* **52**, 67-91.

Gaillardon, P., and Sabar, M. (1994). Changes in the concentrations in isoproturon and its degradation products in soil and soil solution during incubation at two temperatures. *Weed Res.* **34**, 243-250.

Gevao, B., Mordaunt, C., Semple, K. T., Piearce, T. G., and Jones, K. C. (2001). Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 501-507.

Gevao, B., Semple, K. T., and Jones, K. C. (2000). Bound pesticide residues in soils: a review. *Environ. Pollut.* **108**, 3-14.

Gomot, A. (1997). Effets des métaux lourds sur le développement des escargots. utilisation des escargots comme bio-indicateurs de pollution par les métaux lourds pour la préservation de la santé de l'homme. *Bull. Acad. Natle. Méd.* **181**, 59-75.

Hoshiya, T., Hasegawa, T., Hakoi, K., Cui, L., Ogiso, T., Cabral, R., and Ito, N. (1993). Enhancement by non mutagenic pesticides of GST-P positive hepatic foci development initiated with diethylnitrosamine in the rat. *Caner Lett.* **72**, 59-64.

Ismert, M. (2000). *Les enzymes de biotransformation des xénobiotiques chez Helix aspersa (escargot) et Pleurozium schreberi (mousse), biomarqueurs potentiels de la pollution atmosphérique par les hydrocarbures aromatiques polycycliques*, Thèse de Doctorat, Université de Metz.

Meharg, A. A. (1996). Bioavailability of atrazine to soil microbes in the presence of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.). *Soil Biol. Biochem.* **28**, 555-559.

Mudd, P. J., Hance, R. J., and Wright, S. J. L. (1983). The persistence and metabolism of isoproturon in soil. *Weed Res.* **23**, 239-246.

Paine, J. M., McKee, M. J., and Ryan, M. E. (1993). Toxicity and bioaccumulation of soil PCBs in crickets: comparison of laboratory and field studies. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 2097-2103.

Perrin-Ganier, C., Schiavon, F., Morel, J.-L., and Schiavon, M. (2001). Effect of sludge-amendment or nutrient addition on the biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. *Chemosphere* **44**, 887-892.

Pieuchot, M., Perrin-Ganier, C., Portal, J.-M., and Schiavon, M. (1996). Study on the mineralization and degradation of isoproturon in three soils. *Chemosphere* **33**, 467-478.

Schroll, R., Cao, G., Mora, A., Langenbach, T., and I., S. (1994) Microcosm - a test system to determine the fate of pesticides in undisturbed soil columns. In Proc. 5th International Workshop on the Environmental Behavior of Pesticides and Regulatory Aspects (eds A. Copin, L. Houins, L. Pussemeir, and P. Salembier), Brussels, Belgium.

Sokal, R. R., and Rohlf, F. J. (1997). *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research.* WH Freeman and Company, New York.

Sousa, J. P., Loureiro, S., Pieper, S., Frost, M., Kratz, W., Nogueira, A. J. A., and Soarest, A. M. V. M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2557-2563.

The Royal Society of Chemistry (1994). *The Agrochemicals Handbook*. The Royal Society of Chemistry, Cambridge.

Section VI.

Transfert de Cd, Cu, Ni, Pb et Zn depuis des sols forestiers amendés par des boues de station d'épuration vers l'escargot *Helix aspersa* : étude en microcosmes *in situ*

Cette expérience a fait l'objet d'un article sous presse dans la revue *Environmental Pollution*. Les auteurs sont Renaud Scheifler, Mohammed BenBrahim, Annette Gomot-de Vaufleury, Jean-Michel Carnus et Pierre-Marie Badot.

Résumé

Des escargots juvéniles *Helix aspersa* exposés en microcosmes *in situ* ont été utilisés pour évaluer le transfert de Cd, Cu, Ni, Pb et Zn depuis des sols forestiers amendés par des boues de station d'épuration liquides ou compostées. Les concentrations et les quantités en Zn dans les tissus des escargots exposés aux boues liquides et compostées sont significativement supérieures aux témoins, après 5 et 7 semaines d'exposition, respectivement. Les tendances sont moins nettes pour les autres éléments trace métalliques (ETM). Ces résultats montrent que le Zn, parmi un "cocktail" d'ETM provenant d'amendements, représente la principale préoccupation en terme de risque de transferts dans les chaînes alimentaires et d'empoisonnement secondaire. Les microcosmes utilisés dans cette expérience se sont révélés bien adaptés à des études de bioindication de relativement long terme (environ 2 mois) avec des escargots *H. aspersa* comme bioindicateur. Ces derniers ont rapidement reflété les variations des concentrations en ETM dans leur environnement immédiat. La présente étude fournit donc un outil simple et efficace permettant d'évaluer la biodisponibilité et le transfert des ETM.

ELSEVIER

Environmental Pollution 122 (2003) 343–350

ENVIRONMENTAL POLLUTION

www.elsevier.com/locate/envpol

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

R. Scheifler[a], M. Ben Brahim[b], A. Gomot-de Vaufleury[a,*], J.-M. Carnus[b], P.-M. Badot[a]

[a]*Université de Franche-Comté, Institut des Sciences et Techniques de l'Environnement, Laboratoire de Biologie et Ecophysiologie, EA 3184 MR USC INRA, Place Leclerc, F-25030 Besançon Cedex, France*

[b]*Institut National de la Recherche Agronomique, Unité de Recherches Forestières, UR 911 INRA, BP 45, Domaine de l'Hermitage, F-33611 Gazinet Cestas Cedex, France*

Received 29 March 2002; accepted 26 August 2002

"Capsule": Helix aspersa *snails exposed in field microcosms were used to evaluate metallic trace elements transfer from forest soil amended with composted and liquid sewage sludge.*

Abstract

Juvenile *Helix aspersa* snails exposed in field microcosms were used to assess the transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from forest soils amended with liquid and composted sewage sludge. Zn concentrations and contents were significantly higher in snails exposed to liquid and composted sludge after 5 and 7 weeks of exposure, when compared with control. Trends were less clear for the other metals. Present results show that Zn, among the cocktail of metallic trace elements (MTE) coming from sewage sludge disposal, represents the principal concern for food chain transfer and secondary poisoning risks. The microcosm design used in this experiment was well suited for relatively long-term (about 2 months) active biomonitoring with *H. aspersa* snails. The snails quickly indicated the variations of MTE concentrations in their immediate environment. Therefore, the present study provides a simple but efficient field tool to evaluate MTE bioavailability and transfer.
© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

Keywords: Active biomonitoring; Metallic trace elements; Bioavailability; Invertebrate; Risk of secondary poisoning

1. Introduction

The annual production of municipal sludge in France is estimated at 850 000 dry tonnes and this quantity is expected to increase in the next few years (+30% until 2005; IFEN, 2001). Sludge production will also increase in other countries (Bruce et al., 1999; McGrath et al., 1999). In France, about 60% of sewage sludge is land applied, mainly to agricultural soils (IFEN, 2001). This recycling strategy is cost-effective compared with incineration and may constitute a valuable source of organic matter and inorganic nutrients for plants (Hegstrom and West, 1989; McGrath et al., 1999). However, because of the risk of MTE transfer from amended soils to crops and food chains, the disposal of sewage sludge on agricultural land is less and less accepted by farmers and the public at large.

Application of sewage sludge on forested land could therefore constitute a pertinent alternative, especially for intensive forestry and on sites where maintenance or restoration of soil fertility is required.

However, while many studies have focussed on the fate and effects of MTE in agricultural amended soils, few reports exist on amended forest ecosystems. The direct transposition of results obtained with agricultural areas to forested ones is limited due to the physico-chemical characteristics and functioning of the two soils/ecosystems. In particular, the lower pH of forest soils compared with agricultural ones could dramatically increase MTE availability (Römkens and Salomon, 1998).

Moreover, French legislation explicitly states that sewage sludge application on forest land should not

* Corresponding author. Tel. +33-381-665-709; fax. +33-381-665-797.

E-mail address: annette.devaufleury@univ-fcomte.fr (A. Gomot-de Vaufleury).

0269-7491/03/$ - see front matter © 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
PII: S0269-7491(02)00333-0

constitute a risk to human activity (leisure activities including hunting, picking, sport...) and should not lead to excessive accumulation of undesirable substances in soil or contamination of wildlife (Journal Officiel, 1997, 1998). Evaluation of MTE mobility, bioavailability and transfer to vegetation or fauna in forest amended ecosystems is therefore needed.

The few studies on forest amended ecosystems focussed mainly on game species—a potential source of human contamination—and rodents (Hegstrom and West, 1989). In these studies, wild animals were sampled and their tissues were analysed for MTE concentrations. However, in most cases, the age of the sampled organisms and duration of exposure to the contaminants, could rarely be determined accurately. This is a limiting factor for the accurate evaluation of MTE bioavailability and transfer. Moreover, large species such as game and rodents have a high mobility and thus are not proper indicators of contamination on a small spatial scale (Smith and Rongstad, 1982).

Rather than these passive biomonitoring studies, active biomonitoring techniques could constitute meaningful methods to overcome this bias. In such experiments, animals of known age (usually coming from standardised laboratory rearing) are exposed to amended or control soils in microcosms. After a given period of exposure, tissues of the exposed animals are analysed to determine pollutant concentrations. These results allow the characterisation of the bioavailability and transfer of pollutants, taking into account environmental conditions, physiological (age, sex of the organisms...) and ecotoxicological parameters (exposure duration). Moreover, such methods could be standardised to constitute a useful tool for in situ risk assessment purposes.

For such approaches, terrestrial gastropods offer many advantages as model animals. Since they are herbivorous and detritivorous organisms, snails are exposed to both soils and plants and integrate these two routes of exposure. Among terrestrial gastropods, *Helix aspersa* snails, whose biology and ecology are well known (Cain, 1983; Barker, 2001), are macroconcentrators for several metals (Dallinger, 1993) and one of the most commonly used species in ecotoxicological laboratory experiments (Russell et al., 1981; Laskowski and Hopkin, 1996a,b; Gomot, 1997; Gomot-de Vaufleury, 2000). *H. aspersa* snails have also been used as MTE bioindicators in polluted areas in passive (Beeby and Eaves, 1983; Beeby and Richmond, 1998; Pihan and Gomot-deVaufleury, 2000) as well as active (Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2000) biomonitoring studies.

The aim of this work was to evaluate MTE transfer in forested areas amended with composted and liquid sewage sludge, using an active biomonitoring method with *Helix aspersa* juvenile snails exposed in field microcosms.

2. Materials and methods

2.1. Experimental site

The experiment took place in a pine (*Pinus pinaster* Aït) plantation located in the council forest of Ychoux (Landes *département*), located 60 km southwest of Bordeaux, France. The climate is oceanic, mild (annual average temperature: 12 °C) and wet (annual average precipitation: 1000 mm). Trees were planted in lines distant of 4 m. On each line, trees were planted every 1.6 m. Between lines, the vegetation was mainly made of herbaceous species, dominated by the Moor grass *Molinia cærulea* and several heather (*Erica* sp.) species. In autumn 2000, three 1000 m^2 plots were delimited in the plantation: one was amended with a composted sludge (CoSl), another with a liquid sludge (LiSl) and the last plot was a control and received no amendment (Ctrl).

2.2. Soil and sludge physico-chemical characteristics

The soil texture (Table 1) was characterised by a very high percentage of sand (>94%) showing the filter nature of the soil. The physico-chemical characteristics (Table 1) of this soil included very low pH and Cationic Exchange Capacity (CEC), a strong deficiency in P and low exchangeable Ca, Mg and K, characteristic of low fertility. The very low concentration in MTE is due to the filter nature of the soil and the sandy origin of the parent rock. Concentrations for all studied elements are lower than average concentrations reported for French

Table 1
Physico-chemical characteristics of the soil top layer (0–20 cm). Mean ± standard deviation

Clay,%	3.5
Silt,%	2.0
Sand,%	94.5
Organic matter, g kg^{-1}	27.10 ± 10.79
pH_{water}	4.3 ± 0.2
P_2O_5 Olsen, g kg^{-1}	0.01 ± 0.01
CEC Metson, cmol kg^{-1}	4.36 ± 1.96
C, g kg^{-1}	15.76 ± 6.26
N, g kg^{-1}	0.67 ± 0.29
C/N	23.8 ± 1.3
P (P_2O_5) total,%	0.01 ± 0.00
K,%	0.34 ± 0.04
Exchangeable K, cmol kg^{-1}	0.03 ± 0.01
Ca,%	0.02 ± 0.00
Exchangeable Ca, cmol kg^{-1}	0.20 ± 0.00
Mg,%	0.02 ± 0.00
Exchangeable Mg, cmol kg^{-1}	0.05 ± 0.02
Fe,%	0.10 ± 0.02
Cd, mg kg^{-1}	0.02 ± 0.00
Cu, mg kg^{-1}	<2
Ni, mg kg^{-1}	<2
Pb, mg kg^{-1}	5.76 ± 0.32
Zn, mg kg^{-1}	4.36 ± 0.44

unpolluted soils (Baize, 1997) and correspond to values for which amendments of sludge are fully justified.

The liquid sludge came from the sewage treatment plant of Ychoux city and the composted sludge came from a composting plant located in the *region*. Both sludge were manually applied (to ensure homogeneity of application) at a rate of 3 t of dry matter per hectare. This rate is in agreement with the French regulations (Journal Officiel, 1997, 1998), which allow 30 t of dry matter per hectare over 10 years. Characteristics of composted and liquid sludge are presented in Table 2. Data for both sludge were obtained from a sample constituted by sub-samples of 1 l that were taken every 2 h during the day of spreading. Concentrations of Zn, Cu, and Cd in liquid sludge are lower than in the composted one and the opposite holds for Cr, Ni and Pb concentrations. For both sludge, MTE concentrations are far lower than the maximum authorised values for soil amendment (Journal Officiel, 1998).

2.3. Microcosms

In each of the three 1000 m^2 plots, three replicate stainless steel microcosms (diameter 0.25 m, 0.25 m high) were randomly placed (Fig. 1a). A stainless steel netting (mesh size: 10 mm) was securely fitted over the top of the microcosm to avoid escape of the snails and to protect them against predators (birds, carnivorous mammals; Fig. 1b and c).

2.4. Animals

Fifteen juvenile garden snails *Helix aspersa aspersa* Müller were put into each microcosm. The snails, aged 2 months, were obtained from our standardised laboratory rearing, as described by Gomot-de Vaufleury (2000).

Table 2
Characteristics of composted (CoSl) and liquid (LiSl) sludge

Parameter	CoSl	LiSl
pH_{water}	6.67	6.63
Dry matter (%)	48.10	2.37
N (%DM[a])	2.10	6.70
P (%DM)	1.11	2.96
K (%DM)	0.62	1.23
Ca (%DM)	4.46	1.64
Mg (%DM)	0.32	0.62
Fe (%DM)	1.69	0.36
Cd (mg kg^{-1})	0.89	1.53
Cu (mg kg^{-1})	172	227
Ni (mg kg^{-1})	34.5	18.8
Pb (mg kg^{-1})	45.3	37.5
Zn (mg kg^{-1})	386	704

[a] DM, dry matter.

2.5. Experimental design

On 27 March 2001, composted sludge was applied and microcosms containing snails were placed in the field. Microcosms of control plots were also placed at this date. Due to weather conditions (several days of heavy raining) and according to law (i.e. to limit leaching of MTE to surface and groundwater), it was not possible to spray the liquid sludge before 11 April 2001. Corresponding microcosms were therefore placed at this date, after the spreading. During this delay, snails were maintained in aestivation (reduced activity due to dewatering) and their average fresh mass decreased (Table 3).

On 17 April and 21 May 2001, all microcosms were checked, mortality was evaluated, growth was assessed by weighing snails in situ and four snails were randomly sampled in each microcosm for MTE analysis. The exposure duration was 3 and 7 weeks for control and composted sludge-exposed snails and 1 and 5 weeks for liquid sludge-exposed snails.

2.6. MTE analysis

Snails were starved for 48 h to avoid analysing the digestive system content. The snails were then sacrificed by deep-freezing and stored at −20 °C. After defrosting, snails were removed from their shell and the soft body was separated into two parts: viscera and foot. The different parts were oven-dried (60 °C) to constant dry mass and digested with nitric acid (HNO_3 50%) in an oven (60 °C) for 48 h. The tissues were analysed by inductively coupled plasma emission spectrometry (ICP, Yvon-Jobin JY 238-ICP). The validity of the analytical method was checked using standard biological reference material (TORT-2, lobster hepatopancreas from NRCC-CNRL, Canada). Values for the different MTE were consistently within 5% of the certified values, except for Pb for which the values were within 25% of the certified values.

2.7. Statistical treatments

Differences in snail fresh masses, MTE concentrations and MTE contents between Ctrl and CoSl, Ctrl and LiSl and CoSl and LiSl groups were analysed with the non-parametric Mann–Whitney test (Sokal and Rohlf, 1997).

3. Results

3.1. Effect of amendment on snails

Mortality was extremely low during all experiments. Only one individual was found dead at the last sampling

Fig. 1. (a) The picture represents an experimental plot, equipped with a rainfall collecting system (foreground, large arrow) and a lysimeter pit (background, thin arrow). The circle indicates the position of the microcosm. (b) Stainless steel microcosm containing 15 juvenile *Helix aspersa* snails. (c) In the bottom of the microcosm, pieces of tile were placed to provide shelter for the snails. Snails foraged only on field soil and vegetation.

Table 3
Fresh mass (g, mean ± standard deviation) of *Helix aspersa* snails exposed to non-amended (Ctrl) and liquid (LiSl) or composted (CoSl) sludge amended soils. Exposure duration (weeks) is given in parenthese

Snail group	27 March	11 April	17 April	21 May
Ctrl	4.3±0.4 (0)	–	4.7±0.4 (3)	3.6±0.4 (7)
CoSl	4.1±0.4 (0)	–	4.6±0.4 (3)	3.6±0.3 (7)
LiSl	–	3.7±0.4 (0)	3.8±0.4 (1)	3.3±0.3 (5)

date in CoSl treatment. The mortality was therefore 2.22% for this treatment (1 from 45) and 0.74% for all experiments (1 from 135). This extremely low mortality rate demonstrates the efficiency of this type of field microcosm for providing snails with good "living conditions" and for protecting them against predators. The mass of the Ctrl and CoSl-exposed snails was similar for all sampling dates, without any significant differences (Table 3). The mass of LiSl-exposed snails (Table 3) was not statistically compared with other groups since the initial mass was lower and exposure duration different. However, the trend of mass variation over time in this group was relatively similar to that observed for the Ctrl and CoSl groups (a slightly lower final mass compared with an initial one).

In summary, CoSl treatment had no toxic effects on the two studied endpoints (mortality and growth) for the exposure durations (from 3 weeks to almost 2 months). LiSl treatment had no effect on mortality and, even though comparison with control is less valid, did not seem to affect growth.

3.2. MTE concentrations in whole snail soft tissues

Concentrations of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in whole soft tissues of snails exposed to non-amended or amended soils are presented in Fig. 2a–e. At the first sampling date, no differences were found among groups for all MTE concentrations except Cu whose concentrations were lower in exposed snails than in Ctrl ones (Fig. 2b). At the second sampling date, Zn concentrations were higher in the CoSl group than in the Ctrl one (Fig. 2e). Zn concentrations were also significantly higher in the LiSl group (Fig. 2e) despite lower exposure duration. Cd concentrations were significantly higher in the CoSl group than in Ctrl one (Fig. 2a). No differences were found for other MTE.

A comparison between concentrations measured at the first and the second sampling dates showed a significant increase in Cd, Cu and Zn concentrations in the CoSl and LiSl groups (Fig. 2a, b, e). The increase in Zn concentration was also significant for the Ctrl group (Fig. 2e). An increase in Pb concentration was also found for the LiSl group (Fig. 2d).

Clearly, the first exposure duration (1 week for the LiSl group and 3 weeks for the CoSl one) was insufficient to highlight any differences in ETM concentrations between exposed and control groups. However, the second exposure duration (5 and 7 weeks for the LiSl and CoSl groups, respectively) was sufficient and mainly showed higher Zn concentrations in exposed groups than in control one.

3.3. MTE contents and distribution within the body

At the first sampling date, no differences were found among groups for all MTE contents and tissues (feet or viscera) except for Cu, whose content was significantly lower in feet of the LiSl group than in the control one (Table 4). At the second sampling date, Zn contents were significantly higher in the viscera of the exposed groups, compared to Ctrl one (Table 4). Cd content was also significantly higher in the viscera of the CoSl group than in Ctrl one (Table 4). The only difference detected in feet was found between the CoSl group and the Ctrl one for Ni (Table 4).

A comparison of contents between the first and the second exposure duration showed a significant decrease

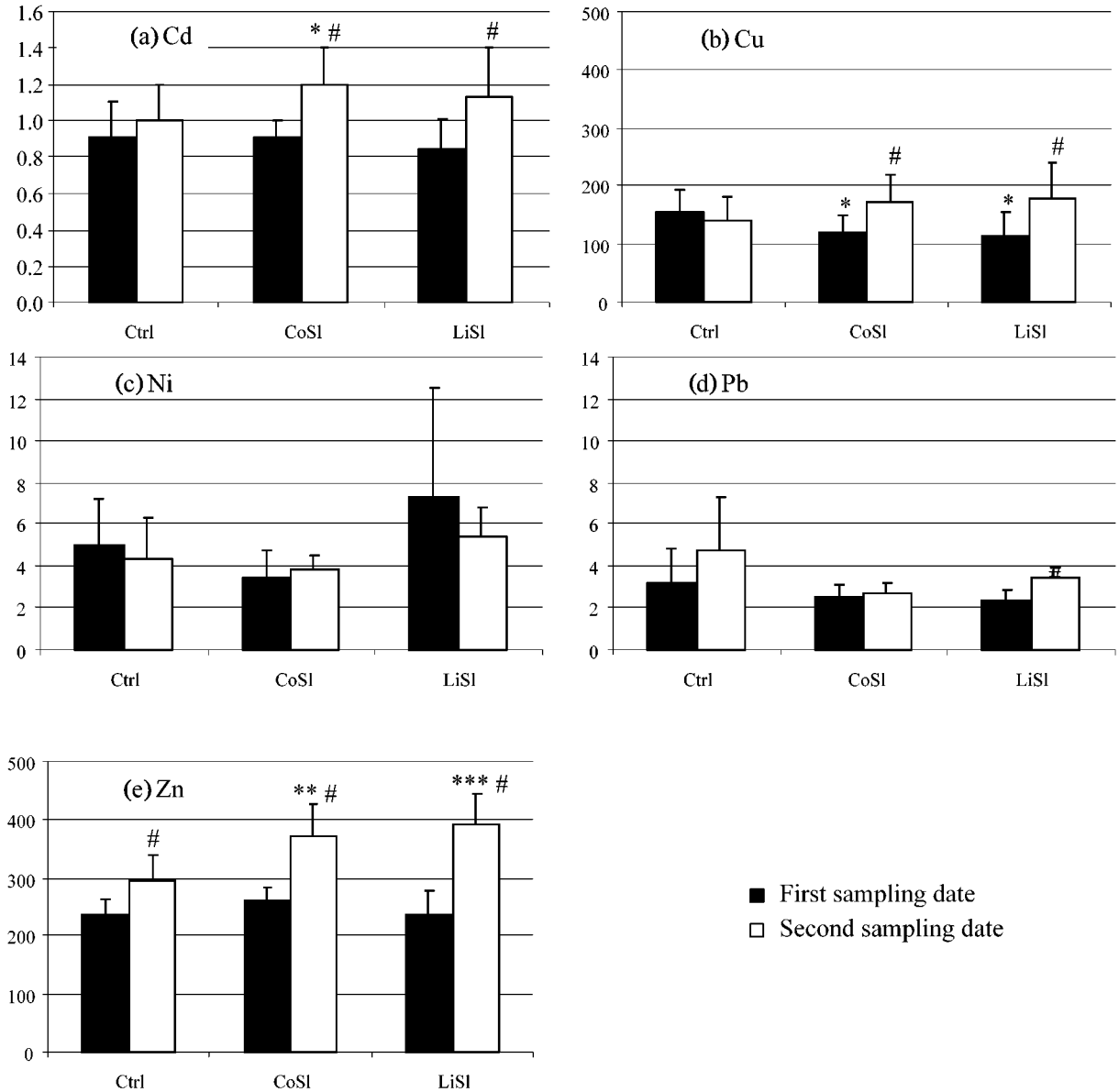


Fig. 2. (a–e). Concentrations (μg g^{-1} dry mass) of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in whole soft body of *Helix aspersa* snails exposed to non amended soil (Ctrl) or soils amended with composted (CoSl) or liquid (LiSl) sludge. Bars represent standard deviation associated with mean values. *, ** and *** indicate group(s) significantly different from control with $P<0.05$, $P<0.01$ and $P<0.001$, respectively. # Indicates significant increase in concentration between the first and the second sampling date ($P<0.05$).

in Zn content in feet of all groups (Table 4). By contrast, Zn contents clearly increased in viscera of snails exposed to composted and liquid sludge (Table 4). The net increase in Zn content (in the whole body) between the first and the second sampling was 15.5% in CoSl-exposed snails and 31.4% in LiSl-exposed snails. Zn content in the viscera of the control group did not increase (Table 4), indicating that the increase in Zn concentration observed in this group (Fig. 2e) was due to a loss of snail mass rather than to a Zn uptake. Cd contents in viscera of CoSl-exposed snails showed an increase but not significant (Table 4).

The data also showed that all MTE were mainly stored in viscera except Cu, which was homogeneously distributed within the two studied tissues.

In summary, calculations of MTE contents confirmed that the increase in Zn concentrations observed in the exposed snails actually corresponded to an uptake of Zn. The increase of Zn concentration in the control group, however, was due to a loss of mass. The significantly higher content of Cd in CoSl group should be handled with care since the Cd content values were very low for all groups. Moreover, the increase of Cd content between the first and the second sampling dates was not significant.

Table 4
Cd, Cu, Ni, Pb and Zn content (μg, mean ± standard deviation) in foot and viscera of *Helix aspersa* snails exposed to non-amended soil (Ctrl) and to soils amended with composted (CoSl) or liquid (LiSl) sludge

	Ctrl	CoSl	LiSl
First sampling date			
Foot			
Cd	0.05±0.01	0.05±0.01	0.05±0.01
Cu	24.47±7.34	19.23±5.77	16.97±5.70*
Ni	0.34±0.09	0.24±0.10	0.45±0.10
Pb	0.03±0.05	0.10±0.09	0.04±0.05
Zn	9.11±1.44	8.94±2.03	8.44±1.25
Viscera			
Cd	0.21±0.05	0.22±0.04	0.20±0.04
Cu	22.36±7.79	16.83±5.99	17.56±9.57
Ni	1.20±0.76	0.76±0.28	1.68±1.40
Pb	0.97±0.52	0.66±0.16	0.66±0.13
Zn	62.33±8.85	68.60±6.13	62.50±12.68
Second sampling date			
Foot			
Cd	0.06±0.02	0.06±0.02	0.06±0.02
Cu	18.25±5.56[a]	22.78±8.36	21.53±7.72
Ni	0.32±0.13	0.21±0.08*	0.32±0.08[a]
Pb	0.04±0.04	0.03±0.04	0.03±0.05
Zn	6.46±1.26[a]	6.98±1.77[a]	6.66±1.01[a]
Viscera			
Cd	0.19±0.05	0.25±0.07*	0.20±0.03
Cu	17.06±8.11	21.28±6.96	20.07±8.12
Ni	0.75±0.32	0.75±0.40	0.94±0.32[a]
Pb	1.11±0.68	0.66±0.07	0.77±0.16
Zn	65.99±8.60	81.17±19.10*[a]	83.58±5.71*[a]

[a] Represents significant difference in metal contents between the first and the second sampling ($P<0.05$).
* Represents group(s) significantly different from control ($P<0.05$).

4. Discussion

Present results show a clear increase in Zn concentrations and contents in snails exposed to forest soils amended with composted and liquid sewage sludge, even after a relatively short exposure duration (5–7 weeks) and for sludge with low MTE concentrations (well below French limits). Since Zn was the most abundant metal in both sludge types (with around 400 and 700 μg g^{-1} in composted and liquid sludge, respectively), the present results show that *H. aspersa* snails, which were exposed to MTE by digestive route (through the consumption of soil and/or plant contaminated by sludge) and by dermal route (by crawling on contaminated substrates), efficiently and quickly indicate variations in metal concentration in their surrounding environment. These results confirm the relevance of using this species as a biomonitor. Cadmium concentrations and contents increase slightly only in snails exposed to composted sludge. The clear increase in Zn content observed in this study shows that this MTE is bioavailable to snails, in the present conditions. The very low pH (4.3) of the studied soil probably contributes to the MTE mobility. Indeed, the chemical availability of Zn and Cd (Knight et al., 1998; Martinez and Motto, 2000) as well as their bioavailability to earthworms (Ma, 1982) were higher in low pH soils compared with high pH soils. By contrast, the high MTE mobility and the filter nature of this soil may have led to leaching of the MTE to deep soil layers and groundwater, thus may have decreased the quantity of MTE present at the soil surface and available for uptake by snails. Further studies on MTE leaching are currently in process around the amended areas and will be reported later.

Passive biomonitoring studies previously reported higher MTE concentrations in organisms inhabiting different sludge-treated areas (mainly agricultural areas but also mine reclamation sites or forests) compared with non-amended areas. This phenomenon was demonstrated for different organisms including earthworms (Helmke et al., 1979; Pietz et al., 1984; Wade et al., 1982), small mammals (Anderson et al., 1982; Hegstrom and West, 1989) and birds (Milner, 1986). Most of these studies underlined that, in spite of the high MTE concentrations, few or no short-term effects at the individual level were detected. The present results confirm the absence of measured effects of sludge amendment, for the two studied endpoints (i.e. mortality and growth) and for the exposure durations considered. However, *H. aspersa* snails are known to be very tolerant to MTE exposure, even though they accumulate high MTE contents in their tissues (Russell et al., 1981; Laskowski and Hopkin, 1996a,b; Gomot, 1997; Gomot-de Vaufleury, 2000). Therefore, other species, longer exposure durations and other endpoints (e.g. reproduction) should be studied to confirm whether sludge application has any deleterious effects on wildlife.

The increase in MTE concentrations in the tissues of exposed organisms raises the problem of transfer of MTE in food chains and potential secondary poisoning. In the present case, the risk should be handled in a human risk assessment perspective since, in France (and in some other European countries), snails are picked in the field for human consumption. Taking into account the human daily threshold toxicity values for Zn and Cd (WHO, 1972, 1983) and their amounts in tissues of sludge-exposed snails, we calculated the daily consumption of snails that would lead to the toxicity threshold. The results were similar for both metals and showed that toxicity would occur for a daily consumption of 3.3 snails per kg body weight (e.g. 230 snails for a man weighing 70 kg). Since the daily consumption of snails is usually not higher than 12 per day and per person, the risk of secondary poisoning for a human can be considered weak in the present conditions.

However, the risk of secondary poisoning for wildlife should also be considered since snails are prey for many invertebrate and vertebrate predators. The risk may be especially high for animals whose diet consists mainly of snails (predatory invertebrates like carabid beetles, small mammals like hedgehogs or dormouse, birds like thrushes). Increases in Zn and Cd concentrations in predators exposed to contaminated prey, following sludge application on agricultural areas were recently reported for a "wheat (*Triticum eastivum*)—grain aphids (*Sitobion avenae*)—predatory carabid beetle (*Bembidion lampros*)" food chain (Merrington et al., 1997a,b; Winder et al., 1999). As in the present study, these authors underlined that increased MTE concentrations were observed following moderate application rates and for "good quality" sludge. Deleterious effects of Cd were observed in *Chrysocarabus splendens* carabid beetles exposed to Cd-contaminated *H. aspersa* snails (Scheifler et al., 2002) but concentrations in snail tissues were much higher than in the present case. For Zn, however, laboratory experiments showed that beetles (*Poecilus cupreus*) exposed to preys contaminated with 400 $\mu g\ g^{-1}$ of Zn exhibited a lower (although non significantly) population growth rate than unexposed beetles (Kramarz, 2000). The Zn concentrations reported in exposed snails in the present study are close to that reported by Kramarz (2000). Because field conditions are much more restrictive than laboratory ones (predation, competition, unfavourable weather...), it may be assumed that Zn concentrations reported in exposed snails in the present study could exert significant toxic effects on predatory beetles. Further studies are therefore needed to improve the secondary poisoning risk assessment, for invertebrate (but also vertebrate) predatory fauna.

5. Conclusions

This study shows a clear transfer of Zn from forest soils amended with two types of sewage sludge to a primary consumer, the snail *Helix aspersa*. As it was previously demonstrated in sludge-amended agricultural areas (Levine et al., 1989; Merrington et al., 1997a; Winder et al., 1999), present results show that the risk of MTE transfer in the food chain is also a subject of concern for forest soils. A precautionary approach to metal loading in forest soils should therefore be taken. Since Zn concentrations are commonly much higher than Cd concentrations in sludge, we hypothesised that Zn rather than Cd is of environmental concern on amended ecosystems, as it was suggested for mining sites (Sandifer and Hopkin, 1996) and for polluted soils in general (Lock and Janssen, 2001). Long-term studies concerning the leaching of MTE in deep soil layers and groundwater and the transfer of MTE to plants are currently in process and will allow, with the present data on MTE transfer to snails, determining which MTE(s) is(are) of environmental concern in the studied area. The present results also show that the simple design that was used (stainless-steel microcosms and juvenile *H. aspersa* snails) is effective for long-term active biomonitoring experiments in the field. Therefore, this design could easily be standardised to constitute an interesting tool for in situ risk assessment purposes.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge L. Gomot and M. Cœurdassier for scientific discussions, D. Rieffel for his technical help in the field and N. Crini and J. Rouiller for MTE analysis. We also warmly thank J. Dat for improving the English. We are indebted to two anonymous referees for their helpful suggestions to improve the manuscript. This work was financially supported by ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, Paris 75737, project No. 963019) and by the Conseil Régional de Franche-Comté.

References

Anderson, T.J., Barrett, G.W., Clark, C.S., Elia, V.J., Majeti, V.A., 1982. Metal concentrations in tissues of meadow voles from sewage sludge-treated fields. Journal of Environmental Quality 11, 272–277.

Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Editions INRA, France.

Barker, G.M. (Ed.), 2001. The Biology of Terrestrial Molluscs. CABI Publishing, Oxon, UK.

Beeby, A., Eaves, S.L., 1983. Short-term changes in Ca, Pb, Zn and Cd concentrations of the garden snail *Helix aspersa* Müller from a central London car park. Environmental Pollution 30, 233–244.

Beeby, A., Richmond, L., 1998. Variation in the mineral composition of eggs of snail, *Helix aspersa* between populations exposed to different levels of metal contamination. Environmental Pollution 101, 25–31.

Bruce, L., McCraken, D., Foster, G., Aitken, M., 1999. The effects of sewage sludge on grassland euedaphic and hemiedaphic collembolan populations. Pedobiologia 43, 209–220.

Cain, A.J., 1983. Ecology and ecogenetics of terrestrial molluscan populations. In: Russell-Hunter, W.D. (Ed.), The Mollusca. Academic Press, London, pp. 597–647.

Dallinger, R., 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Dallinger, R., Rainbow, P. (Eds.), Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. Lewis, Boca Raton, FL, pp. 245–289.

Gomot, A., 1997. Dose-dependent 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., Pihan, F., 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. Chemosphere 40, 275–284.

Hegstrom, L.J., West, S.D., 1989. Heavy metal accumulation in small mammals following sewage sludge application to forests. Journal of Environmental Quality 18, 345–349.

Helmke, P.A., Robarge, W.P., Korotev, R.L., Schomberg, P.J., 1979. Effects of soil-applied sewage sludge on concentration of elements in earthworms. Journal of Environmental Quality 8, 322–327.

IFEN, 2001. Les données de l'environnement: sol – agriculture 63, 1–4.

Journal Officiel, 1997. Décret n°97–1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. Journal Officiel 286, 17822–17830.

Journal Officiel, 1998. Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n°97–1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. Journal Officiel 26, 1563–1571.

Knight, B.P., Chaudri, A.M., McGrath, S.P., Giller, K.E., 1998. Determination of chemical availability of cadmium and zinc in soils using inert soil moisture samplers. Environmental Pollution 99, 293–298.

Kramarz, P., 2000. Cadmium and zinc accumulation and its demographic effects in invertebrates. In: Kammenga, J.E., Laskowski, R. (Eds.), Demography in Ecotoxicology. J. Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 73–90.

Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996a. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail *Helix aspersa*: implications for predators. Environmental Pollution 91, 289–297.

Laskowski, R., Hopkin, S.P., 1996b. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). Ecotoxicology and Environmental Safety 34, 59–69.

Levine, M.B., Hall, A.T., Barrett, G.W., Taylor, D.H., 1989. Heavy metal concentrations during ten years of sludge treatment to an old-field community. Journal of Environmental Quality 18, 411–418.

Lock, K., Janssen, C.R., 2001. Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting bioavailability into account. Ecotoxicology 10, 315–322.

Ma, W.-C., 1982. The influence of soil properties and worm-related factors on the concentration of heavy metals in earthworms. Pedobiologia 24, 109–119.

Martinez, C.E., Motto, H.L., 2000. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. Environmental Pollution 107, 153–158.

McGrath, S.P., Knight, B., Killham, K., Preston, S., Paton, G.I., 1999. Assessment of the toxicity of metals in soils amended with sewage sludge using a chemical speciation technique and a lux-based biosensor. Environmental Toxicology and Chemistry 18, 659–663.

Merrington, G., Winder, L., Green, I., 1997a. The bioavailability of Cd and Zn from soils amended with sewage sludge to winter wheat and subsequently to grain aphid Sitobion avenae. The Science of the Total Environment 205, 245–254.

Merrington, G., Winder, L., Green, I., 1997b. The uptake of cadmium and zinc by the bird-cherry oat aphid *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) feeding on wheat grown on sewage sludge amended agricultural soil. Environmental Pollution 96, 111–114.

Milner, R.L., 1986. The Response of Birds to Potential Habitat Alteration and Heavy Metal Accumulation following Sewage Application in Douglas-fir Forests. MS Thesis, University of Washington, Seattle.

Pietz, R.I., Peterson, J.R., Prater, J.E., Zenz, D.R., 1984. Metal concentrations in earthworms from sewage sludge-amended soils at a strip mine reclamation site. Journal of Environmental Quality 13, 651–654.

Pihan, F., Gomot-deVaufleury, A., 2000. The snail as a target organism for the evaluation of industrial waste dump contamination and the efficiency of its remediation. Ecotoxicology and Environmental Safety 46, 137–147.

Römkens, P., 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.

Russell, L.K., DeHaven, J.I., Botts, R.P., 1981. Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 26, 634–640.

Sandifer, R.D., Hopkin, S.P., 1996. Effects of pH on the toxicity of cadmium, copper, lead and zinc to *Folsomia candida* Willem, 1902 (Collembola) in a standard laboratory test system. Chemosphere 33, 2475–2486.

Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A., Toussaint, M.-L., Badot, P.-M., 2002. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory beetle *Chrysocarabus* splendens. Chemosphere 48, 571–579.

Smith, G.J., Rongstad, O.J., 1982. Small mammal heavy metal concentrations from mined and control sites. Environmental Pollution 28, 121–134.

Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1997. Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research. WH Freeman and Company, New York.

Wade, S.E., Bache, C.A., Lisk, D.J., 1982. Cadmium accumulation by earthworms inhabiting municipal sludge-amended soil. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 28, 557–560.

World Health Organization, 1972. Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants Mercury, Lead and Cadmium. 16th Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Geneva, 4–12 April, WHO Technical Report Series, 505.

World Health Organization, 1983. Guidelines for Drinking Water Quality, Vol. I, Recommandations. WHO, Geneva.

Winder, L., Merrington, G., 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.

Section VII.

Tableau de synthèse des résultats

Polluant(s) étudié (s)	Section	Principaux résultats et interprétations
		Transfert [sol – escargot]
Cd	Section I.	- Première adaptation de la technique de dilution isotopique à un organisme animal - Les concentrations en Cd dans les tissus d'*H. aspersa* sont aussi importantes que celle du sol pollué après 14 jours d'exposition. - Le pool de Cd biodisponible pour *H. aspersa* exposé pendant 14 jours équivaut à 58% du Cd total du sol étudié, le pool labile ne représente que 50% du Cd total. - *H. aspersa* peut accéder au pool non-labile du Cd, jusqu'alors considéré comme non biodisponible, 16% du pool biodisponible pour *H. aspersa* provient du pool non-labile. → Le pool non-labile doit être considéré dans les démarches d'évaluation des risques liés à des sols pollués.
		Transfert [plante – escargot]
Cd	Section II.	- Les FBAs [plante (contaminée en simulant des dépôts de surface) – escargot] sont de 4,8 (témoin) à 2,4 (plus forte concentration testée, environ 200 $\mu g.g^{-1}$). - La croissance est diminuée de 50% à la plus forte consommation testée et la consommation est significativement affectée. → Les escargots sont macroconcentrateurs et peuvent représenter un vecteur important du transfert du Cd dans les chaînes alimentaires.
		Transfert [escargot – carabe]
Cd	Section III.	- Les concentrations les plus élevées dans les escargots (environ 250 $\mu g.g^{-1}$) n'entraînent pas de réduction de consommation chez les larves de carabes mais une mortalité de 31% survient lors de leur métamorphose. Les concentrations inférieures n'ont pas d'effets significatifs sur les cibles étudiées et dans les conditions de l'expérience. - Les concentrations en Cd sont dose-dépendantes dans les tissus des carabes mais toujours très faibles (< 1 $\mu g.g^{-1}$), le FBA [escargot – carabe] est de 0,002. → Les larves de carabes possèdent une très grande capacité de régulation du Cd. → L'exposition aux plus fortes doses entraîne toutefois une mortalité.

Tableau de synthèse des résultats (suite)**.**

Polluant(s) étudié(s)	Section	Principaux résultats et interprétations
Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Section IV.	- L'exposition en microcosme d'escargots juvéniles à un sol fortement multicontaminé et à la laitue poussée dans ce sol n'a pas d'effets sur la croissance des animaux au cours des 8 semaines d'exposition. - Les concentrations de Cd des laitues poussées sur sol pollué (SP) sont supérieures à celles des laitues poussées sur sol non pollué (SNP). C'est l'inverse pour le Cu, ce qui montre la phytodisponibilité de cet ETM dans le SNP, et pour le Ni, reflétant la richesse naturelle en Ni du SNP. - Les concentrations dans les laitues poussées sur SP augmentent au cours du temps, particulièrement pendant la montée en fleur. - Après 4 semaines d'exposition, les concentrations de Cd, Pb et Zn sont beaucoup plus élevées chez les animaux exposés au SP, les concentrations en Cu ne sont pas différentes et les concentrations en Ni sont inférieures. - Les cinétiques d'accumulation chez les escargots exposés au SP montrent une augmentation régulière des concentrations en Cd et en Zn, une augmentation rapide puis une stabilisation des concentrations en Pb, une stabilité des concentrations en Cu et une diminution des concentrations en Ni. - La contribution du sol dans l'accumulation totale du Cd est variable (de 40 à 2%). La contribution du sol dans l'accumulation du Zn et du Pb est respectivement 30 et 85%. → Parmi les ETM étudiés, le Cd, le Zn et le Pb sont biodisponibles dans le SP et fortement accumulés par les escargots. → La contribution du sol et des plantes est très différente en fonction de l'ETM considéré. Ces différences devraient être mieux étudiées chez les invertébrés du sol et prises en compte dans les procédures d'évaluation des risques. → Les microcosmes mis au point sont adaptés à l'étude au laboratoire des transferts sol – plant – invertébrés.

Tableau de synthèse des résultats (suite et fin).

Polluant(s) étudié(s)	Section	Principaux résultats et interprétations
Transfert [sol et/ou plante – escargot]		
Isoproturon	Section V.	- Après 4 semaines d'expérience, 40% des résidus de l'isoproturon sont non-extractibles dans les sols. Les analyses HPLC révèlent qu'environ 70% des résidus extractibles sont constitués par l'isoproturon native, 11% correspondent au monodéméthyl-isoproturon, le reste est constitué par d'autres résidus identifiés ou non. - Quatre semaines après l'application de l'isoproturon, la radioactivité dans les plantes est faible, les analyses HPLC suggèrent que les résidus extractibles sont composés de 20 à 45% d'isoproturon et de résidus non identifiés. - Un transfert d'isoproturon et/ou de ses résidus vers les escargots est clairement mis en évidence, principalement *via* le sol. Les activités dans les tissus des escargots sont 7 et 8 fois plus importantes lorsque le sol et le sol et la plante sont contaminés que lorsque seule la plante est contaminée. Environ 20% des résidus sont non extractibles. L'isoproturon est peu ou pas retrouvée dans les tissus des escargots, ce qui suggère une capacité importante des escargots à métaboliser cet herbicide. Les résidus sont constitués d'hydroxy-monodéméthyl-isoproturon et des métabolites non-identifiés.
Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Section VI.	- Une exposition d'escargots juvéniles à des sols forestiers amendés par des boues de station d'épuration n'entraîne pas d'effet sur la croissance des escargots sur 7 semaines d'expérience. - Une augmentation significative des concentrations en Zn (et dans une moindre mesure en Cd) est mesurée dans les tissus des escargots après 5 à 7 semaines d'exposition seulement. - Aucune tendance claire n'a été mise en évidence pour les autres ETM. → Parmi les 5 ETM étudiés, le Zn et le Cd sont les plus transférés. → Les escargots exposés en microcosmes *in situ* constituent de bons outils d'évaluation des transferts d'ETM dans les chaînes alimentaires.

Le présent travail repose principalement sur une approche pluridisciplinaire qui a permis d'étudier les transferts de polluants depuis le sol, réceptacle majeur des pollutions dans les écosystèmes terrestres, vers des producteurs primaires puis des consommateurs primaires et secondaires. Cette démarche doit compléter les nombreux travaux réalisés actuellement sur le devenir des polluants dans un compartiment ou sur leurs transferts entre deux compartiments seulement. Le manque de données concernant les transferts en milieu terrestre est flagrant par rapport aux travaux réalisés en milieu aquatique (Moriarty 1999) et se traduit par l'absence de tests écotoxicologiques plurispécifiques pour les milieux terrestres (AFNOR 1994). Ainsi, Janssen *et al.* (1993) soulignaient dans un article de synthèse sur la biomagnification que les tests écotoxicologiques monospécifiques ont été largement développés pour étudier la toxicité directe des polluants alors que les effets de l'empoisonnement secondaire résultant du transfert dans les chaînes alimentaires ont le plus souvent été négligés.

La large place accordée à l'étude de la biodisponibilité dans nos travaux vise également à combler des lacunes identifiées, d'une part sur le plan scientifique, puisque le concept de biodisponibilité et les méthodes d'évaluation sont encore discutées, mais également sur le plan réglementaire, puisque les propositions les plus récentes des commissions de normalisation sont encore basées sur des approches purement chimiques (Harmsen *et al.* 2001), pourtant largement critiquées ces dernières années.

Dans ce contexte, les objectifs de la thèse étaient :

- d'évaluer la biodisponibilité des ETM et d'un composé organique, l'herbicide isoproturon, dans les transferts sol – animal, d'une part, mais également dans les transferts plante – animal ou animal – animal (relations proie – prédateur),
- d'évaluer le transfert des polluants d'un maillon à l'autre et les effets résultant de ce transfert,
- de préciser l'importance relative des sources de transfert des polluants entre les différents maillons d'un réseau trophique.

Les principaux résultats obtenus, synthétisés dans le Tableau de synthèse des résultats (Section VII), soulèvent donc deux axes majeurs de discussion qui concernent l'importance de la biodisponibilité des polluants dans leurs transferts et l'importance de ces transferts et de leurs effets dans les chaînes alimentaires.

De ces deux axes de discussion émergent un certain nombre de perspectives qui tendent à améliorer l'évaluation de la biodisponibilité des polluants et l'étude de leurs transferts.

Axe 1. Importance de la biodisponibilité des polluants

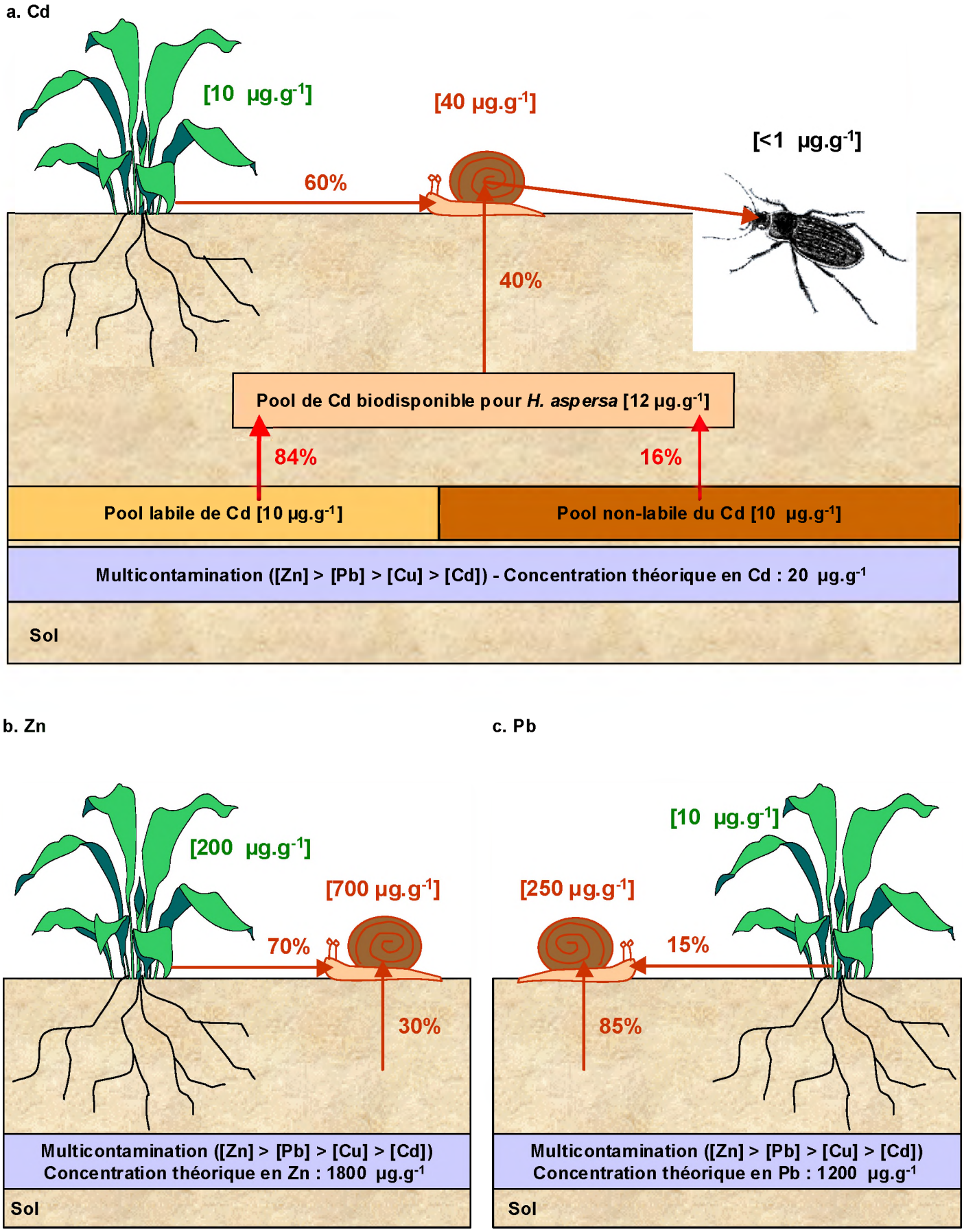
Biodisponibilité des polluants dans les sols

L'évaluation de la biodisponibilité des polluants dans les sols est basée, la plupart du temps, sur des techniques d'extraction chimiques. Beaucoup de règlementations ne prennent en compte que les concentrations totales (c'est à dire les concentrations obtenues par des extractants très puissants, susceptibles de mettre en solution la quasi-totalité du polluant). Les plus récentes se basent sur des extractions plus modérées, sensées mieux représenter les pools réellement biodisponibles. L'approche de la biodisponibilité a été améliorée grâce à la théorie de partition à l'équilibre (TPE) qui stipule que les polluants présents dans la phase liquide du sol sont biodisponibles et qu'un équilibre cinétique existe entre cette phase liquide et la phase solide (Peijnenburg *et al.* 1999; Spurgeon 1997). Pour les ETM, l'évaluation de la phytodisponibilité a été encore améliorée par l'utilisation des techniques de dilution isotopique, qui permettent d'évaluer pour chaque sol la taille du pool phytodisponible (pool labile) en fonction du temps, ce qui représente une innovation majeure.

Nos résultats, basés sur la technique de dilution isotopique appliquée à *H. aspersa* , montrent que 16% du pool de Cd biodisponible pour l'escargot *H. aspersa* proviennent du pool non-labile (Section I, Figure 1). Cet organisme a accès au pool non labile, considéré jusqu'à présent comme non biodisponible. Les procédures d'évaluation des risques basées sur la TPE ou sur l'évaluation du pool labile sous-estimeraient donc significativement la biodisponibilité du Cd pour *H. aspersa*.

Cette espèce a un contact cutané direct avec le sol au niveau de la sole pédieuse et consomme une proportion variable mais significative de sol dans son régime alimentaire (Chevalier *et al.* 2001). La mobilisation d'ETM considéré(s) précédemment dans la littérature comme non-biodisponible(s) peut s'expliquer par les caractéristiques du système digestif des gastéropodes (Dimitriadis 2001) et par l'aptitude de certaines cellules digestives et cutanées à l'endocytose (Simkiss et Mason 1983). Cependant, les caractéristiques biologiques de nombreux autres invertébrés terrestres suggèrent qu'ils pourraient également avoir accès au pool non labile des ETM dans les sols, soit par la voie cutanée, soit par la voie digestive, soit par une conjonction des deux voies. En effet, l'ensemble des invertébrés terrestres est en contact étroit avec le sol, soit pendant une phase de leur développement (larves de carabes par exemple), soit pendant l'ensemble de leur cycle biologique (collemboles ou annélides par exemple). Beaucoup d'invertébrés ingèrent également une proportion variable de sol, soit volontairement (annélides), soit par ingestion accidentelle de particules de sol lors de leur prise de nourriture.

Figure 1. Schémas théoriques intégrant la biodisponibilité et les transferts de Cd, de Pb et de Zn dans un réseau trophique sol - plante - invertébrés. Ce schéma est basé sur les données expérimentales des Résultats I, III et IV. Les flèches représentent le transfert sans distinguer la ou les voies impliquées (digestive, cutanée, respiratoire). Les % associés aux flèches représentent la contribution de la source d'où part la flèche dans la concentration du compartiment où arrive la flèche.



Un parallèle peut-être fait entre la biodisponibilité des ETM et celle des polluants organiques. En effet, l'évaluation de la biodisponibilité des polluants organiques repose également sur des extractions chimiques et sur la TPE. Comme pour les ETM, seuls les pools extractibles ont été considérés biodisponibles. Pourtant, des études récentes sur les résidus non-extractibles montrent que ceux-ci peuvent être biodisponibles pour des plantes supérieures (Gevao *et al.* 2000) et pour des annélides (Gevao *et al.* 2001). Nos travaux concernant l'isoproturon (Section V), ont clairement mis en évidence le transfert de cet herbicide et/ou des ses métabolites depuis le sol vers les escargots. L'important FBA calculé suggère que les escargots ont pu avoir accès aux résidus non extractibles.

Biodisponibilité des ETM contenus dans les tissus des plantes et des animaux

La biodisponibilité des ETM contenus dans les tissus végétaux est à notre connaissance beaucoup moins étudiée que celle des ETM présents dans les sols. Au cours de ce travail, nous avons examiné le transfert plante – escargot dans deux cas de figures complémentaires (Sections II et IV). Dans un cas (Section II), nous avons démontré que le Cd déposé sur la surface des feuilles de colza (simulant un dépôt atmosphérique) est disponible pour les escargots, les concentrations dans leurs tissus augmentant de manière dose-dépendante. Dans l'autre cas (Section IV), le Cd (ainsi que le Zn) intégré dans les organes aériens de la laitue (après absorption par voie racinaire et translocation) est disponible pour *H. aspersa*.

Dans cette dernière expérience, la valeur du FBA obtenu dans les tissus des escargots est de 2 pour une concentration de 13 $\mu g.g^{-1}$ dans la laitue et pour une exposition de 4 semaines. Dans l'autre expérience (Section II), le FBA obtenu dans les escargots pour la concentration la plus proche dans le colza (38 $\mu g.g^{-1}$) est de 4, suggérant que le Cd déposé en surface serait plus biodisponible que le Cd intégré dans les tissus. Ces résultats montrent l'importance de la nature de la contamination (formes de stockage notamment) dans le transfert vers les organismes.

Les résultats obtenus dans le transfert escargot – carabe (Section III) montrent que le Cd intégré dans les tissus d'*H. aspersa* est biodisponible pour le prédateur (conduisant à une augmentation de ses concentrations internes et aux effets observés). Le Cd stocké dans les organes d'*H. aspersa* est majoritairement lié à des métallothionéines (Cooke *et al.* 1979), protéines solubles donc considérées comme facilement digérables par les prédateurs (Laskowski et Hopkin 1996). Dans des réseaux trophiques terrestres, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour améliorer la connaissance de l'importance de la forme de stockage dans les transferts proie – prédateur, comme cela a été fait pour des espèces marines (Wallace et Lopez 1995).

Perspectives : comment améliorer l'évaluation de la biodisponibilité ?

La technique de dilution isotopique nous semble la plus pertinente (parmi celles qui existent actuellement) pour estimer la biodisponibilité des ETM. L'innovation représentée par l'application de cette technique à l'évaluation de la zoodisponibilité ouvre la voie à de nombreux travaux.

Il paraît fondamental de vérifier si d'autres groupes d'invertébrés du sol peuvent avoir accès aux pools non-labiles. Si cette hypothèse se vérifie, la quantification de la contribution du pool non-labile dans le pool biodisponible pour les différents groupes permettra d'améliorer l'évaluation du risque pour les invertébrés terrestres. L'extension d'études similaires à d'autres ETM que le Cd est également souhaitable. Le Zn, notamment, possède une mobilité importante et un comportement physico-chimique dans les sols proche de celui du Cd. Cet ETM est identifié comme un des plus préoccupants pour l'environnement (en raison des quantités importantes émises) et devrait être étudié en priorité. Le Pb devrait également être étudié car, bien qu'il soit moins mobile que le Cd, nos résultats montrent qu'il est rapidement accumulé par *H. aspersa* et que la source de ce transfert est principalement le sol (Section IV). L'apparente contradiction entre la faible mobilité (disponibilité environnementale) et la biodisponibilité de cet ETM suggère que la mobilisation par *H. aspersa* du Pb présent dans la phase solide du sol pourrait être importante. Les voies de transfert (digestive ou cutanée) et les mécanismes impliqués dans l'absorption de cet ETM par les escargots mériteraient d'être étudiés de façon plus approfondie.

Ces perspectives revêtent une grande importance en terme de recherche fondamentale, d'une part, mais également en terme d'application en évaluation des risques. En effet, l'objectif majeur de l'étude de la biodisponibilité (et des études écotoxicologiques au sens large) est de parvenir à la prévision du pool biodisponible dans les sols. Les techniques de dilution isotopique apportent, à notre avis, la meilleure évaluation de la disponibilité environnementale des ETM en prenant intrinsèquement en compte sa dimension cinétique. Il a été démontré pour de nombreuses espèces de plantes que le pool labile estimait le mieux le pool phytodisponible. L'expérience réalisée sur *H. aspersa* montre cependant que le pool labile sous-estime le pool réellement biodisponible pour cette espèce. Les questions qui se posent alors pour améliorer l'évaluation de la zoodisponibilité sont :

Peut-on établir des relations mathématiques liant la valeur du pool labile à la valeur du pool réellement zoodisponible ?

Si oui, peut-on utiliser ces relations pour évaluer le pool zoodisponible, à partir d'une expérience d'échange isotopique réalisée sur le sol dont on veut évaluer le risque ?

Un certain nombre de difficultés, rencontrées par les précédents essais de généralisation de l'évaluation de la biodisponibilité, seront sans doute rencontrées (notamment importantes variabilités interspécifique et entre sols en fonction de leurs propriétés physico-chimiques et de leur degré de pollution). Malgré ces difficultés prévisibles, l'enjeu majeur représenté par

l'amélioration de l'évaluation de la biodisponibilité des ETM justifie, à notre avis, l'investissement scientifique à réaliser dans ce type d'études.

Par ailleurs, le développement des techniques d'ICP-MS qui permettent de doser des isotopes stables pourrait constituer une amélioration majeure de la technique de dilution isotopique. Des isotopes stables du Cd (^{110}Cd et ^{111}Cd) ont récemment été utilisés pour évaluer sa disponibilité environnementale grâce à une technique de dilution isotopique (Ahnstrom et Parker 2001). L'avantage des isotopes stables et de leur dosage par ICP-MS réside dans la très grande sensibilité de cette technique qui permet de mesurer directement la composition isotopique (CI) des sols, même pour des périodes longues. La mesure directe de la CI constituerait un avantage certain par rapport à l'extrapolation des résultats des expériences de cinétiques d'échange isotopique de court terme à l'aide d'un modèle mathématique, et ce quelle que soit la validité du modèle mathématique.

Axe 2. Importance du transfert des polluants dans les chaînes alimentaires

Détermination de la part respective des sources de transfert

Les résultats apportés par les diverses expériences permettent de proposer un schéma théorique des transferts du Cd, du Pb et du Zn dans la chaîne alimentaire que nous avons étudiée (Figure 1). Pour les trois ETM, la contribution du sol dans la contamination totale des organismes est loin d'être négligeable. Elle est même très majoritaire (85%) pour le Pb. La détermination des différentes sources et voies d'exposition est souvent complexe mais elle est en général connue (Suter II 1993). Par exemple, il est aisé de déterminer qu'un mollusque gastéropode pulmoné peut être exposé aux polluants atmosphériques (voie respiratoire) et aux polluants présents dans les sols et les plantes (voies digestive et cutanée). La détermination quantitative des transferts à partir des différentes sources d'exposition identifiées est en revanche beaucoup plus difficile. Nos données sont donc originales car une seule étude, à notre connaissance, a porté sur la quantification de la contribution des différentes sources dans le transfert des polluants chez les invertébrés terrestres (Bruus Pedersen *et al.* 2000).

Nos résultats montrent que chacune des sources de transfert vers l'escargot est quantitativement importante (Section IV). Il convient donc de ne négliger aucune de ses sources dans les procédures d'évaluation des risques.

L'important transfert sol – escargot mis en évidence pour l'herbicide isoproturon confirme l'intérêt des études visant à quantifier la contribution relative des différentes sources de transfert. Dans le cas des polluants organiques en général, et particulièrement dans le cas d'épandage de pesticides où une forte volatilisation initiale a lieu (Schroll *et al.* 1999), l'atmosphère pourrait constituer une troisième source de transfert à ne pas négliger.

L'importance de cette source de pollution chez *H. aspersa* a été démontrée pour un hydrocarbure polycyclique aromatique, le naphtalène, qui entraîne un effet significatif sur l'activité de plusieurs enzymes impliquées dans la métabolisation des composés organiques (Ismert *et al.* 2002).

Les données acquises dans cette thèse, complétées par des données sur la contribution de l'atmosphère dans les transferts des polluants vers *H. aspersa*, permettraient d'envisager la conception d'un modèle général prenant en compte l'ensemble des sources de transfert.

La biomagnification : un concept dépassé ?

La biomagnification a surtout été observée dans les écosystèmes aquatiques où les chaînes alimentaires sont en général plus longues et où les organismes sont en contact plus direct avec le polluant dans le milieu (Moriarty 1999). Malgré les résultats contradictoires des études concernant les milieux terrestres, la biomagnification a été considérée comme une règle générale. Ainsi, Collier *et al.* (1973) suggèrent que "...le processus de concentration biologique ou de biomagnification des substances est une propriété générale des chaînes alimentaires...". Les résultats de nombreuses études ont démenti cette généralisation (Laskowski 1991). Plusieurs biais ont conduit à interpréter les concentrations supérieures dans un maillon d'une chaîne alimentaire par rapport à celles mesurées dans un maillon inférieur comme un exemple du phénomène de biomagnification (Janssen *et al.* 1993) :

- La composition exacte du régime alimentaire et les concentrations de chaque composant ne sont que rarement considérées, ces données étant souvent très difficiles à obtenir dans les études de terrain (Beyer 1986; Van Straalen et Ernst 1991).

- Les organismes sont souvent placés dans un seul niveau trophique alors que leur régime alimentaire les place plutôt dans plusieurs niveaux trophiques (Rabitsch 1994).

- Certaines études sont basées sur la mesure de la concentration d'une espèce jugée représentative d'un niveau trophique. Les conclusions basées sur de telles études peuvent être largement biaisées dans la mesure où les différences de concentrations interspécifiques au sein d'un même niveau trophique peuvent être beaucoup plus grandes qu'entre niveaux trophiques (Laskowski 1991).

- Inversement, certains travaux sont basés sur la concentration moyenne de tous les individus des différentes espèces appartenant à un niveau trophique (Price *et al.* 1974). L'abondance d'une espèce faiblement ou fortement bioaccumulatrice peut modifier considérablement la concentration estimée pour la biomasse totale.

- L'ensemble des paramètres de variabilité des concentrations dans les organismes n'est en général pas considéré. Ces paramètres peuvent être l'âge (Fagerström 1991), le stade de développement ou les variations saisonnières (Greville et Morgan 1989b).

- Une autre approche a consisté à ne mesurer les concentrations que dans des tissus particuliers (des organes-cibles tels que le foie) de l'organisme consommateur. Or, ces

organes-cibles étant souvent particulièrement accumulateurs, leur concentration surestime largement la concentration moyenne dans l'ensemble de l'organisme. Inversement, considérer la concentration moyenne dans la proie (ou la plante consommée) n'est valide que si le consommateur ingère bien l'ensemble de la proie.

Enfin, et c'est peut-être le paramètre le plus important à considérer, la biomagnification, et les transferts dans les chaînes alimentaires en général, devraient idéalement être appréhendés en terme de flux alors que les données sont souvent analysées seulement en terme de comparaison de concentration. Cette remarque a été formulée par Laskowski (1991) qui a formalisé mathématiquement le calcul d'un facteur de biomagnification (B), tel qu'il devrait être effectué avant d'interpréter un transfert comme une biomagnification :

$$B = \frac{\sum_i \left(C_{n.i} \times w_{n.i}\right) \times \sum_j w_{n-1.j}}{\sum_j \left(C_{n-1.j} \times w_{n-1.i}\right) \times \sum_i w_{n.i}}$$

Avec :

- C_n, la concentration d'un polluant dans le corps entier de l'organisme de niveau trophique *n*
- w_n, la masse sèche de l'organisme de niveau *n*.
- C_{n-1}, la concentration du polluant dans le corps entier de l'organisme de niveau trophique *n-1*
- w_{n-1} et la masse sèche de l'organisme de niveau *n-1*.

L'ensemble des études analysées dans la synthèse bibliographique, confirmées par nos résultats (Section III), montre clairement que le phénomène de biomagnification (dans son acception classique : une augmentation des concentrations avec le niveau trophique) n'est pas une généralité. Ce n'est qu'un des nombreux phénomènes qui peuvent survenir lors d'un transfert de polluants entre 2 maillons d'une chaîne alimentaire.

Les transferts dans les chaînes alimentaires sont-ils responsables d'effets délétères ?

Bien que cela n'ait pas constitué l'objectif principal de nos travaux, l'évaluation des effets potentiels des transferts de polluants a été réalisée dans chacune des expériences. Dans 4 d'entre elles (Sections I, IV, V et VI), aucun effet sur la croissance n'a été mis en évidence chez des juvéniles d'*H. aspersa* pour des expositions de 4 à 8 semaines. Les sols utilisés dans les expériences présentées dans les articles 1 et 5 proviennent pourtant de sites fortement pollués par au moins 3 ETM : le Cd, le Pb et le Zn. Ces résultats confirment la grande tolérance des mollusques gastéropodes à l'intoxication par les ETM.

Des effets délétères ont été observés chez *H. aspersa* et chez un de ses prédateurs, *C. splendens* (respectivement Sections II et III). Cependant, ces effets se sont manifestés aux plus fortes concentrations testées, qui ne sont rencontrées que dans des sites extrêmement pollués. Ces résultats sont en accord avec les études réalisées dans des zones industrielles ou minières très fortement polluées. Dans ces sites, les effets sont spectaculaires avec une disparition complète de plusieurs espèces voire de plusieurs groupes taxonomiques (les annélides à Avonmouth, par exemple, Hopkin (1989)). Ces effets individuels et populationnels sont alors accompagnés d'effets à l'échelle écosystémique au niveau des flux de matières par exemple. Ainsi, dans la plupart de ces sites, une épaisse couche de matière organique non dégradée atteste de la disparition des décomposeurs et du dysfonctionnement trophique de l'écosystème.

Dans les sites plus modérément pollués, la littérature montre que les concentrations en ETM rencontrées ne provoquent pas d'effets létaux ou sublétaux chez les invertébrés terrestres étudiés. Nos expériences en laboratoire sur *H. aspersa* et *C. splendens* vont dans ce sens. Il faut cependant apporter quelques réserves quant à la capacité des études actuelles à déterminer l'impact d'un polluant sur des paramètres plus difficilement mesurables que ceux habituellement étudiés et/ou à des niveaux supérieurs d'organisation biologique (niveaux populationnel, communautaire et écosystémique). La plupart des études de laboratoire sont menées en conditions contrôlées, *a priori* plus favorables que les conditions de terrain. De plus, les tests sont la plupart du temps monospécifiques et basés sur des paramètres individuels simples à mesurer. Ces tests négligent donc les interactions inter-spécifiques qui ont pourtant une importance considérable dans le fonctionnement des écosystèmes.

Perspectives :

Comment améliorer l'évaluation des transferts de polluants dans les chaînes alimentaires ?

Sur le plan fondamental comme dans une perspective appliquée d'évaluation du risque, il est maintenant nécessaire d'acquérir plus de données sur les transferts de polluants (1) dans le cadre d'expériences de laboratoire qui permettent des quantifications extrêmement précises des flux mais également (2) dans le cadre d'études de terrain qui seules permettent de prendre en compte les variations des paramètres environnementaux.

Les microcosmes mis au point et utilisés au cours de nos travaux constituent un outil simple et efficace qui permet de travailler au laboratoire et *in situ* sur des réseaux trophiques simplifiés mais relativement représentatifs. En complément des travaux réalisés au cours de la thèse (Section IV), il est envisageable de modifier la composition des réseaux trophiques étudiés. La taille des microcosmes élaborés permet en effet d'utiliser des microarthropodes

(collemboles ou isopodes, par exemple) et des macroorganismes autres que l'escargot (notamment des annélides ou des prédateurs tels que les carabes). Une perspective intéressante mais à plus long terme serait d'améliorer le système mis au point pour suivre de manière beaucoup plus précises les flux de matière (polluants mais également le carbone ou l'azote, par exemple).

Sur le terrain, l'amélioration de l'évaluation des transferts est subordonnée, d'une manière générale, à une meilleure connaissance de la biologie au sens large des organismes considérés. Parmi les perspectives découlant de nos travaux, des études en microcosmes (Section VI) pourraient être poursuivies pour l'étude des transferts d'autres polluants. Sur la base des expériences réalisées sur l'isoproturon (en conditions semi-naturelles, Section V), il serait particulièrement intéressant d'étudier les transferts de polluants organiques persistants (polychlorodibenzo-*p*-dioxines, polychlorobiphényls).

Comment améliorer l'étude des effets des transferts des polluants ?

L'évaluation de l'effet d'un polluant sur un écosystème et les biocénoses est beaucoup plus complexe que la simple évaluation de l'effet individuel. Moriarty (1999) souligne que "La preuve qu'un polluant tue des individus n'implique pas que la population est affectée. Inversement, un polluant qui ne tue aucun individu mais a des effets sublétaux sur une proportion significative d'individus peut exercer un effet sévère sur une population.". Dans ce contexte, les efforts devront probablement porter sur les effets difficilement perceptibles des transferts des polluants dans les réseaux trophiques. Un exemple de tels effets a certainement été observé dans l'expérience de transfert escargot – carabe (Section III). En effet, la diminution de la masse des escargots exposés à des fortes concentrations de Cd dans leur nourriture a contraint le prédateur a augmenter son effort de prédation (reflété par le plus grand nombre d'escargots consommés). Ce type d'effet indirect pourrait avoir une influence sur la valeur adaptative (fitness) des individus exposés (1) en empêchant les animaux de consacrer le coût énergétique alloué à l'effort supplémentaire de prédation à une autre fonction telle que la reproduction et/ou (2) en les exposant plus longtemps à leurs prédateurs. Un autre aspect des effets indirects des polluants sur l'allocation optimale de l'énergie réside dans le coût lié à la détoxication des substances ingérées. La détoxication peut porter soit sur l'excrétion des polluants ingérés (stratégie adoptée par le carabe *C. splendens*) soit sur l'inactivation des polluants absorbés (sous forme de métallothionéines et/ou de granules, stragégie d'*H. aspersa*). Les études s'intéressant au coût de la tolérance aux polluants sont relativement récentes et suscitent de vives polémiques car les résultats expérimentaux sont contradictoires (Janczur *et al.* 2000; Van Straalen et Hoffmann 2000).

La réalisation de cette thèse a impliqué une démarche résolument pluridisciplinaire qui a permis l'étude du devenir de polluants organiques et métalliques dans les sols, de leur biodisponibilité et de leur transfert dans des réseaux trophiques. L'apprentissage des concepts et l'acquisition des compétences nécessaires à ces travaux ont pu se faire grâce à la constitution d'un réseau de collaborations nationales et internationales. Nos travaux, s'ils n'ont pas la prétention d'avoir répondu aux très nombreuses questions posées par les transferts des polluants dans les écosystèmes terrestres, ont fourni des données fondamentales originales et suscitent de nombreuses pistes de recherche. Ils ont également permis, en accord avec le projet initial, de proposer un certain nombre de techniques et d'outils (dilution isotopique appliquée à la zoodisponibilité, microcosmes en laboratoire et in situ), dont certains pourraient être standardisés et utilisés pour l'évaluation des risques. Sur la base de ces différents points (pluridisciplinarité, réseau de collaborations, résultats fondamentaux et propositions d'application), nous espèrons avoir répondu aux objectifs ambitieux fixés initialement et aux attentes des différents partenaires de ce travail (ADEME, Conseil Régional de Franche-Comté).

Abdul Rida, A. M. M., et Bouché, M. B. (1997). Heavy metal linkages with mineral, organic and living soil compartments. *Soil. Biol. Biochem.* **29**, 649-655.

AFNOR (1994). *Recueil de normes françaises, Qualité des sols*. AFNOR (Association Française de Normalisation), Paris, France.

Ahnstrom, Z. A. S., et Parker, D. R. (2001). Cadmium reactivity in metal-contaminated soils using a coupled stable isotope dilution - sequential extraction procedure. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 121-126.

Alberici, T. M., Sopper, W. E., Storm, G. L., et Yahner, R. H. (1989). Trace metals in soil, vegetation, and voles from mine land treated with sewage sludge. *J. Environ. Qual.* **18**, 115-120.

Alexander, M. (1995). How toxic are toxic chemicals in soil ? *Environ. Sci. Technol.* **29**, 2713-2717.

Alloway, B. J., Ed. (1995) Heavy metals in soils, pp 368. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK.

Almas, A. R., Salbu, B., et Singh, B. R. (2000). Changes in partitioning of cadmium-109 and zinc-65 in soil as affected by organic matter addition and temperature. *Soil Sc. Soc. Am. J.* **64**, 1951-1958.

Almas, A. R., Singh, B. R., et Salbu, B. (1999). Mobility of cadmium-109 and zinc-65 in soil influenced by equilibration time, temperature, and organic matter. *J. Environ. Qual.* **28**, 1742-1750.

Alvim Ferraz, M. C. M., et Lourenço, J. C. N. (2000). The influence of organic matter content of contaminated soils on the leaching rate of heavy metals. *Environ. Prog.* **19**, 53-57.

Andrews, S. M., Johnson, M. S., et Cooke, J. A. (1984). Cadmium in small mammals from grassland established on metalliferous mina waste. *Environ. Pollut.* **33A**, 153-162.

Bayley, M., Baatrup, E., Heimbach, U. et Bjerregaard, P. (1995). Elevated copper levels during larval development cause altered locomotor behavior in the adult carabid beetle *Pterostichus cupreus* L. (Coleoptera: Carabidae). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **32**, 166-170.

Beeby, A. (1985). The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfer of lead trough a polluted ecosystem. *J. Appl. Ecol.* **22**, 267-275.

Beeby, A., et Eaves, S. L. (1983). Short-term changes in Ca, Pb, Zn and Cd concentrations of the garden snail *Helix aspersa* Müller from a central London car park. *Environ. Pollut.* **30**, 233-244.

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. *Environ. Sc. Pollut. Res.* **2**, 5-15.

Belfroid, A., Sijm, D., et Van Gestel, C. A. M. (1996). Bioavailability and toxicokinetics of hydrophobic aromatic compounds in benthic and terrestrial invertebrates. *Environ. Rev.* **4**, 276-299.

Belfroid, A. C. (1994). *Toxicokinetics of hydrophobic chemicals in earthworms*. PhD thesis, University of Utrecht, Utrecht.

Bengtsson, G. (1986) The optimal use of life strategies in transitional zones or the optimal use of transition zones to describe life strategies. In Proceedings of the Third European Congress of Entomology (Ed H. H. W. Velthuis), pp. 193-207. Nederlandse Entomologische Vereniging, Amsterdam.

Bengtsson, G., Gunnarsson, T., et Rundgren, S. (1986). Effects of metal pollution on the earthworm *Dendrobaena rubida* (Sav.) in acidified soils. *W.A.S.P.* **28**, 361-383.

Bengtsson, G., et Rundgren, S. (1992). Seasonal variation of lead uptake in the earthworm *Lumbricus terrestris* and the influence of soil liming and acidification. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **23**, 198-205.

Berger, B., et Dallinger, R. (1993). Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environ. Monit. Assess.* **25**, 65-84.

Berny, P. J., Buronfosse, T., Buronfosse, F., Lamarque, F., et Lorgue, G. (1997). Field evidence of secondary poisoning of foxes (*Vulpe vulpes*) and Buzzards (*Buteo buteo*) by bromadiolone, a 4-year survey. *Chemosphere*. **35**, 1817-1829.

Beyer, W. N. (1986). A reexamination of biomagnification of metals in terrestrial food chains. *Environ. Toxicol. chem.* **5**, 863-864.

Beyer, W. N., et Cromartie, J. (1985). A survey of Pb, Zn, Cd, Cr, As and Se in earthworms and soil from diverse sites. *Environ. Monitor. Assess.* **8**, 27-36.

Beyer, W. N., Hensler, G., et Moore, J. (1987). Relation of pH and other soil variables to concentrations of Pb, Cu, Zn, Cd and Se in earthworms. *Pedobiologia* **30**, 167-172.

Beyer, W. N., Pattee, O. H., Sileo, L., Hoffman, D. J., et Mulhern, B. M. (1985). Metal contamination in wildlife living near two zinc smelters. *Environ. Pollut.* **38**, 63-86.

Bobillier-Chaumont, S. (1998). *Evolution des concentrations tissulaires de Metallothioneine chez le rat spontanément hypertendu (SHR) entraîné à la nage*. Thèse de Doctorat de Pharmacie, Université de Franche-Comté, Besançon.

Bonnefoy-Claudet, R., et Deray, A. (1984). Modalités de reproduction de l'escargot *Helix aspersa maxima* en fonction de la photophase ; comparaison avec *Helix aspersa aspersa*. *Haliotis* **16**, 69-75.

Brun, L. A., Maillet, J., Richarte, J., Herrmann, P., et Remy, J. C. (1998). Relationships between extractable copper, soil properties and copper uptake by wild plants in vineyard soils. *Environ. Pollut.* **102**, 151-161.

Bruus Pedersen, M., Temminghoff, E. J. M., Marinussen, M. P. J. C., Elmegaard, N., et Van Gestel, C. A. M. (1997). Copper accumulation and fitness of *Folsomia candida* Willem in a

copper contaminated sandy soil as affected by pH and soil moisture. *Appl. Soil Ecol.* **6**, 135-146.

Bruus Pedersen, M., et Van Gestel, C. A. M. (2001). Toxicity of copper to the collembolan *Folsomia fimetaria* in relation to the age of soil contamination. *Ecotox. Environ. Saf.* **49**, 54-59.

Bruus Pedersen, M., Van Gestel, C. A. M., et Elmegaard, N. (2000). Effects of copper on reproduction of two collembolan species exposed through soil, food, and water. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2579-2588.

Bundy, J. G., Wardell, J., Campbell, C. D., Killham, K., et Paton, G. I. (1997). Application of bioluminescence-based microbial biosensors to the ecotoxicity assessment of organotins. *Lett. Appl. Microbiol.* **25**, 353-358.

Calow, P. (1998). General principles and overview. In *Handbook of ecotoxicology* (Ed P. Calow), pp. 1-6. Blackwell Science, Oxford.

Carpene, E. (1993). Metallothionein in marine molluscs. In *Ecotoxicology of metals in invertebrates* (Eds R. Dallinger, et R. Rainbow), pp. 55-72. Lewis, Boca Raton.

CEE (2000). Règlement (CE) n°2364/2000 de la Commission du 25 octobre 2000 concernant la quatrième liste de substances prioritaires, conformément au réglement (CEE) n793/93 du Conseil (texte présentant de l'intérêt pour l'EEE). *Journal Officiel* **L 273**, 5-7.

Cerniglia, C. E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* **3**, 351-368.

Chevalier, L. (2001). *Facteurs influençant la composition du régime alimentaire de l'escargot Petit-gris Helix aspersa Müller (gastéropode terrestre)*, Thèse de Doctorat, Université de Rennes I, Rennes.

Chevalier, L., Desbuquois, C., Le Lannic, J., et Charrier, M. (2001). Poaceae in the natural diet of the snail *Helix aspersa* Müller (Gastropoda, Pulmonata). *C.R. Acad. Sc. Paris* **324**, 979-887.

Chevallier, H. (1982). Facteurs de croissance chez des gastéropodes pulmonés terrestres paléarctiques en élevage. *Haliotis* **12**, 29-46.

Chevallier, H. (1992). *L'élevage des escargots. Production et préparation du petit-gris.* Edition du point vétérinaire, Maison-Alfort.

Chlopecka, A., Bacon, J. R., Wilson, M. J., et Kay, J. (1996). Forms of cadmium, lead, and zinc in contaminated soils from Southwest Poland. *J. Environ. Qual.* **25**, 69-79.

Cobbett, C. S. (2000). Phytochelatins and their role in heavy metal detoxification. *Plant Physiol.* **123**, 825-832.

Coeurdassier, M., Gomot-deVaufleury, A., et Badot, P.-M. (2000). Dose-dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in land snail *Helix aspersa aspersa*. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2571-2578.

Collier, B. D., Cox, G. W., Johnson, A. W., et Miller, P. C. (1973). *Dynamic Ecology*. Prentice-Hall, Engelwood Clifs, NJ.

Cooke, A. S., Greig-Smith, P. W., et Jones, S. A. (1992). Consequence for vertebrate wildlife of toxic residues in earthworms prey. In *Ecotoxicology of Earthworms* (Eds P. W. Greig-Smith, H. Becker, P. J. Edwards, et F. Heimbach), pp. 139-155. Intercept, Andover.

Cooke, M., Jackson, A., Nickless, G., et Roberts, D. J. (1979). Distribution and speciation of cadmium in the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **23**, 445-451.

Corey, R. B., King, L. D., Lue-Hing, C., Fanning, D. S., Street, J. J., et Walker, J. M. (1987). Effects of sludge properties on accumulation of trace elements by crops. In *Land Application of Sludge* (Ed A. L. Page), pp. 25-51. Lewis Publishers, Chelsea, MI.

Cornelissen, G., Rigterink, H., Ferdinandy, M. M. A., et Van Noort, P. C. M. (1998). Rapidly desorbing fractions of PAHs in contaminated sediments as a predictor of the extent of bioremediation. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 966-970.

Cornelissen, G., Van Noort, P. C. M., et Grovers, H. A. J. (1997). Desorption kinetics of chlorobenzenes, polycyclic aromatic hydrocarbons, and polychlorinated biphenyls: sediment extraction with tenax and effects of contact time and solute hydrophobicity. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1351-1357.

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.

Coughtrey, P. J., et Martin, M. H. (1977). The uptake of Lead, Zinc, Cadmium, Copper by pulmonate mollusc, *Helix aspersa* Müller, and its relevance to the monitoring of heavy metal contamination of environment. *Oecologia* **27**, 65-74.

Crommentuijn, T., Doornekamp, A., et Van Gestel, C. A. M. (1997). Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Appl. Soil Ecol.* **5**, 261-271.

Dallinger, R. (1993). Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In *Ecotoxicology of metals in invertebrates* (Eds R. Dallinger, et R. Rainbow), pp. 245-289. Lewis, Boca Raton.

Dallinger, R., et Wieser, W. (1984). Molecular fractionation of Zn, Cu, Cd and Pb in the midgut gland of *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **79C**, 125-129.

Dallinger, R., Berger, B., Gruber, C., Hunziker, P., et Stürzenbaum, S. (1999). Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implication for their use as biomarkers. *Cell. Mol. Biol.* **46**, 331-346.

De Conto Cinier, C., Petit Ramel, M., Faure, R., et Bortolato, M. (1998). Cadmium accumulation and metallothionein Biosynthesis in *Cyprinus carpio* tissues. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **61**, 793-799.

De Kerney, M. P., Cameron, R. A. D., et Bertrand, A. (1999). *Guide des Escargots et Limaces d'Europe.* Delachaux & Niestlé, Paris.

Deml, R., et Dettner, K. (2001). Biodegradation and transfer of ingested 2,4-D herbicide by a polyphagous saturniid caterpillar. *Chemosphere* **45**, 783-789.

Di Toro, D. M., Zabra, C. S., Hansen, D. J., Berry, w. J., Swartz, R. C., Cowan, C. E., Pavlou, S. P., Allen, H. E., Thomas, N. A., et Paquin, P. R. (1991). Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**, 2453-2462.

Dimitriadis, V. K. (2001). Structure and function of the digestive system in Stylommatophora. In *The Biology of Terrestrial Molluscs* (Ed G. M. Barker), pp. 237-257. CABI Publishing, Oxon, UK.

Echevarria, G., Klein, S., Fardeau, J.-C., et Morel, J.-L. (1997). Mesure de la fraction assimilable des éléments en traces du sol par la méthode des cinétiques d'échange isotopique : cas du nickel. *C. R. Acad. Sc. Paris* **324**, 221-227.

Echevarria, G., Morel, J.-L., Fardeau, J. C., et Leclerc-Cessac, E. (1998). Assessment of phytoavailability of nickel in soils. *J. Environ. Qual.* **27**, 1064-1070.

Eisler, R. (1986). Polychlorinated biphenyl hazards in fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish Wildl. Serv. Biol. Rep.* **85 (1.7)**.

Eisner, T., Hendry, L. B., Peakall, D. B., et Meinwald, J. (1971). 2,5 dichlorophenol (from ingested herbicide ?) in defensive secretion of grasshopper. *Science* **172**, 277-278.

Fagerström, T. (1991). Biomagnification in food chains and related concepts. *Oikos* **62**, 257-260.

Fardeau, J. C. (1981). *Cinétiques de dilution isotopique et phosphore assimilable des sols*, Université Paris VI, Paris.

Fardeau, J. C. (1993). Le phosphore assimilable des sols : sa représentation par un modèle fonctionnel à plusieurs compartiments. *Agronomie* **13**, 317-331.

Fardeau, J. C., Guiraud, G., et Hetier, J. M. (1979a) Etude au moyen de ^{15}N, ^{32}P, ^{65}Zn, ^{109}Cd et ^{203}Hg de quelques limites de l'utilisation en agriculture des boues résiduaires. In First European Symposium, Treatment and use of sewage sludge (Eds D. Aledandre, et H. Ott), Cadarache, France.

Fardeau, J.-C., Hétier, J.-M., et Jappé, J. (1979b). Potassium assimilable du sol : identification du compartiment des ions isotopiquement diluables. *C. R. Acad. Sc. Paris* **288**, 1039-1042.

Fardeau, J.-C., et Jappé, J. (1976). Nouvelle méthode de détermination du phosphore assimilable par les plantes : extrapolation des cinétiques de dilution isotopique. *C. R. Acad. Sci. Paris* **282**, 1137-1140.

Fardeau, J. C., Morel, C., et Boniface, R. (1991). Cinétiques de transfert des ions phosphate vers la solution du sol: paramètres caractéristiques. *Agronomie* **11**, 787-797.

Fardeau, J. C., Morel, C., et Jappé, J. (1985). Cinétique d'échange des ions phosphate dans les systèmes sol-solution. Vérification expérimentale de l'équation théorique. *C. R. Acad. Sci. Paris* **300**, 1039-1042.

Forbes, V. E., et Forbes, T. L. (1994). *Ecotoxicoloy in Theory and Practice*. Chapman & Hall, London, UK.

Freemark, K., et Boutin, C. (1995). Impacts of agricultural herbicide use on terrestrial wildlife in temperate landscapes: a review with special reference to North America. *Agric. Ecosyst. Environ.* **52**, 67-91.

Ge, Y., Murray, P., et Hendershot, W. H. (2000). Trace metal speciation and bioavailability in urban soils. *Environ. Pollut.* **107**, 137-144.

Gérard, E., Echevarria, G., Sterckeman, T., et Morel, J.-L. (2000). Cadmium availability to three plant species varying in cadmium accumulation pattern. *J. Environ. Qual.* **29**, 1117-1123.

Gevao, B., Mordaunt, C., Semple, K. T., Piearce, T. G., et Jones, K. C. (2001). Bioavailability of nonextractable (bound) pesticide residues to earthworms. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 501-507.

Gevao, B., Semple, K. T., et Jones, K. C. (2000). Bound pesticide residues in soils: a review. *Environ. Pollut.* **108**, 3-14.

Gommy, C., Esperanza, E., Galloo, J.-C., et Guillermo, R. (1998) Comparison of an extraction scheme for metals in soils, carried out in sequential or in parallel mode. In 16th World Congress of Soil Science, Montpellier.

Gomot, A. (1994). Contribution à l'étude de la croissance d'escargots du genre *Helix* : influence de facteurs de l'environnement, nutrition et composition biochimique, contrôle neuro-endocrine. Thèse de Doctorat, Université de Franche-Comté, Besançon.

Gomot, A. (1997). Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**, 209-216.

Gomot, L., et Deray, A. (1987). Les escargots. *La Recherche* **186**, 302-311.

Gomot, L., et Enée, J. (1980). Biologie de la reproduction de l'escargot *Helix aspersa* Müller : Les phases de la croissance et de la différenciation sexuelle. *Atti. Accad. Fisiocrit. Siena* **37**, 73-85.

Gomot-de Vaufleury, A., et Pihan, F. (2002). Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: metal bioavailability and bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 820-827.

Grelle, C., et Descamps, M. (1998). Heavy metal accumulation by *Eisenia fetida* and its effects on glutathione-S-transferase activity. *Pedobiologia* **42**, 289-297.

Greville, R. W., et Morgan, A. J. (1989a). Concentrations of metals (Cu, Pb, Cd, Zn, Ca) in six species of british terrestrial gastropods near a disused Lead and Zinc mine. *J. Moll. Stud.* **55**, 31-36.

Greville, R. W., et Morgan, A. J. (1989b). Seasonal changes in metal levels (Cu, Pb, Cd, Zn, and Ca) within the grey field slug, Deroceras reticulatum, living in a highly polluted habitat. *Environ. Pollut.* **59**, 287-303.

Greville, R. W., et Morgan, A. J. (1990). The influence of size on the accumulated amounts of metals (Cu, Pb, Cd, Zn and Ca) in six species of slug sampled from a contaminated woodland site. *J. Moll. Stud.* **56**, 355-362.

Gruttke, H., Kratz, W., Weigmann, G., et Haque, A. (1988). Terrestrail model food chain and environmental chemicals. I. Transfer of sodium [^{14}C] Pentachlorophenate between springtails and carabids. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **15**, 253-259.

Gyldenkaerne, S., Ravn, H. P. et Halling-Sorensen, B. (2000). The effect of dimethoate and cypermethrin on soil-dwelling beetles under semi-field conditions. *Chemosphere*. **41**, 1045-1057.

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.

Hamon, R. E., Lorenz, S. E., Holm, P. E., Christensen, T., et McGrath , S. P. (1995). Temporal variation in trace metal speciation and other soil solution components during growth of radish. *Plant, Cell Environ.* **18**, 749-756.

Hamon, R. E., McLaughlin, M. J., Naidu, R., et Correll, R. (1998). Long-term changes in cadmium bioavailability in soil. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 3699-3703.

Hamon, R. E., Wundke, J., McLaughlin, M., et Naidu, R. (1997). Availability of zinc and cadmium to different plant species. *Aust. J. Soil Res.* **35**, 1267-1277.

Harmsen, J., Van der Sloot, H. A., Vonk, H., et Römkens, P. (2001). Chemical measurement of bioavailability of contaminants in soil and soil like materials, Rep. No. ISO/TC 190/SC3 N 407. International Standardisation Organisation.

Hatzinger, P. B., et Alexander, M. (1995). Effect of ageing of chemicals in soil on their biodegradability and extractability. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 537-545.

He, Q. B., et Singh, B. R. (1994). Crop uptake of cadmium from phosphorus fertilisers: I. Yield and cadmium content. *W.A.S.P.* **74**, 251-.

Heikens, A., Peijnenburg, W., et Hendriks, A. J. (2001). Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environ. Pollut.* **113**, 385-393.

Heimbach, F., et Edwards, P. J. (1983). The toxicity of 2-chloroacetamide and benomyl to earthworms under various test conditions in an artificial soil test. *Pestic. Sci.* **14**, 635.

Hendricks, A. J., Ma, W.-C., Brouns, J. J., de ruiter-Dijkman, E. M., et Gast, R. (1995). Modelling and monitoring organochlorine and heavy metals accumulation in soils, earthworms, and shrews in Rhine-Delta Floodplains. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **29**, 115-127.

Holm, P. E., Christensen, T. H., Lorenz, S. E., Hamon, R. E., Domingues, H. C., Sequeira, E. M., et McGrath , S. P. (1998). Measured soil water concentrations of cadmium and zinc in

plant pots and estimated leaching outflows from contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollut.* **102**, 105-115.

Hopkin, S. P. (1989). *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier Applied Science, New York, NY.

Hopkin, S. P., et Martin, M. H. (1982). The distribution of zinc, cadmium, lead and copper within the hepatopancreas of a woodlouse. *Tiss. Cell* **14**, 703-715.

Hopkin, S. P., et Martin, M. H. (1984). Assimilation of zinc, cadmium, lead, and copper by the centipede *Lithobius variegatus* (Chilopoda). *J. Appl. Ecol.* **21**, 535-546.

Hopkin, S. P., Martin, M. H., et Moss, S. J. (1985). Heavy metals in isopods from the supra-littoral zone on the southern shore of the Severn estuary UK. *Environ. Pollut.* **9**, 239-254.

Hunter, B. A. (1984). *The ecology and toxicology of trace metals in contaminated grasslands*. PhD Thesis, University of Liverpool.

Hunter, B. A., et Johnson, M. S. (1982). Food chain relationships of copper and cadmium in contaminated grassland ecosystems. *Oikos* **38**, 108-117.

Hunter, B. A., Johnson, M. S., et Thompson, D. J. (1987a). Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem. I. Soil and vegetation contamination. *J. Applied Ecol.* **24**, 573-586.

Hunter, B. A., Johnson, M. S., et Thompson, D. J. (1987b). Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem. II. Invertebrates. *J. Applied Ecol.* **24**, 587-589.

Hunter, B. A., Johnson, M. S., et Thompson, D. J. (1987c). Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem. III. Small mammals. *J. Applied Ecol.* **24**, 601-614.

Hunter, B. A., Johnson, M. S., et Thompson, D. J. (1989). Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem. IV. Tissue distribution and age accumulation in small mammals. *J. Appl. Ecol.* **26**, 89-99.

Hutchinson, J. J., Young, S. D., McGrath, S. P., West, H. M., Black, C. R., et Baker, A. J. M. (2000). Determining uptake of "non-labile" soil cadmium by *Thlaspi caerulescens* using isotopic dilution techniques. *New Phytol.* **146**, 453-460.

Ismert, M., Oster, T., et Bagrel, D. (2002). Effects of atmospheric exposure to naphtalene on xenobiotic-metanolising enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere.* **46**, 273-280.

Jager, T. (1998). Mechanistic approach for estimating bioconcentration of organic chemicals in earthworms (oligochaeta). *Environ. Toxicol. Chem.* **37**, 2080-2090.

Jäggy, A., et Streit, B. (1982). Toxic effects of soluble copper on *Octolasium cyaneum* Sav. (Lumbricidae). *Revue Suisse Zoologie* **89**, 881-889.

Janczur, M., Kozlowski, J., et Laskowski, R. (2000). Optimal allocation, life history and heavy metal accumulation: a dynamic programming model. In *Demography in Ecotoxicology* (Eds J. E. Kammenga, et R. Laskowski). John Wiley and Sons, Chichester.

Janssen, M. P. M., Ma, W.-C., et Van Straalen, N. M. (1993). Biomagnification of metals in terrestrial ecosystems. *Sci. Total Environ.*, 511-524.

Janssen, R. P. T., Peijnenburg, W. J. G. M., Posthuma, L., et Van den Hoop, M. A. G. T. (1997a). Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. I. Relationship between metal partition coefficients and soil characteristics. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 2470-2478.

Janssen, R. P. T., Posthuma, L., Baerselman, R., Den Hollander, H. A., Van Veen, R. P. M., et Peijnenburg, W. J. G. M. (1997b). Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. II. Prediction of metal accumulation in earthworms. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 2479-2488.

Johnson, M. S., Roberts, R. D., Hutton, M., et Inskip, M. J. (1978). Distribution of lead, zinc and cadmium in samll mammals from polluted environments. *Oikos* **30**, 153-159.

Jones, K. C., Alcock, R. E., Johnson, D. L., Nothcott, G. L., Semple, K. T., et Woolgar, P. J. (1996). Organic chemicals in contaminated land: analysis, significance and research priorities. *Land Contam. Reclam.* **3**, 189-197.

Kabata-Pendias, A., et Pendias, H. (1992). *Trace elements in soils and plants*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Kelsey, J. W., et Alexander, M. (1997). Declining bioavailability and inappropriate estimation of risk of persistent compounds. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 582-585.

Kelsey, J. W., Kottler, B. D., et Alexander, M. (1997). Selective chemical extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* **31**, 214-217.

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. *Environ. Pollut.* **99**, 293-298.

Knutti, R., Bucher, P., Stengl, M., Stolz, M., Tremp, J., Ulrich, M., et Schlatter, C. (1988). Cadmium in the invertebrate Fauna of unpolluted forest in Switzerland. *Environ. Tox. Ser.* **2**, 171-191.

Kramarz, P. (1999a). Dynamics of accumulation and decontamination of cadmium and zinc in carnivorous invertebrates. 1. The Ground Beetle, *Poecilus cupreus* L. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **63**, 531-537.

Kramarz, P. (1999b). Dynamics of accumulation and decontamination of cadmium and zinc in carnivorous invertebrates. 2. The centipede *Lithobius mutabilis* Koch. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **63**, 538-545.

Laskowski, R. (1991). Are the top carnivores endangered by heavy metal biomagnification ? *Oikos* **620**, 387-390.

Laskowski, R., et Hopkin, S. P. (1996a). Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail *Helix aspersa*: implications for predators. *Environ. Pollut.* **91**, 289-297.

Laskowski, R., et Hopkin, S. P. (1996b). Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **34**, 59-69.

Laskowski, R., et Maryanski, M. (1993). Heavy metal in epigeic fauna: Trophic-level and physiological hypotheses. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **50**, 232-240.

Laurent, J., Deray, A., et Grimard, A. M. (1984). Influence de la photopériode, du degré d'hétérogénéité de la population sur la dynamique de croissance et la maturité sexuelle de l'escargot *Helix aspersa*. *C. R. Soc. Biol.* **178**, 421-441.

Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesielski, H., et Proix, N. (1996). Intérêt de différents réactifs d'extraction chimique pour l'évaluation de la bio disponibilité des métaux en traces du sol. *Agronomie*. **16**, 201–215.

Lee, S.-Z., Allen, H. E., Huang, C. P., Sparks, D. L., Sanders, P. F., et Peijnenburg, W. J. G. M. (1996). Predicting soil-water partition coefficients for cadmium. *Environ. Sci. Technol.* **30**, 3418-3424.

Leopold, I., Günther, D., Schmidt, J., et Neumann, D. (1999). Phytochelatins and heavy meatl tolerance. *Phytochemistry* **50**, 1323-1328.

Leppanen, M. T., et Kokkonen, J. V. K. (1998). Relative importance of ingested sediment and pore water as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (*Lumbricus variegatus*, Muller). *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1503-1508.

Little, P. (1973). A study of heavy metal contamination of leaf surfaces. *Environ. Pollut.* **5**, 159-172.

Lock, K., et Janssen, C. R. (2001a). Effect of clay and organic matter type on the ecotoxicity of zinc and cadmium to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Chemosphere* **44**, 1669-1672.

Lock, K., et Janssen, C. R. (2001b). Cadmium toxicity for terrestrial invertebrates: taking soil parameters affecting bioavailability into account. *Ecotoxicology* **10**, 315-322.

Lock, K., Janssen, C. R., et De Coen, W. M. (2000). Multivariate test designs to assess the influence of zinc and cadmium bioavailability in soils on the toxicity to *Enchytraeus albidus*. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2666-2671.

Lofs-Holmin, A. (1980). Measuring growth of earthworms as a method of testing sublethal toxicity of pesticides. *Swed. J. Agric. Res.* **10**, 25-33.

Lofs-Holmin, A. (1982). Measuring cocoon production of the earthworm *Allolobophora caliginosa* (Sav.) as a method of testing sublethal toxicity of pesticides. *Swed. J. Agric. Res.* **12**, 117-119.

Loonen, H., Muir, D. C. G., Parsons, J. R., et Grovers, H. A. J. (1997). Bioaccumulation of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in sediment by oligochaetes: influence of exposure pathway and contact time. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1518-1525.

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 Soil* **189**, 21-31.

Ma, W.-C. (1982). The influence of soil properties and worm-related factors on the concentration of heavy metals in earthworms. *Pedobiologia* **24**, 109-119.

Ma, W.-C. (1983). Regenwormen als bio-indicators van bodemverontreiniging. **15**.

Ma, W.-C. (1984). Sublethal toxic effects of copper on growth, reproduction and litter breakdown activity in the earthworm *Lumbricus rubellus*, with observations on the influence of temperature and soil pH. *Environ. Pollut. A* **33**.

Ma, W.-C. (1988). Toxicity of copper to lumbricid earthworms in sandy agricultural soils amended with Cu-enriched organic waste materials. *Ecol. Bull.* **39**, 53-56.

Ma, W.-C., Denneman, W., et Faber, F. (1991). Hazardous exposure of ground-living small mammals to Cadmium and Lead in contaminated terrestrial ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20**, 266-270.

Ma, W.-C., Edelman, T., Van Beersum, I., et Jans, T. (1983). Uptake of cadmium, zinc, lead and copper by earthworms near a zinc-smelter complex: influence of soil pH and organic matter content. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **30**, 424-427.

Mackay, W. P., Mena, R., Gardea, J., et Pingatore, N. (1998). Lack of bioaccummulation of heavy metals in an arthropod community in the northen Chihuahuan desert. *J. Kansas Entomol. Soc.* **70**, 329-334.

Madec, L. (1983). Importance des conditions climatiques et de l'origine des individus pour la reproduction de l'escargot petit-gris en élevage sous bâtiment contrôlé. Session ITAVI, Rennes, France.

Maiz, I., Esnaola, M. V., et Millan, E. (1997). Evaluation of heavy metal availability in contaminated soils by a chort sequential extraction procedure. *Sci. Total Environ.* **206**, 107-115.

Malausa, J.-C. (1977). L'élevage des coléoptères Carabidae : dans la perspective d'une multiplication de masse. *Ann. Zool. Ecol. Anim.* **9**, 497-505.

Marino, F., et Morgan, A. J. (1999). Equilibrated body metal concentrations in laboratory exposed eartworms: can they be used to screen candidate metal-adapted populations ? *Appl. Soil Ecol.* **12**, 179-189.

Marinussen, M. P. J. C., et van der Zee, S. E. A. T. M. (1997). Cu accumulation by *Lumbricus rubellus* as affected by total amount of Cu in soil, soil moisture and soil heterogeneity. *Soil Biol. Biochem.* **29**, 641-647.

Marinussen, M. P. J. C., van der Zee, S. E. A. T. M., et de Haan, F. A. M. (1997). Effect of Cd or Pb addition to Cu-contaminated soil on tissue Cu accumulation in the earthworm, *Dendrobaena veneta*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **38**, 309-315.

Martin, M. H., et Bullock, R. J. (1994). The impact and fate of heavy metals in an oak woodland ecosystems. In *Toxic Metals in Soil - Plant Systems* (Ed S. M. Ross), pp. 327-365. John Wiley and Sons, Chichester.

Martinez, C. E., et Motto, H. L. (2000). Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. *Environ. Pollut.* **107**, 153-158.

Mayer, L. M., Weston, D. P., et Bock, M. J. (2001). Benzo[a]pyrene and zinc solubilisation by digestive fluids of benthic invertebrates - A cross-phyletic study. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 1890-1900.

McBride, M. B. (1995). Toxic metal accumulation from agriculture use of sludge: are USEPA regulations protective? *J. Environ. Qual.* **24**, 5-18.

McBride, M. B., Martinez, C. E., Topp, E., et Evans, L. (2000). Trace metal solubility and speciation in a calcareous soil 18 years after no-till sludge application. *Soil Sci.* **165**, 646-656.

McGrath, S. P., Knight, B., Killham, K., Preston, S., et Paton, G. I. (1999). Assessment of the toxicity of metals in soils amended with sewage sludge using a chemical speciation technique and a lux-based biosensor. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 659-663.

McGrath , S. P., Zhao, F. J., Dunham, S. J., Crosland, A. R., et Coleman, K. (2000). Long-term changes in the extractability and bioavailability of zinc and cadmium after sludge application. *J. Environ. Qual.* **29**, 875-883.

McLaughlin, M. J., Hamon, R. E., McLaren, R. G., Speir, T. W., et Rogers, S. L. (2000a). Review: A bioavailability-based rationale for controlling metal and metalloid contamination of agricultural land in Australia and New Zealand. *Aust. J. Soil Res.* **38**, 1037-1086.

McLaughlin, M. J., Zarcinas, B. A., Stevens, D. P., et Cook, N. E. (2000b). Testing soils and plants for heavy metals. *Comm. Soil Sc. Pl. Anal.* **31**, 1661-1700.

Mill, T. (1993). Environmental Chemistry. In *Ecological risk Assessment* (Ed G. W. Suter II), pp. 91-127. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Morel, J.-L. (1997). Bioavailability of trace elements to terrestrial plants. In *Soil Ecotoxicology* (Eds J. Tarradellas, G. Bitton, et D. Rossel), pp. 141-176. CRC Press - Lewis Publishers, Boca Raton.

Morgan, A. J., Morris, B., James, N., Morgan, J. E., et Leyshon, K. (1986). Heavy metals in terrestrial macroinvertebrates: species differences within and between trophic levels. *Chem. Ecol.* **2**, 319-334.

Morgan, J. E., et Morgan, A. J. (1988). Earthworms as biological monitors of cadmium, copper, lead and zinc in metalliferous soils. *Environ. Pollut.* **54**, 123-138.

Morgan, J. E., et Morgan, A. J. (1999). The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): implications for ecotoxicological testing. *Appl. Soil Ecol.* **13**, 9-20.

Moriarty, F. (1999). *Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems*. Academic Press, London.

Moriarty, F., et Walker, C. H. (1987). Bioaccumulation in food chains, a rational approach. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **13**, 208-215.

Morrison, D. E., Robertson, B. K., et Alexander, M. (2000). Bioavailability to earthworms of aged DDT, DDE, DDD and dieldrin in soil. *Environ. Sci. Technol.* **34**, 709-713.

Muskett, C. J., et Jones, M. P. (1980). The dispersal of lead, cadmium and nickel from motor vehicles and effects on roadside invertebrate macrofauna. *Environ. Pollut.* **23**, 231-242.

Nakahone, L. N., et Young, S. D. (1993). The significance of (radio-)labile cadmium pools in soil. *Environ. Pollut.* **82**, 73-77.

Newman, M. C., Mulvey, M., Beeby, A., Hurst, R. W., et Richmond, L. (1994). Snail (*Helix aspersa*) exposure history and possible adaptation to lead as reflected in shell composition. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **27**, 346-351.

NF X 31-255-1 (2001). Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (*Helix aspersa*). Détermination des effets sur la croissance par contamination alimentaire. AFNOR, Paris.

NF X 31-255-2 (2001). Effets des polluants vis-à-vis des escargots juvéniles (*Helix aspersa*). Détermination des effets sur la croissance par contamination par le sol. AFNOR, Paris.

Nriagu, J. O., et Pacyna, J. M. (1988). Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* **333**, 134-139.

Nuorteva, P., et Nuorteva, S.-L. (1982). The fate of mercury in sarcosaprophagous flies and in insects eating them. *Ambio* **11**, 34-37.

OCDE (1993). *Guidelines for Testing of Chemicals, Section 3 - Degradation and Accumulation*. Paris 1981. Version mise à jour : OCDE, Paris.

O'Connor, G. A. (1988). Use and misuse of the DTPA soil test. *J. Environ. Qual.* **17**, 715-718.

Oste, L. A., Dolfing, J., Ma, W.-C., et Lexmond, T. M. (2001a). Effect of beringite on cadmium and zinc uptake by plants and earthworms: more than a liming effect ? *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 1339-1345.

Oste, L. A., Dolfing, J., Ma, W.-C., et Lexmond, T. M. (2001b). Cadmium uptake by earthworms as related to the availability in the soil and the intestine. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 1785-1791.

Paoletti, M. G., et Bressan, M. (1996). Soil invertebrates as bioindicators of human disturbance. *Crit. Rev. Plants Sci.* **15**, 21-62.

Pascoe, G. A., Blanchet, R. J., et Linder, G. (1994). Bioavailability of metals and arsenic to small mammals at a mining waste-contaminated wetland. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **27**, 44-50.

Pearson, M. S., Maenpaa, K., Pierzynski, G. M., et Lydy, M. J. (2000). Effects of soil amendments on the bioavailability of lead, zinc, and cadmium to earthworms. *J. Environ. Qual.* **29**, 1611-1617.

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.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **39**, 420-430.

Peijnenburg, W. J. G. M., Posthuma, L., Zweers, P. G. C., Baerselman, R., De Groot, A., Van Veen, R. P. M., et Jager, T. (1999a). Prediction of metal bioavalability in Dutch field soils for the oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **43**, 170-186.

Peijnenburg, W. J. G. M., Baerselman, R., De Groot, A., Jager, T., Posthuma, L., et Van Veen, R. P. M. (1999b). Relating environmental availability to bioavailability: Soil-type-dependant metal accumulation in the olichaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **44**, 294-310.

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. *Ecotox. Environ. Saf.* **37**, 163-172.

Pignatello, J. J., et Xing, B. (1996). Mechanisms of low sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 1604-1608.

Pihan, F., et Gomot-deVaufleury, A. (2000). The snail as a target organism for the evaluation of industrial waste dump contamination and the efficiency of its remediation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **46**, 137-147.

Plette, A. C. C., Nederlof, M. M., Temminghoff, E. J. M., et van Riemsdijk, W. H. (1999). Bioavailability of heavy metals in terrestrial and aquatic systems: a quantitative approach. *Environ. Toxicol. Chem.* **18**, 1882-1890.

Pokarzhevskii, A. D., et Van Straalen, N. M. (1996). A multi-element view of heavy metal biomagnification. *Appl. Soil Ecol.* **3**, 95-98.

Price, W., Rathcke, B. J., et Gentry, D. A. (1974). Lead in terrestrial arthropods: evidence for biological concentration. *Environ. Entomol.* **3**, 370-372.

Rabitsch, W. B. (1994). Metal accumulation in arthopods near a lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria. I. *Environ. Pollut.* **90**, 221-237.

Rabitsch, W. B. (1995a). Metal accumulation in arthopods near a lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria. II. Formicidae. *Environ. Pollut.* **90**, 239-247.

Rabitsch, W. B. (1995b). Metal accumulation in arthropods near a lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria. III. Arachnida. *Environ. Pollut.* **90**, 249-257.

Rabitsch, W. B. (1996). Metal accumulation in terrestrial pulmonates at a lead/zinc smelter site in Arnoldstein, Austria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 734-741.

Ramade, F. (1998). *Dictionnaire Encyclopédique des Sciences de l'Eau*. Ediscience International, Paris, France.

Read, H. J. (1988). *The effects of heavy metal pollution on woodland leaf litter faunal communities*. PhD Thesis, University of Bristol.

Reid, B. J., Jones, K. C., et Semple, K. T. (2000). Boavailability of persistent organic pollutants in soils and sediments - a perspective or mechanism, consequence and assessment. *Environ. Pollut.* **108**, 103-112.

Rivière, J.-L. (1998). *Evaluation du risque écologique des sols pollués*. TEC & DOC Lavoisier, Paris.

Roberts, R. D., et Johnson, M. S. (1978). Dispersal of heavy metals from abandoned mine workings and their transference through terrestrial food chains. *Environ. Pollut.* **16**, 293-310.

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 Sci.* **163**, 859-871.

Rudd, R. L. (1964). *Pesticides and the living landscape*. Faber & Faber, London.

Sandifer, R. D., et Hopkin, S. P. (1996). Effects of pH on the toxicity of cadmium, copper, lead and zinc to *Folsomia candida* Willem, 1902 (Collembola) in a standard laboratory test system. *Chemosphere* **33**, 2475-2486.

Sandifer, R. D., et Hopkin, S. P. (1997). Effects of temperature on the relative toxicities of Cd, Cu, Pb and Zn to *Folsomia candida* (collembola). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **37**, 125-130.

Scharenberg, W., et Ebeling, E. (1996). Distribution of heavy metals in a woodland food web. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **56**, 389-396.

Schroll, R., Dörfler, U., et Scheunert, I. (1999). Volatilization and mineralization of ^{14}C-labelled pesticides on lysimeter surfaces. *Chemosphere* **39**, 595-602.

Scott-Fordsmand, J. J., Weeks, J. M., et Hopkin, S. P. (2000). Importance of contamination history for understanding toxicity of copper to earthworm *Eisenia fetica* (Oligochaeta: Annelida), using neutral-red retention assay. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 1774-1780.

Shea, D. (1988). Developing national sediment quality criteria. *Environ. Sci. Technol.* **9**, 1256-1261.

Sijm, D., Kraaij, R., et Belfroid, A. (2000). Bioavailability in soil or sediment : exposure of different organisms and approaches to syudy it. *Environ. Pollut.* **108**, 113-119.

Simkiss, K., et Mason, A. Z. (1983). Metal ions: metabolic and toxic effects. In *The Mollusca: Environmental Biochemistry and Physiology* (Ed P. W. Hochachka), pp. 101-163. Academic Press, New York, US.

Sinaj, S., Mächler, F., et Frossard, E. (1999). Assessment of isotopically exchangeable zinc in polluted and nonpolluted soils. *Soil Sc. Soc. Am. J.* **63**, 1618-1625.

Singh, B. R., Narwal, R. P., Jeng, A. S., et Almas, A. R. (1995). Crop uptake and exctractability of cadmium in soils naturally high in metals at different pH levels. *Comm. Soil Sc. Plant Anal.* **26**, 2123-2142.

Smit, C. E., et Van Gestel, C. A. M. (1996). Comparison of the toxicity of zinc for the springtail *Folsomia candida* in artificially contaminated and polluted field soils. *Appl. Soil Ecol.* **3**, 127-136.

Smit, C. E., et Van Gestel, C. A. M. (1997). Influence of temperature on the regulation and toxicity of zinc in *Folsomia candida* (Collembola). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 213-222.

Smolders, E., Brans, K., Földi, A., et Merckx, R. (1999). Cadmium fixation in soils measured by isotopic dilution. *Soil Sc. Soc. Am. J.* **63**, 78-85.

Sousa, J. P., Loureiro, S., Pieper, S., Frost, M., Kratz, W., Nogueira, A. J. A., et Soarest, A. M. V. M. (2000). Soil and plant diet exposure routes and toxicokinetics of lindane in a terrestrial isopod. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**, 2557-2563.

Speiser, B. (2001). Food and Feeding Behaviour. In *The Biology of Terrestrial Molluscs* (Ed G. M. Barker), pp. 259-288. CABI Publishing, Oxon, UK.

Spurgeon, D. J. (1997). Can the uptake and toxicity of pollutants by soil invertebrates be described by simple one exposure route models based on the pore-water concentrations ? In *Bioavailability as a key property in terrestrial ecotoxicity assessment and evaluation*, pp. 71-84. Fraunhofer IRB Verlag.

Spurgeon, D. J., et Hopkin, S. P. (1996). Effects of variation of the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc for the earthworm *E. fetida*. *Pedobiologia* **40**, 80-96.

Spurgeon, D. J., Hopkin, S. P., et Jones, D. T. (1994). Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* **84**, 123-130.

Suter II, G. W. (1993). Exposure. In *Ecological Risk Assessment* (Ed G. W. Suter II), pp. 153-172. Lewis Publishers, Boca Raton, FL.

Suzuki, K. T., Aoki, Y., Nishikawa, M., Masui, H., et Matsubara, F. (1984). Effect of cadmium-feeding on tissue concentrations of elements in a germ-free silkworm (*Bombyx mori*) larvae and distribution of cadmium in the alimentary canal. *Comp. Biochem. Physiol.* **79C**, 249-253.

Taylor, M. D., et Percival, H. J. (2001). Cadmium in soil solutions from a transect of soils away from a fertiliser bin. *Environ. Pollut.* **113**, 35-40.

Thöming, J., et Calmano, W. (1998). Applicability of single and sequential extractions for assessing the potential mobility of heavy metals in contaminated soils. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* **26**, 338-343.

Tibazarwa, C., Corbisier, P., Mench, M., Bossus, A., Solda, P., Mergeay, M., Wyns, L., et van der Lelie, D. (2001). A microbial biosensor to predict bioavailable nickel in soil and its transfer to plants. *Environ. Pollut.* **113**, 19-26.

Tiller, G. K., Honeysett, J. L., et Devries, M. P. C. (1972a). Soil zinc and its uptake by plants. II. Soil chemistry in relation to prediction of availability. *Austr. J. Soil Res.* **10**, 165-182.

Tiller, K. G., Honeysett, J. L., et Devries, M. P. C. (1972b). Soil zinc and its uptake by plants. I. Isotopic exchange equilibria and the application of tracer techniques. *Soil Res.* **10**, 151-164.

Torres, K. C., et Johnson, M. L. (2001). Bioaccumulation of metals in plants, arthopods, and mice at a seasonal wetland. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 2617-2626.

Tyler, G. (1984). The impact of heavy metal pollution on forests: a case study of Gusum, Sweden. *Ambio* **13**, 18-24.

Van den Brink, N. W., et Ma, W.-C. (1998). Spatial and temporal trends in levels of trace metals and PCBs in the european badger *Meles meles* (L., 1758) in The Nertherlands: Implications for reproduction. *Sci. Total Environ.* **222**, 107-118.

Van Gestel, C. A. M., et Hensbergen, P. (1997). Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 1177-1186.

Van Gestel, C. A. M., et Ma, W.-C. (1988). Toxicity and bioaccumulation of chlorophenols in earthworms, in relation to bioavailability. *Ecotox. Environ. Saf.* **15**, 289-297.

Van Gestel, C. A. M., et Ma, W.-C. (1990). An approach to quantitative structure-activity relationships (QSARs) in earthworm toxicity studies. *Chemosphere* **21**, 1023-1033.

Van Gestel, C. A. M., Ma, W.-C., et Smit, C. E. (1991). Development of QSAR's in terrestrial ecotoxicology: erathworm toxicity on soil sorption of chlorophenols, chlorobenzenes and dichloroaniline. *Sc. Tot. Environ.* **109/110**, 589-604.

Van Gestel, C. A. M., et van Diepen, A. M. F. (1996). The influence of soil moisture content on the bioavailability and toxicity of cadmium for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae). *Ecotox. Environ. Saf.* **36**, 123-132.

Van Gestel, C. A. M., et van Dis, W. A. (1988). The influence of soil characteristics on the toxicity of four chemicals to the earthworm *Eisenia fetida andrei* (Oligochaeta). *Biol. Fertil. Soils* **6**, 262-265.

Van Hook, R. I., et Yates, A. J. (1975). Transient behavior of cadmium in grassland Arthropod food chain. *Environ. Res.* **9**, 76-83.

Van Straalen, N. M., Burghouts, T. B. A., Doornhof, M. J., Groot, G. M., Janssen, M. P. M., Joosse, E. N. G., Van Meeredonk, J. H., Theeuwen, J. P. J. J., Verhoef, H. A., et Zoomer, H. R. (1987). Efficiency of lead and cadmium excretion in populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from various contaminated forest soils. *J. Appl. Ecol.* **24**, 953-968.

Van Straalen, N. M., et Ernst, W. H. O. (1991). Metal biomagnification may endanger species in critical pathways. *Oikos* **62**, 255-256.

Van Straalen, N. M., et Hoffmann, A. A. (2000). Review of experimental evidence for physiological costs of tolerance to toxicants. In *Demography in ecotoxicology* (Eds J. E. Kammenga, et R. Laskowski), pp. 147-162. J. Wiley & Sons, Chichester.

Van Straalen, N. M., et Van Gestel, C. A. M. (1998). Soil invertebrates and micro-organisms. In *Handbook of Ecotoxicology* (Ed P. Calow), pp. 251-277. Blackwell Science, Oxford.

Van Straalen, N. M., et Van Wensem, J. (1986). Heavy metal content of forest litter arthropods as related to body-size and trophic level. *Environ. Pollut.* **42**, 209-221.

Wade, K. J., Flanagan, J. T., Currie, A., et Curtis, D. J. (1980). Roadside gradients of Lead and Zinc concentrations in surface-dwelling invertebrates. *Environ. Pollut.* **1**, 87-93.

Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., et Peakall, D. B. (1996). *Principles of Ecotoxicology*. Taylor & Francis, London.

Wallace, W. G., et Lopez, G. R. (1995). Relationships between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic tranfer to a predator. *Estuaries* **19**, 923-930.

Wallace, W. G., Lopez, G. R., et Levinton, J. S. (1998). Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **172**, 225-237.

Wania, F. (2000). Environmental fate of POPs. *Eur. J. Lipid. Sci. Technol.*, 54-56.

Watson, M. R., Stone, W. B., Okoniewski, J. C., et Smith, L. M. (1985). Wildlife as monitors of the movement of polychlorinated biphenyls and other organochlorine compounds from a hazardous waste site. *Trans. 41st Northeast Fish Wildl. Conf.*, 91-104.

Weltje, L. (1998). Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soil: a critical evaluation of data. *Chemosphere* **36**, 2643-2660.

White, J. C., Kelsey, J. W., Hatzinger, P. B., et Alexander, M. (1997). Factors affecting sequestration and bioavailability of phenantrene in soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 2040-2045.

Williamson, P. (1980). Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population if snail *Cepaea hortensis* Müller. *Oecologia* **44**, 213-220.

ANNEXE 1

Présentation générale de l'escargot *Helix aspersa* et méthodes d'élevage et de production

1. Généralités

Les escargots utilisés dans ces travaux appartiennent à l'espèce *Helix aspersa aspersa* Müller (1774) dont le nom vernaculaire est Petit gris. Ce sont des mollusques gastéropodes pulmonés terrestres stylommatophores (Figure 1. a.). Le genre *Helix* compte de nombreuses espèces européennes et méditerranéennes (avec une limite altitudinale située à 1000 m environ) mais l'espèce *aspersa* a colonisé les régions atlantiques et a été introduite hors de son aire de répartition européenne (Chevallier 1992; De Kerney *et al.* 1999).

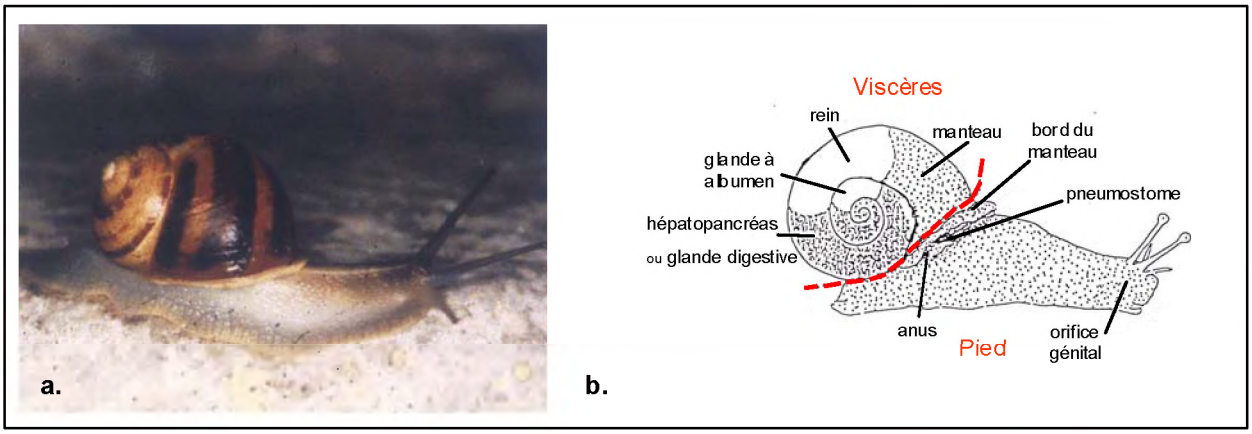


Figure 1. a. *Helix aspersa aspersa*, individu adulte. **b.** Schéma d'un individu sorti de sa coquille, le tireté rouge indique la marque de dissection pour la séparation pied / viscères.

2. Eléments de la biologie d'*H. aspersa*

C'est une espèce ubiquiste qui s'adapte à des milieux, des sols et des climats variés et s'accommode très bien de milieux fortement anthropisés. Elle semble cependant préférer les milieux ouverts. Sa nourriture est principalement constituée de matériel végétal vivant ou mort (litière) avec une proportion plus ou moins importante de sol (Chevalier 2001; Speiser 2001). L'activité de l'espèce est principalement nocturne et se synchronise avec la photopériode. Elle est fortement influencée par les conditions environnementales, notamment l'hygrométrie du sol et de l'air (activité au dessus de 80% d'humidité), la température (inactivité pour des températures nocturnes inférieures à 9°C) et l'intensité lumineuse (Chevallier 1982). Les températures supérieures à 15°C (accompagnées d'une absence prolongée d'humidité) ou inférieures à 5°C (et la baisse de la photopériode) entraînent respectivement l'estivation et l'hibernation. Ces 2 phénomènes sont caractérisés par des diminutions drastiques de l'activité qui est réduite à la respiration et au fonctionnement minimal du métabolisme. En estivation, les individus se fixent sur

un support et bouchent l'orifice de leur coquille par un épiphragme (voile de mucus solidifié) ; en hibernation, ils peuvent également s'enfouir dans le sol ou la litière et secréte un épiphragme plus solide qu'en estivation.

Cette propriété des escargots à estiver est utilisée pour conserver les escargots vivants pendant plusieurs semaines dans des boîtes en bois placées dans un lieu sec et tempéré. Avant expérience, les escargots sont remis en activité en les pulvérisant d'eau (distillée ou ultrapure) et nourris de 2 à 5 jours (NF X 31-255-1 2001; NF X 31-255-2 2001).

La croissance des escargots suit 4 phases en fonction de la masse et de la différenciation sexuelle des animaux (Tableau 1).

Tableau 1. Description des 4 phases de la croissances d'*H. aspersa* (Gomot et Enée 1980).

Phase	Différenciation sexuelle	Masse (g)
Infantile	Tractus génital non différencié	0,02 à 0,6
Juvénile	Organisation du tractus génital, gamétogenèse active	0,6 à 6
Préadulte	Maturation sexuelle : développement des glandes annexes femelles	Plus de 6 (individus non bordés*)
Adulte	Différenciation sexuelle terminée : aptitude des individus à la reproduction	De 6 à 14 g (individus bordés)

* Les individus sont dits bordés quand le péristome est épaissi (cf flêche rouge sur la Figure 1. b.).

La croissance en milieu naturel (de l'éclosion jusqu'à la maturité sexuelle) s'effectue par pallier (en fonction des alternances de périodes d'activité et des estivations/hibernations), généralement en 2 ans. La longévité de cette espèce en milieu naturel est de 6 à 7 ans.

La reproduction d'*H. aspersa* en milieu naturel a lieu de mai à mi-septembre. La fécondation est réciproque par échange de spermatophores entre les 2 partenaires, certains individus peuvant toutefois se comporter uniquement comme mâle ou comme femelle. L'autofécondation, qui existe chez les limaces et les achatines, est rarement observée chez les escargots du genre *Helix* et n'a jamais été rapportée pour *H. aspersa* (L. Gomot, comm. pers.). La durée entre l'accouplement et la ponte est d'environ 10 jours en conditions optimales mais peut atteindre 1 voire 2 mois lorsque les conditions de l'environnement sont défavorables. Les œufs (entre 80 et 130) sont déposés dans une cavité creusée à quelques cm sous la surface du sol, cavité qui est ensuite rebouchée. L'incubation dure de 12 jours à 20°C à environ 22 jours à 15°C. Le nombre moyen de ponte par reproducteur est de 1,3 et le nombre d'infantiles produits est de 75 à 85 (Madec 1983).

3. Méthodes d'élevage et de production (Cœurdassier 2001)

Les escargots utilisés pour les essais de toxicité sont obtenus par la technique d'élevage dite ''hors sol'' car celle-ci se déroule en bâtiment dans un environnement contrôlé, ce qui permet de disposer d'animaux toute l'année. Cette technique est avant tout utilisée en héliciculture pour produire une partie des escargots que nous consommons et permet d'optimiser la croissance et la reproduction d'*H. aspersa*. Les différentes étapes de l'élevage (Figure 2), les conditions environnementales, l'aliment Helixal® et les installations décrits par la suite ont été développés par Laurent *et al.* (1984), Bonnefoy-Claudet et Deray (1987) et Gomot (1994).

A chacune des étapes du cycle biologique des escargots, il est possible de les mettre en quiescence (phase de repos) en supprimant l'humidité. Ces périodes peuvent aller de quelques mois (un mois à trois mois) pour les jeunes, à un an pour les adultes à 6 à 7°C. Pour des périodes courtes (jusqu'à cinq mois), il est possible de laisser les animaux au sec à température ambiante à 15 à 20°C en estivation.

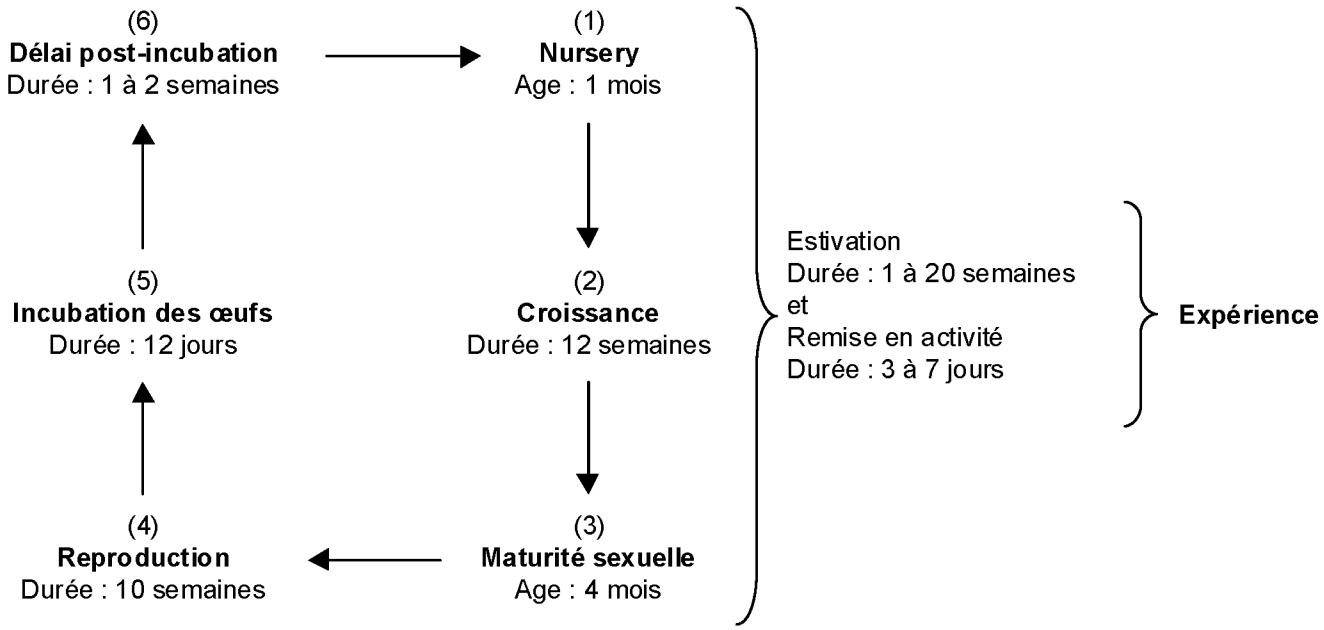


Figure 2. Cycle d'élevage en conditions contrôlées

3. 1. Maintenance de l'élevage

3. 1. 1. Croissance et reproduction

Des cages d'élevage spécifiques pour escargots (notées CSE) sont utilisées pour l'obtention d'individus matures à partir de juvéniles, l'accouplement et la ponte. Le matériau des cages est du polychlorure de vinyle alimentaire gris. La porte est en polycarbonate transparent. Une cage a une surface de collage d'environ 0,5 m^2 et un volume de 0,02 m^3.

Les densités utilisées sont de 50 individus juvéniles par cage (100 ind.m^{-2}) pour la croissance et 15 adultes par cage (30 ind.m^{-2}) pour la reproduction.

Pour obtenir des animaux reproducteurs utilisables dans des tests de toxicité, il est nécessaire de séparer les individus à trois mois afin d'éviter tout accouplement avant l'expérimentation.

Lorsque les premiers accouplements sont observés, des bacs à souris (BS) en polystyrène cristal d'un volume unitaire égal à 1600 cm^3 (IFFA CREDO 080001) sont remplis de terreau horticole et placés dans les CSE. Pour récupérer plus aisément les pontes, un support en polystyrène dur (épaisseur 3 cm) percé d'une dizaine de trous (diamètre : 2,5 cm) est placé à la surface du terreau. Les pontes, récupérées délicatement à l'aide d'une petite cuillère peuvent alors être mises en incubation.

3. 1. 2. Incubation et éclosion

L'incubation est réalisée par ponte dans une boite de Pétri (90 mm de diamètre x 15 mm de haut) au fond de laquelle on place un papier absorbant humide. La grappe d'œuf est ouverte puis déposée sur le papier humide. L'humidité est maintenue jusqu'à l'éclosion en pulvérisant régulièrement de l'eau distillée sur les œufs. Les éclosions commencent 12 jours à 14 jours après la ponte. Les jeunes éclos migrent rapidement vers le couvercle. Pendant cette migration, ils mangent le papier qui sert de substrat d'incubation. Quelques jours après cette migration (6 jours à 15 jours), les escargots nouveaux nés sont plus pigmentés et peuvent être utilisés pour la première phase d'élevage (*nursery*) ou alors laissés en conditions sèches pendant quelques mois. A ce stade, leur masse moyenne est de 25 mg à 40 mg pour *H. aspersa.*

3. 1. 3. Nursery

La nursery est réalisée dans des BS. Un morceau de papier absorbant humide recouvre le fond de la BS. 80 naissains sont placés dans une BS fermée par une plaque en polystyrène cristal. Après 2 semaines, la plaque est remplacée par une BS retournée qui double le volume d'élevage, évitant ainsi les effets de groupe négatif.

Pour avoir une population la plus homogène possible, seuls les animaux de masses comprises entre 0,7 g et 1,3 g sont sélectionnés. Un premier tri est effectué après trois semaines d'élevage puis à quatre et cinq semaines. Les animaux "standards" ainsi retenus peuvent être utilisés pour réaliser des essais de toxicité ou pour la suite de la croissance, sans traitement particulier. Ce tri est nécessaire car la population est relativement hétérogène en fin de période de nursery ; en moyenne, 15 % à 30 % des jeunes issus d'une ponte restent ''nains'' et ne sont pas conservés pour la suite de l'élevage.

3. 1. 4. Nettoyage et nourriture

Que ce soit en CSE ou en BS, le nettoyage est effectué trois fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi). Il est important de soigner les animaux à heure fixe et de façon régulière car ils s'habituent à un rythme d'activité et de nourriture ; le non respect de cette règle simple peut compromettre la réussite de l'élevage.

Dans les CSE équipées d'un système automatique, l'arrosage s'effectue pendant 1 min à 5 min selon l'âge et la taille des escargots. Le nettoyage est ensuite complété manuellement à l'aide d'un jet. Après avoir laissé égoutter les cages pendant 15 min, la nourriture est déposée sur le fond des cages.

Dans les BS, après avoir nettoyé les parois du bac, on place du papier absorbant humidifié propre sur le fond. La nourriture fraîche est ensuite déposée dans une boîte de Pétri sur le fond du bac.

3. 2. Paramètres d'environnement

3. 2. 1. Eclairement

La reproduction, l'incubation, la nursery et la croissance se déroulent en photopériode longue de 18 h d'éclairement par 24 h (18hL - 6hO). L'éclairage est fourni par des tubes fluorescents type lumière du jour. La quantité de lumière mesurée au niveau des dispositifs d'élevage est de 50 lux à 100 lux (selon que l'on utilise des cages spécifiques escargots en polychlorure de vinyle gris ou des bacs en plastiques transparents).

3. 2. 2. Température

Toutes les étapes de l'élevage se déroulent à 20°C ± 2°C. La température peut baisser au moment du nettoyage de façon plus ou moins marquée selon la saison.

3. 2. 3. Hygrométrie

Le degré d'hygrométrie est de 80 % à 95 %.

Si on utilise des BS, l'humidité est assurée par du papier absorbant humide déposé sur le fond des bacs. Durant l'incubation ; les bacs d'incubation doivent être placés dans un local sans humidificateur d'air.

Si on travaille avec les CSE, un humidificateur assure l'humidification du local où se trouvent ces cages (un humidificateur pour environ 150 m^3).

3. 2. 4. Alimentation

Pendant la période de nursery, les naissains sont nourris avec l'aliment Helixal® premier âge alors que, pendant les phases de croissance et de reproduction, un aliment Helixal® deuxième âge est utilisé. Helixal® se présente sous la forme du farine sèche tamisée à 1 mm dont la production est assurée par Philicot S.A. (Clairvaux-les-Lacs, France). Pour conserver sa valeur nutritive et ainsi permettre une croissance maximale, l'aliment doit être conservé dans un endroit sec et frais, si possible à l'obscurité pendant environ 6 mois. Sa composition est détaillée dans le Tableau 2.

Tableau 2. Composition de l'aliment "Helixal®" (D'après Gomot 1994).

	Divers ($g.100\ g^{-1}$)					Vitamines ($U.I.\ kg^{-1}$)			Métaux ($mg.kg^{-1}$)					
	Protéines	Matières grasses brutes	Cellulose brute	Cendres brutes	Ca	A	D3	E	Cu	Zn	Cd	Pb	Cr	Ni
1er âge	13,4	4,3	2,5	34,6	12,1	15000	2000	20	13	65	0,09	1,27	6,2	0,12
2ème âge	15,7	7,38	1,8	31	10,3	20500	3900	39	30	137	0,16	0,94	9,3	0,12

ANNEXE 2

Présentation générale du coléoptère carabidé *Chrysocarabus splendens* et méthodes d'élevage et de production

1. Généralités

Appartenant aux Insectes Endoptérygotes Coléoptères de la famille des Carabidae, *Chrysocarabus splendens* (Figure 1) est un carabe de grande taille (longueur atteignant 34 mm) dont la répartition française est limitée au quart sud-ouest (principalement les Pyrénées). Il vit en forêts (sans préférence pour les feuillus ou les conifères) relativement humides dont les pentes sont orientées au nord, du niveau de la mer (Landes) jusqu'à 1500 m d'altitude (Pyrénées Atlantiques). Nocturne, sa période d'activité varie en fonction de l'altitude mais s'étend globalement de la seconde moitié du printemps à l'été.

Chrysocarabus splendens
Olivier, 1790

Figure 1. *Chrysocarabus splendens* Olivier 1790 adulte femelle (la flèche rouge indique le tarse des pattes antérieures. Sa forme permet de différencier avec certitude les sexes : fin chez les femelles, le tarse est beaucoup plus large chez les mâles).

2. Eléments de la biologie de *C. splendens*

La biologie générale de cette espèce d'insecte est relativement bien connue des entomologistes amateurs mais, contrairement à *H. aspersa* dont l'intérêt économique important a suscité des recherches approfondies, il s'agit plus pour *C. splendens* de connaissances empiriques permettant son élevage que de réelles connaissances scientifiques.

La développement larvaire des carabes suit 3 stades successifs avant la nymphose (ou métamorphose). D'une manière générale, le développement a lieu selon le schéma représenté à la Figure 2.

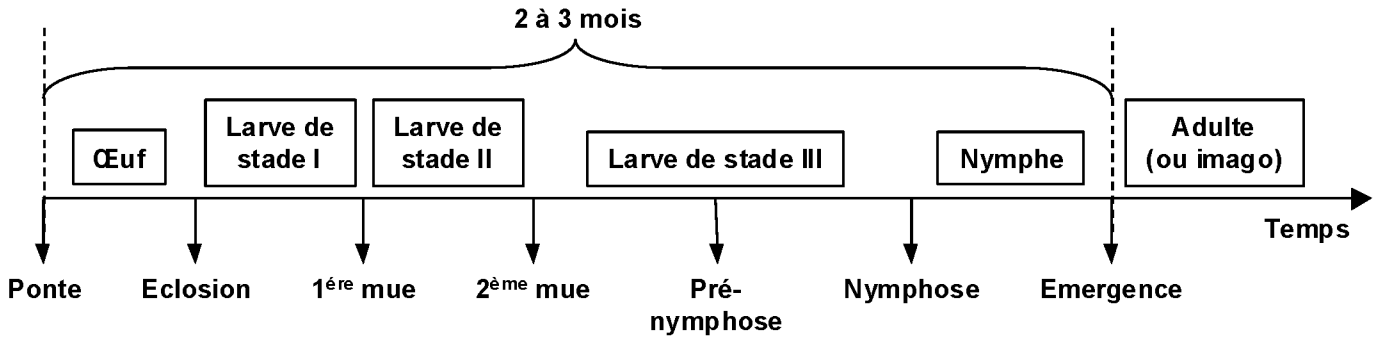


Figure 2. Etapes du développement larvaire des carabidés

C. splendens appartient aux carabes dits de printemps. Chez ce type de carabes, la reproduction a lieu au printemps, peu après la reprise d'activité succédant à la diapause hivernale. La ponte (30 à 40 œufs par femelle) a lieu une dizaine de jours après l'accouplement, pendant une courte période (en avril généralement). Les larves se développent rapidement (2 à 3 mois de l'éclosion des œufs à l'émergence des adultes) pendant la fin du printemps et le début de l'été ; les adultes émergent en juillet. Ces carabes se distinguent des carabes dits d'automne, dont les périodes de reproduction et de développement sont beaucoup plus étalées sur l'année (la reproduction a lieu en été, la ponte en automne, et la vie larvaire est beaucoup plus longue puisque c'est la larve qui passe l'hiver).

L'alimentation de la larve comme de l'adulte est essentiellement composée de mollusques ainsi que de vers et d'insectes.

3. Méthodes d'élevage et de production

Pour démarrer un élevage, il faut récolter des adultes en fin d'hiver (lorsque les individus sont encore dans leur loge hivernale, dans des souches par exemple) ou au tout début de leur période d'activité.

Les individus adultes sont placés dans des boîtes plastiques (35 x 23 x 13 cm) fermées par un couvercle percé pour permettre l'aération et remplies d'une couche (non tassée) d'environ 7 cm d'épaisseur de terre de bruyère, utilisée en horticulture (COMPO SANA ®, Roche-lès-Beaupré, 25220, France, pH : 4,81, matière organique : 18.98%, CEC : 15.5 meq/100g). Ce substrat est recommandé pour l'élevage des coléoptères carabidés (Malausa 1977) et a donné toute satisfaction pour les élevages de masse réalisés au laboratoire. Une vingtaine d'individus adultes peut être élevée dans chacune de ces boîtes, en respectant une sex-ratio équilibrée. Il est indispensable de disposer dans les boîtes des morceaux d'écorce ou de bois et de la mousse en

abondance, afin de fournir des refuges aux carabes. De plus, la mousse maintient un degré d'humidité important.

3. 1. Maintenance de l'élevage

3. 1. Elevage d'adultes pour la reproduction

Si l'humidité est maintenue constante par un humidificateur dans la salle d'élevage, 1 à 3 visites par semaine suffisent pour vérifier l'état général des élevages et renouveler la nourriture. Il est préférable de retirer rapidement les individus morts. Chaque semaine (ou plus régulièrement en fonction des besoins de l'expérience), la terre de bruyère doit être fouillée (à l'aide d'une spatule par exemple), après avoir transféré les adultes dans une autre boîte. Les œufs (cylindriques, blancs pâles, longs de 3 à 4 mm et de 1 à 2 mm de diamètre) sont généralement enfouis séparément, entre 2 et 5 cm de profondeur. Très fragiles, les œufs doivent être manipulés avec beaucoup de précaution avec 2 spatules.

3. 2. Eclosion des œufs

Les oeufs, immédiatement après prélèvement, sont conservés individuellement dans des boîtes de Pétri au fond desquelles 2 à 3 couches de papier absorbant humidifié ont été déposées. Les boîtes doivent être surveillées tous les jours ou tous les 2 jours et conservées dans une salle ou un placard humide, tempéré et obscur. L'assèchement du papier conduit à la mort des œufs en quelques heures. Juste après éclosion, la larve de stade I est claire et ne se pigmente en une couleur noire brillante qu'après quelques heures. A la fin de cette phase, les larves peuvent être transférées dans des boîtes d'élevage.

3. 3. Elevage des larves

L'élevage des larves doit préférentiellement être fait individuellement. Les pertes par cannibalisme dans des élevages de groupes peuvent être élevées (le cannibalisme semble moins fréquent chez les adultes). Pour l'élevage individuel, des demi-bouteilles d'eau minérale remplies de 7 cm de terre de bruyère conviennent très bien. Il faut, comme dans les boîtes d'adultes, y mettre des morceaux d'écorce et de la mousse. Le couvercle peut être constitué d'une boîte de Pétri percée mais les risques d'évasion sont mieux prévenus (et l'aération bien meilleure) en maintenant un carré de grillage en fibre de verre (maille 1 mm) sur les bouteilles grâce à un élastique. Pour assurer un développement larvaire optimal, le soin aux larves doit être effectué 3 fois par semaine. A l'occasion des visites, il faut renouveler la nourriture et éventuellement soulever les morceaux d'écorce sous lesquelles les larves effectuent généralement leurs mues (elles sont cependant parfois enterrées plus profondément dans le sol). Lors des mues et tout particulièrement lors de la nymphose, il est impératif de manipuler les boîtes avec beaucoup de précaution. Si la larve bascule sur le coté, la mue et la survie de l'animal sont compromises.

3. 2. Paramètres d'environnement

3. 2. 1. Température

Les boîtes sont conservées dans une salle de culture à 20 ± 2°C.

3. 2. 2. Photopériode

Une photopériode de 12 heures de jours et 12 heures de nuit est recommandée pour ce type de carabes (Malausa 1977) et permet une reproduction et une croissance normale sinon optimale.

3. 2. 3. Hygrométrie

L'hygrométrie est assurée par un humidificateur dans la salle d'élevage.

3. 2. 4. Nourriture

Naturellement héliciphages, les carabes peuvent être nourris avec des escargots vivants, provenant de la nature ou d'un élevage réalisé en parallèle. *H. aspersa* convient très bien. Il faut éviter les espèces sécrétant trop de mucus, car les carabes ne parviennent pas à les tuer. Il faut, bien entendu, adapter la taille de l'escargot à la taille des individus élevés (adultes et larves de tel ou tel stade). Les carabes consomment le plus souvent l'ensemble des tissus (pied et viscères), laissant une coquille entièrement vide. Les proies vivantes présentent l'avantage, par rapport à des morceaux de viandes, de ne pas pourrir. Les carabes sont alimentés en eau en plaçant de petits morceaux de pommes dans les boîtes d'élevage. Ces morceaux de pommes ont également l'avantage d'attirer les escargots au sol et de les mettre ainsi à portée des carabes.

ANNEXE 3. A.

Techniques d'extractions chimiques simples ou multiples

Extractants utilisés	Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
			Disponibilité environnementale	
$MgCl_2$, 1,0 M NaOAc, 1,0 M NH_2OHHCl, 0,04 M HNO_3 0,02 M et H_2O_2 $HClO_4$, HF, HCl 12 N	Sols agricoles contaminés par des activités minières (Pologne), effet du pH étudié	Cd, Pb, Zn	Cd sous forme résiduaire à faible concentration, fraction résiduaire décroît avec l'augmentation de la concentration totale, fraction échangeable dominante dans les sols contaminés Fraction résiduaire du Pb toujours faible, fraction échangeable augmente avec la concentration totale Conclusions : - les ETM sont plus facilement mobilisés, donc potentiellement disponibles, dans des sols contaminés - les données de pH montrent qu'il est nécessaire de maintenir les pH des sols contaminés élevés pour limiter leur disponibilité	(Chlopecka *et al.* 1996)
Procédure simplifiée ($CaCl_2$ 0,01 M, DTPA 0,05 M) et 2 procédures complexes à 5 extractants	Zone minière Aciérie Bord d'autoroute	Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	Disponibilité décroissante : Cd > Pb > Zn ≈ Cu >Mn > Ni > Fe ≈ Cr Différences entre sols mais mobilité supérieure du Cd puis du Pb et du Zn toujours observée	(Maiz *et al.* 1997)
$CaCl_2$ 0,01 M	7 sols (6 acides et 1 calcaire) artificiellement contaminés par Pb, Zn et Cu, pH expérimentalement modifié par addition d'acide et analyse après 40 jours des concentrations en solution	Cu, Zn	Solubilité du Pb, Zn et Cu augmente avec la décroissance du pH Relation mathématique entre solubilité et pH similaire pour les 6 sols acides, suggérant que la solubilité est contrôlée par les mêmes paramètres Détermination d'un pH "critique" en dessous duquel la solubilité augmente beaucoup : 5,2 pour le Pb, 6,2 pour le Zn et 5,5 pour le Cu	(Martinez et Motto 2000)
Procédure d'extraction séquentielle complexe avec 7 extractants	Etude de l'adsorption de ^{109}Cd et de ^{65}Zn dans un sol en fonction de la teneur en MO et de la température + utilisation d'un modèle mathématique pour calculer les cinétiques de transfert entre 3 compartiments (soluble à l'eau / adsorbé réversiblement / adsorbé irréversiblement)	Cd, Zn	Adsorption rapide des 2 ETM : moins de 1% des ETM introduits au début de l'expérience est retrouvé dans la fraction F1 et moins de 10% du ^{109}Cd et 5% du ^{65}Zn dans la fraction F2, après 30 min. Une lente diffusion des isotopes vers des fractions plus inertes est observée en fonction du temps : la mobilité du Cd et du Zn diminue avec le temps, ce processus est facilité par la température L'addition de MO mobilise les ETM mais la mobilisation diminue en fonction du temps et de l'augmentation de la température	(Almas *et al.* 2000; Almas *et al.* 1999)

Annexe 3. A. Suite

Extractants utilisés	Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
			Biodisponibilité (plantes)	
DTPA NH_4NO_3	2 sols dont le pH est artificiellement modifié par ajout de $CaCO_3$ ou H_2SO_4 3 plantes (blé, carotte, laitue)	Cd	Concentration en Cd dans les plantes diminuent avec l'augmentation du pH pour les 2 sols mais les différences ne sont significatives que pour la carotte et le blé Effet du pH plus important sur un des 2 sols Concentrations de Cd extraites par les 2 extractants diminuent avec l'augmentation du pH Aucun des 2 extractants ne permet de prédire efficacement la concentration en Cd dans la plante	(Singh *et al.* 1995)
- Na_2-EDTA 0,01M + CH_3COONH_4 1M -DTPA 0,005M + TEA 0,1M + $CaCl_2$ 0,01M - CH_3COONH_4 1M - $CaCl_2$ 0,01M	Sols de vignobles du sud de la France, 9 plantes collectées	Cu	Concentrations en Cu extraites par les 3 premiers extractants hautement corrélées avec les concentrations totales mais faiblement avec les concentrations dans les plantes Concentrations obtenues par le $CaCl_2$ corrélées avec les plantes pour les sols à pH neutres et acides	(Brun *et al.* 1998)
$CaCl_2$ 0,1 M HNO_3 et $HClO_4$	Sol agricole amendé pendant plusieurs dizaines d'années par des boues de station d'épuration (STEP) 8 plantes cultivées dont la carotte, l'orge ou les betteraves rouge et à sucre	Cd, Zn	Décroissance rapide des concentrations en Zn et Cd dans les sols après les amendements amendés mais dus à des mouvements latéraux Extractabilité du Zn et du Cd supérieure dans les sols amendés par des boues de STEP que par du fumier ou des fertilisants Extractabilité du Zn et du Cd supérieure dans les sols amendés comparés aux sols non amendés Fluctuations de cette extractabilité selon les années mais pas de tendance nette à la diminution ou l'augmentation, même plusieurs années après les applications Corrélations linéaires entre les concentrations en Zn et Cd dans les tissus de 8 plantes cultivées et les concentrations totales dans les sols Grandes différences dans les transferts entre plantes et entre années	(McGrath *et al*. 2000)
0,01M $CaCl_2$	17 sols naturels (Hollande) et 2 sols artificiels exp. contaminés Culture de laitue *Lactuca sativa*	As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Phytotoxicité observée dans les sols dont le pH de l'eau interstitielle est inférieur à 4,8 L'absorption des ETM, dépendant de l'ETM et du sols considérés, est fortement corrélée à la quantité d'eau transpirée par la plante et par la disponibilité dans l'eau interstitielle Pas d'accumulation nette d'As, Cr, Ni et Pb Les concentrations en Cd varient beaucoup en fonction des sols alors que celle de Zn et de Cu semblent régulées L'extractant $CaCl_2$ semble être le meilleur descripteur de la capacité du sol, ce qui a permis de développer des modèles permettant de prédire les concentrations à l'équilibre dans les plantes Les auteurs concluent que le Cd est l'ETM le plus préoccupant en terme de transfert potentiel dans la chaîne alimentaire car c'est le seul métal qui peut poser un risque pour la santé humaine (ou animale) à des concentrations non directement phytotoxiques	(Peijnenburg *et al.* 2000)

Annexe 3. A. Suite et fin

Extractants utilisés	Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
		Biodisponibilité (animaux)		
Acétate d'ammonium – EDTA Extraction à l'eau $CaCl_2$	5 sols pollués par la proximité d'une mine de Pb et de Zn (France) Exposition d'*Eisenia andrei* pendant 6 semaines	Cd, Pb, Zn	Pas de régressions linéaires significatives entre les concentrations totales en ETM dans les sols et les concentrations dans les tissus Concentrations en Cd plus élevées dans les tissus que dans les sols Concentrations extraites par l'eau sont en-dessous des seuils de détection pour le Pb et le Cd Les extractants utilisés ne corrèlent pas avec les concentrations dans les tissus	(Grelle et Descamps 1998)
Acide acétique DTPA	60 sols (France) Prélèvements d'annélides	Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	Les concentrations totales corrèlent assez bien avec les concentrations dans les tissus Les concentrations des extraits ne donnent pas de meilleures corrélations avec les concentrations dans les tissus Corrélation négative entre le pH des sols les concentrations en Pb et Zn dans les tissus, corrélation positive pour le Ca Pas de corrélations entre les concentrations en ETM dans les tissus et les teneurs en MO dans les sols (sauf pour le Fe)	(Abdul Rida et Bouché 1997)

ANNEXE 3. B.

Etudes de la solution du sol

Technique utilisée	Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Concentrations de la solution du sol obtenue par déplacement à l'eau, rhizosphérique ou non, spéciation	10 sols européens, culture de radis	Cd, Zn	Concentrations en Cd et Zn diminuent pendant la croissance des plantes Spéciation différente du Cd et du Zn entre la solution du sol rhizosphérique ou non Concentrations en Cd dans les plantes mieux corrélées avec les concentrations de Cd total ou de Cd^{2+} dans la solution rhizosphérique qu'avec les concentrations totales, faibles corrélations avec la solution du sol non rhizosphérique Aucun de ces paramètres individuels ne permet une bonne corrélation avec les concentrations en Zn dans les plantes, des corrélations multiples permettent d'obtenir de bonnes corrélations Faible variabilité de la solubilité du Cd entre les sols, importante pour le Zn Corrélations pas meilleures avec la concentration en ions métallique qu'avec la concentration en ETM soluble totale : spéciation pas utile pour l'évaluation de la biodisponibilité	(Lorenz *et al.* 1997)
Echantillonneur plastique poreux couplé à une technique de spéciation "cation resin equilibration"	Un sol dont le pH a été modifié *in situ* par chaulage : 4,5; 5,1; 6,3 et 7	Cd, Zn	Augmenter le pH réduit la solubilité du Cd et du Zn Proportion de Cd^{2+} par rapport au Cd total soluble supérieure à 80% pour les pH acides, égale à 50% pour pH 7 Proportion de Zn^{2+} par rapport au Zn total soluble supérieure à 80% quel que soit le pH	(Knight *et al.* 1998)
	Même sol contaminé expérimentalement avec du Cd ou $ZnSO_4$ Mêmes sol amendé par des boues de station d'épuration pendant 20 ans		Concentrations en Cd total soluble et Cd^{2+} supérieures dans les sols amendés par des boues comparés aux sols contaminés par $CdSO_4$ Inverse pour le Zn → comportement différent du Cd et du Zn, pourtant considérés très proches chimiquement → Cd plus disponible dans le sol amendé que dans le sol artificiellement contaminé	
	Autres sols contaminés provenant de divers sites industriels		Grandes variations dans la solubilité du Cd Concentrations en Cd soluble plus importantes dans les sols industriels que dans le sol contaminé $CdSO_4$ Grandes variations dans la solubilité et la forme du Zn	
	Conclusions générales : difficulté de comparaison des sols lorsque l'origine de leur contamination est différente, sols contaminés expérimentalement peuvent conduire à des extrapolations fausses sur les risques de sols pollués *in situ*			

Annexe 3. B. Suite et fin

Technique utilisée	Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Analyses des concentrations de la solution du sol obtenue par centrifugation	30 sols forestiers et agricoles (Hollande)	Cd, Cu, Zn	Décroissance des concentrations totales avec la profondeur pour les 2 types de sols Concentrations totales en Cd, Cu et Zn supérieures dans les sols agricoles à cause de l'utilisation de fertilisants Concentrations en Cd et Zn solubles pourtant supérieures dans les sols forestiers (pH inférieurs aux sols agricoles, souvent chaulés), augmentant beaucoup pour des pH inférieurs à 5,5 Concentrations en Cu solubles supérieures dans les sols agricoles, augmentent avec la matière organique dissoute Variations des Kd expliqués à 49% pour le Cu, 79% pour le Cd et 83% pour le Zn par le pH et la CEC	(Römkens et Salomon 1998)
Concentrations et spéciation des ETM dans la solution du sol obtenue par centrifugation + concentrations totales	Sols prélevés sur des transects de 100m transversaux à des voies de chemin de fer abandonnées	Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	Les concentrations en ETM sont très faibles dans la solution du sol avec 31 à 59 % de Cd^{2+} Le Cu, le Pb et le Zn sont majoritairement sous forme de complexes organiques et le Ni sous forme inorganique Le pH et les concentrations totales en ETM sont corrélés avec les concentrations en ions libres, sauf pour le Cd L'absorption des ETM par les plantes n'a pu être prédite de manière satisfaisante par aucune des 3 concentrations mesurées (ions libres, ETM dissous, ETM totaux)	(Ge *et al.* 2000)
Concentrations totales et en solution, labilité mesurée par "anodic stripping voltametry" (ASV)	Sols amendés 18 ans auparavant avec 3 boues de STEP stabilisées avec des sels de fer, d'aluminium et par chaulage	Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Solubilité des ETM généralement corrélée linéairement avec les concentrations totales, la nature des boues épandues affectant le Kd de certains ETM En général, plus de 75% du Cu et du Pb étaient non-labiles en ASV car fortement complexés avec la MO soluble Plus faible complexation (en général < 50%) dans des complexes organiques non-labiles pour le Cd et le Zn Corrélation linéaire forte entre le Cd total et le S dans les sols, suggérant une liaison du Cd avec des composés soufrés	(McBride *et al.* 2000)
Analyses des concentrations de la solution du sol obtenue par centrifugation, spéciation évaluée par modélisation (GEOCHEM)	Transect proche d'un site de stockage de fertilisant : étude d'un gradient de P	Cd	Effet saisonnier sur la composition chimique de la solution du sol Moins de 1% du Cd est en solution Le Cd^{2+} représente 55 à 90% du Cd total soluble, présence de $CdCl_2$ et de $CdSO_4$ L'application de fertilisant augmente les concentrations de P soluble et abaisse fortement le pH ce qui expliquerait l'augmentation mesurée des concentrations de Cd, As, Cr et Pb solubles L'application du fertilisant augmente également les teneurs totales en Cd et Zn	(Taylor et Percival 2001)
"Biodétecteur microbien"	Sols enrichis en Ni et en divers additifs limitant la mobilité du Ni	Ni	Souche de *Ralstonia eutropha* génétiquement modifiée pour produire une réponse bioluminescente proportionnelle aux concentrations en Ni^{2+} et Co^{2+} Réponse proportionnelle et spécifique Corrélation linéaire entre ces données et l'accumulation de Ni dans certains tissus de plantes cultivées (maïs, pomme de terre)	(Tibazarwa *et al.* 2001)

ANNEXE 3. C.

Travaux basés sur la théorie de partition à l'équilibre

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
		Sans évaluation biologique complémentaire	
Etude de l'adsorption du Cd dans 15 sols	Cd	L'adsorption du Cd suit la relation de Langmuir et augmente avec le pH entre pH 3 et pH 10 A pH constant et concentration en Cd égale, l'adsorption la plus grande est observée pour des sols riches en MO Un modèle de coefficient de partition a été testé : à pH constant, les coefficients de partition expérimentaux sont hautement corrélés à ceux calculés par le modèle Le coefficient de détermination de la corrélation est plus élevé lorsque le coefficient de partition est corrigé avec les teneurs en MO des sols	(Lee *et al.* 1996)
Prélèvements de 20 sols (Hollande), détermination des Kp (coefficient de distribution phase solide / phase liquide (L/kg), ratio d'un ETM extrait par HNO_3 concentré sur sa concentration dans l'eau interstitielle) et relations avec les caractéristiques physico-chimiques des sols	As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Le facteur qui explique le plus les variations de la distribution des ETM est : - le pH pour le Cd, Cr et Pb - la concentration en Fe pour le Cu et As - DOC (carbone organique dissout) pour le Ni Des estimations raisonnablement précises des Kp peuvent être faites avec le pH pour tous les ETM sauf l'As L'addition d'autres variables peut améliorer les corrélations pour le Cr, Cu, Ni et Pb Pour Cd et Zn, seul le pH est significatif pour l'estimation du Kp Les modèles prédisent correctement les Kp pour les sols hollandais mais sont beaucoup moins prédictifs pour les sols anglais (données de la littérature) Pour des pH faibles, d'autres caractéristiques, comme le contenu en MO, peuvent être importantes	(Janssen *et al.* 1997a)
		Avec évaluation biologique (relation avec les concentrations dans les tissus d'organismes exposés)	
Exposition d'*Eisenia andrei* aux sols utilisés par (Janssen *et al.* 1997a), recherche de relations entre les paramètres qui conditionnent la distribution à l'équilibre et l'absorption par *E. andrei*	As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Les facteurs de bioaccumulation pour l'As, Cd, Cu et Zn sont expliqués par les mêmes caractéristiques que celles qui expliquent les variations des coefficients de distribution entre la phase solide et la phase liquide → les auteurs suggèrent que l'"absorption des ETM est soit directe par l'eau interstitielle, soit indirecte grâce à une voie d'absorption intimement corrélée avec l'eau interstitielle" Les modèles développés pour prédire les facteurs de bioaccumulation à partir de caractéristiques édaphiques simples à obtenir donnent des résultats satisfaisants sur les sols considérés	(Janssen *et al.* 1997b)

Annexe 3. C. Suite et fin

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Exposition d'*Eisenia andrei* à 20 sols (Hollande) : déterminations des relations mathématiques existant entre des caractéristiques simples des sols et : - les concentrations internes à l'équilibre - les facteurs de bioaccumulation - les taux (constantes) d'absorption et d'accumulation des ETM en fonction du temps L'objectif est de développer des modèles permettant de prédire la biodisponibilité en fonction des caractéristiques des sols	As, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn	Les auteurs partent de l'hypothèse que la fraction biodisponible est la fraction soluble "pore-water hypothesis" ou "pore-water-mediated uptake" Différence nette dans les "patterns" d'absorption entre le Cr, Cu, Ni et Zn et l'AS, Cd et Pb La concentration à l'équilibre doit être préférée pour une interprétation valide Les concentrations en Cr, Cu, Ni et Zn augmentent rapidement, l'état d'équilibre est atteint rapidement Pour ces ETM, des modèles ont été établis qui permettent de prédire la concentration à l'équilibre sur la base des concentrations totales en ETM, avec apparemment une faible influence des caractéristiques des sols (le contraire a été observé pour *Enchytraeus crypticus*) → les auteurs suggèrent que ces modèles, ainsi que les "internal critical body concentrations" pourraient être utilisés de manière pratique en évaluation du risque, des validations sont néanmoins requises pour d'autres espèces et d'autres sols → les auteurs suggèrent d'étudier la diversité des voies d'exposition chez les invertébrés terrestres et de grouper les espèces en fonction de leur "profil d'absorption/exposition" Pour AS, Cd et Pb, les "patterns" sont très différents selon les sols, l'état d'équilibre pour ces 3 ETM demande une durée supérieure à 3 semaines dans la plupart des sols Des modèles (plus complexes) ont cependant été proposés, l'acidité du sol étant le facteur-clé expliquant les différences de disponibilité de ces 3 ETM → les auteurs expliquent que des similarités entre les résultats obtenus pour *E. andrei* et pour *E. crypticus* tendent à prouver que la pore-water hypothesis est valide pour ces 2 espèces et pour l'As, Cd et Pb Une comparaison avec le substart artificiel OCDE montre que celle-ci n'apporte pas d'informations extrapolables aux sols naturels	(Peijnenburg *et al.* 1999a; Peijnenburg *et al.* 1999b)

ANNEXE 3. D.

Techniques de dilution isotopique

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Technique isotopique (^{43}K et ^{32}P) avec CEI et modèle mathématique	P, K	En conditions normales, les plantes ne prélèvent le phosphore et le potassium que dans le compartiment isotopiquement échangeable	(Fardeau *et al.* 1979b; Fardeau et Jappé 1976)
Technique isotopique, mesure des activités spécifiques (AS) uniquement 8 plantes : colza, trèfle, laitue, bette, ray-gras, 2 cultivars de blé, capeweed	Zn, Cd	Les valeurs d'AS sont identiques entre plantes pour le Zn Pour le Cd, l'AS du colza est significativement supérieure à celle des autres plantes, les auteurs concluent que toutes les plantes ont eu accès au pool non-isotopiquement échangeable de Cd, sauf le colza. En absence de comparaison avec l'AS du sol, cette conclusion nous semble infondée.	(Hamon *et al.* 1997)
Technique isotopique (^{63}Ni) avec CEI et modèle mathématique + extractant chimique (DTPA) 2 sols, trèfle violet	Ni	Le Ni absorbé par les plantes provient du pool isotopiquement échangeable Bonne corrélation avec l'extraction au DTPA	(Echevarria *et al.* 1997; Echevarria *et al.* 1998)
Technique isotopique, mesure de *L* uniquement Sol amendé à différents taux de fertilisant superphosphate amenant du Cd en impureté, blé	Cd	Augmentation des concentrations en Cd du sol conduit à une augmentation des concentrations en Cd dans la plante La plupart du Cd est non disponible pour les plantes (mais les concentrations en Cd sont très faibles, < à 1µg.g^{-1})	(Hamon *et al.* 1998)
Technique isotopique (^{65}Zn) avec cinétique d'échange isotopique (CEI) de 100 min et modèle mathématique + extractant chimique 5 sols pollués et 6 non pollués	Zn	L'utilisation du modèle mathématique développé par Fardeau basé sur les expériences de CEI de 100 min. permet une bonne prédiction du Zn échangeable sur 15 jours (sauf pour les sols de pH élevés et dont les concentrations en Zn sont faibles) La plupart du Zn est lentement ou pas du tout échangeable dans ces sols La quantité de Zn échangeable est proche de celle extraite par DTPA 0,005M + $CaCl_2$ 0,01M + TEA 0,1M	(Sinaj *et al.* 1999)
Technique isotopique (^{109}Cd) avec CEI et modèle mathématique 3 sols pollués et 1 non-pollué, ray-gras, laitue et *Thlaspi caerulescens*	Cd	Mêmes valeurs de composition isotopique pour les 3 espèces de plantes avec, pourtant, des prélèvements de Cd très différents Compositions isotopiques des plantes et du sol identiques montrant que les plantes – même l'hyperaccumulateur *T. caerulescens* – prélèvent le Cd dans le pool isotopiquement échangeable Malgré un pH élevé, plus de 50% du Cd est isotopiquement échangeable sur 90 jours	(Gérard *et al.* 2000)
Technique isotopique, mesure de *E* immédiate après équilibration + extraction au $CaCl_2$ 6 sols pollués (boues de STEP et industries), 6 populations de *Thlaspi caerulescens* et 1 espèce non-hyperaccumulatrice (*Lepidium heterophyllum*)	Cd	*E* varie de 4,9 à 49% du Cd total des sols *L* en général bien corrélé à *E* mais également aux extraits au $CaCl_2$ Les auteurs concluent qu'aucune population des plantes étudiées n'a mobilisé du Cd dans le pool non échangeable des sols étudiés	(Hutchinson *et al.* 2000)

Annexe 3. D. Suite et fin

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Technique isotopique utilisant des isotopes stables + extraction chimique à 5 extractants 4 sols pollués par des sources différentes	Cd	Difficile de généraliser la labilité du Cd d'un sol à l'autre et d'une source de contamination à une autre Le Cd labile représente de 35 à 49% du Cd total pour 3 des sols, 13% seulement pour le dernier (le Cd serait lié dans la sphalérite) Pour les 3 premiers sols, 85 à 98% du Cd labile est compris dans les fractions chimiques 2 et 3 (faiblement adsorbé/lié aux carbonates et oxydable) Les fractions extraites chimiquement ne montrent pas une bonne correspondance avec la taille du pool isotopiquement échangeable Les auteurs concluent que les extractions chimiques ne peuvent prédire que médiocrement la biodisponibilité	(Ahnstrom et Parker 2001)

ANNEXE 3. E.

Facteurs affectant la biodisponibilité

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	Espèce(s) étudiée(s)	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Matrice ISO avec variation de pH et de teneur en MO	*Folsomia candida*	Cd	A concentration totale identique, les concentrations de Cd soluble augmentent avec la diminution du pH et de la teneur en MO dans le sol Pas de tendance cohérente entre les différents traitements dans l'accumulation du Cd 2 conclusions majeures : la biodisponibilité du Cd pour cette espèce n'est pas prédite par les concentrations de Cd en solution sensibilité au Cd n'est pas seulement déterminée par la concentration interne en Cd mais également par les propriétés physico-chimiques des sols	(Crommentuijn *et al.* 1997)
Sol sableux naturel contaminé expérimentalement à 10 $\mu g.g^{-1}$ par du Cd, manipulation de la concentration en Cd soluble par ajout de $Ca(OH)_2$ et de MnO_2	*Lumbricus rubellus*	Cd	Ajout de $Ca(OH)_2$ et de MnO_2 divise par 25 la concentration en Cd en solution Les concentrations internes dans les annélides sont divisées par 1,3 seulement pour le $Ca(OH)_2$ et par 2,5 pour le MnO_2 Médiocre corrélation entre les concentrations internes et les concentrations en Cd soluble, bonne corrélation lorsque le pH est ajouté comme variable explicative, ces corrélations pouvant donc être appliquées pour des objectifs appliqués Absorption intestinale prédomine, le TEA simulerait correctement la disponibilité du Cd dans l'intestin et pourrait être utilisé en évaluation du risque Concluent que : les absorptions cutanée et intestinale (majoritaire) doivent être considérées par 2 approches différentes la théorie de partition à l'équilibre n'est pas directement applicable aux métaux	(Oste *et al.* 2001a)
Digestion de sédiments pollués par du Zn ou du benzo-[a]-pyrène par les liquides digestifs de 18 organismes marins Etude de la biochimie des liquides digestifs (activité enzymatique, surfactance, pH, acides aminés, lipides, carbone organique)	18 espèces marines	Zn, BaP	Solubilisation des polluants égale à celle produite par l'eau de mer à supérieure (de plus d'un ordre de grandeur) mais inférieure à celle obtenue avec les principaux extractants chimiques classiques Pas de corrélation entre la "force" des liquides digestifs et leurs pH Différences importantes en fonction des groupes considérés	(Mayer *et al.* 2001)
Matrice ISO modifiée : tourbe remplacée par 6 autres types de MO et kaolinite remplacée par 2 autres types d'argile ; pH maintenu constant	*Enchytraeus albidus*	Zn, Cd	La DL50 à 14 jours varie de 83 à 1140 $\mu g.g^{-1}$ pour le Zn et de 55 à 704 pour le Cd en fonction du type de MO et d'argile considéré La CEC est un meilleur paramètre pour estimer la biodisponibilité que la simple teneur en argile ou en MO car elle prend intrinsèquement en compte leur nature (mesure du nombre de sites d'adsorption potentiels)	(Lock et Janssen 2001b)
1 sol expérimentalement contaminé peu avant l'expérience et un sol prélevé *in situ*, contaminé de long terme	*Eisenia fetida*	Cu	Le sol fraîchement contaminé est beaucoup plus toxique que le sol contaminé depuis longtemps sur tous les paramètres étudiés (sauf survie et masse fraîche des cocons, paramètres très peu sensibles dans les 2 cas) : croissance et reproduction, stabilité des membranes lysosomales (mesurée par le test "neutral red retention time")	(Scott-Fordsmand *et al.* 2000)
Comparaison de la toxicité du Cu entre des sols expérimentalement contaminés depuis plus ou moins longtemps et un sol prélevé *in situ* et contaminé depuis longtemps	*Folsomia fimetaria*	Cu	Pas d'effet clair de l'âge de la contamination pour les sols expérimentalement contaminés Sol fraîchement contaminés beaucoup plus toxiques que le sol prélevé *in situ* et contaminé depuis longtemps (cible : reproduction) si l'on considère les concentrations totales Les différences sont considérablement diminuées en exprimant la toxicité par rapport aux concentrations extraites par le $CaCl^2$ 0,01M	(Bruus Pedersen et Van Gestel 2001)

Annexe 3. E. Suite

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	Espèce(s) étudiée(s)	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Exposition à des sols contaminés expérimentalement *in situ* par différentes concentrations de Cu et dont le pH est modifié par chaulage Modification du l'humidité du sol Concentrations totales et extraction au $CaCl_2$ 0,01M, eau de pluie, solution du sol obtenue par centrifugation	*Folsomia candida*	Cu	Concentrations totales prédisent le mieux les concentrations chez les adultes, ajouter le pH comme second facteur améliore la valeur prédictive L'humidité du sol a un effet important sur la fitness des collemboles et sur leur accumulation de Cu, par contre, pas de corrélation entre l'accumulation en Cu et les effets Les résultats n'ont pas montré quelle(s) voie(s) d'absorption est(sont) majoritaire(s) chez le collembole Les auteurs concluent que la pore-water hypothesis n'est pas valide dans ce cas	(Bruus Pedersen *et al.* 1997)
Variation de l'humidité du sol (matrice ISO)	*Folsomia candida*	Cd	Sorption du Cd (estimé par sa concentration en solution) n'est pas significativement affectée par l'humidité du sol Effet de l'humidité sur la toxicité du Cd (estimée par la masse des collemboles) Reproduction très affectée par l'humidité chez les témoins mais la EC50reproduction n'est pas affectée chez les traités Concentrations en Cd pas affectée significativement par l'humidité	(Van Gestel et van Diepen 1996)
Exposition à 1 sol contaminé par du Cu à différentes températures constantes ou à des alternances de température	*Folsomia candida*	Zn	Performances des collemboles influencées par la température Effet de la concentration pas significatif Concentrations en Zn plus élevées chez les organismes exposés à des alternances de température qu'à des températures constantes Une diminution de la température conduit à une augmentation de la sensibilité des collemboles pour les cibles croissance et reproduction Pourtant, les animaux sont moins sensibles à faible température pour la cible mortalité La concentration en Zn augmente lorsque la température d'exposition diminue Les auteurs concluent que, la sensibilité de *F. candida* au Zn variant avec la température, celle-ci doit être prise en considération dans les tests	(Smit et Van Gestel 1997)
EC50 production de juvéniles déterminées chez des collemboles exposées à des matrices ISO contaminées Variation de la température	*Folsomia candida*	Cd, Cu, Pb, Zn	Trop peu de reproduction à 25°C pour calculer les EC50 EC50 pour Cd, Cu et Zn identiques à 20 et 15°C EC50 pour Pb très supérieures Le Zn étant présent en beaucoup plus grande concentration dans les sites pollués par les ETM que le Cd (au moins 50 fois), le Zn pose sans doute plus de problèmes environnementaux que le Cd	(Sandifer et Hopkin 1997)
Modification de la composition de la matrice ISO (pH, argile, MO, humidité, FeO_2, K^+, Mg^{2+})	*Enchytraeus albidus*	Cd, Zn	Les différences dans la toxicité des sols sont majoritairement déterminées par le pH, la teneur en MO et la CEC La toxicité diminue avec l'augmentation du pH et de la CEC	(Lock *et al.* 2000)
EC50 production de juvéniles déterminées chez des collemboles exposées à des matrices ISO contaminées Variation du pH	*Folsomia candida*	Cd, Cu, Pb, Zn	Contrairement à la plupart des études précédentes, pas de tendance claire des EC50 à augmenter avec l'augmentation du pH Le Zn étant présent en beaucoup plus grande concentration dans les sites pollués par les ETM que le Cd (au moins 50 fois), le Zn pose sans doute plus de problèmes environnementaux que le Cd	(Sandifer et Hopkin 1996)
Exposition à des sols pollués ou non (gradient de pollution) et expérimentalement contaminés Exposition au Cu dans l'eau ou la nourriture	*Folsomia candida* *F. fimetaria*	Cu	Accumulation du Cu depuis les sols exp. contaminés plus importante que depuis la nourriture, accumulation additive quand les animaux sont exposés aux 2 sources Accumulation supérieure depuis les sols exp. contaminés que depuis les sols pollués Pas de différence interspécifique pour l'accumulation depuis les sols alors que *F. candida* accumule plus de Cu que *F. fimetaria* depuis la nourriture Mâles de *F. fimetaria* accumulent plus depuis le sol que les femelles (pas de différences pour l'exposition par la nourriture) Effets observés pour des concentrations internes régulées : remet en cause les relations entre concentrations internes et effets Bonne estimation de la biodisponibilité par extraction au $CaCl_2$ pour *F. candida*, pas pour *F. fimetaria*	(Bruus Pedersen *et al.* 2000)

Annexe 3. E. Suite

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	Espèce(s) étudiée(s)	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Sols contaminés ou non, amendés par chaulage ou addition de béringite (augmente le pH également)	*Beta vulgaris* *Eisenia veneta* *Lumbricus rubellus*	Cd, Zn	Concentrations en Cd et Zn extraites par le $CaCl_2$ inférieures dans les sols amendés Absorption des 2 ETM très diminuée pour les plantes cultivées sur les sols amendés Absorption peu ou pas diminuée par les traitements pour les 2 ETM pour les annélides, même lorsque les concentrations extraites au $CaCl_2$ diminuent de 90%	(Oste *et al.* 2001b)
2 sols non pollués contaminés expérimentalement par du $ZnCl_2$ Sol pollués par la proximité d'une fonderie (gradient de pollution)	*Folsomia candida*	Zn	Sols contaminés expérimentalement ont un effet important sur la reproduction, pas d'effet sur la reproduction Aucune relation entre les concentrations en Zn des sols pollués et la reproduction et la croissance Concentrations en Zn soluble plus importante dans les sols expérimentalement contaminés Cependant, les différences de concentrations en Zn solubles ne peuvent expliquer complètement les différences de toxicité Les auteurs suggèrent d'utiliser les "pore-water concentrations" D'autres facteurs que la biodisponibilité des polluants (pH du sol par exemple) peuvent affecter les cibles (croissance, reproduction) Le choix du substrat et du sel utilisés est important	(Smit et Van Gestel 1996)
Matrice ISO contaminée avec du Zn, du Cd ou les 2	*Folsomia candida*	Zn, Cd	Solubilité du Cd augmentée par la présence de Zn, la présence de Cd n'a pas d'effet sur la solubilité du Zn Cependant, l'absorption des 2 métaux n'a pas été affectée par la présence de l'autre, suggérant que la solubilité ne détermine pas l'absorption La reproduction est la cible la plus sensible pour les 2 ETM Les effets de la mixture Cd/Zn sont antagonistes sur la croissance alors qu'ils sont additifs sur la reproduction Les interactions Cd/Zn peuvent être antagonistes, synergiques ou additives en fonction de l'espèce considérée	(Van Gestel et Hensbergen 1997)
Toxicité aiguë du Cu dans 3 sols	*Octolasium cyaneum*	Cu	LC50 significativement corrélée avec le contenu en MO des sols Augmenter le contenu en MO d'un facteur 2 augmente la LC50 de 2 également PH du sol et concentration en calcium n'ont pas d'effet sur la toxicité du Cu	(Jäggy et Streit 1982)
Etude de la toxicité du Cd et de 3 composés organiques dans la matrice ISO et 1 sol naturel (pH 4,1 et ajusté à 7) + exposition aux polluants par contact cutané direct sur papier filtre	*Eisenia fetida (andrei)*	Cd chloro-acétamide (CAA) 3,4-dichloro-aniline (DCA) pentachloro-phénol (PCP)	PH du sol influence la toxicité des polluants sauf DCA Etonnant pour CAA qui n'est que faiblement adsorbée dans les sols, en contradiction avec Heimbach et Edwards (1983) qui n'a pas observé d'influence du pH sur la toxicité de ce composé Pour le Cd, adsorption diminue avec la diminution du pH, en accord avec Ma (1982) qui a démontré une accumulation du Cd plus élevée dans des annélides lorsque le pH du sol était bas Diminution de la toxicité du PCP à faible pH expliqué par son faible pKa (4.74) (faible pH → PCP sous forme phénolique, fortement adsorbée) Le protocole "papier filtre" ne prédit aucunement la toxicité des polluants dans les sols	(Van Gestel et van Dis 1988)
Etude de la toxicité du Cu dans un sol sur la reproduction de 2 esp. d'annélides, variation du pH du sol	*Aporrectodea caliginosa* *Lumbricus rubellus*	Cu	*A. caliginosa* plus sensible (50% de diminution pour la production de cocons à pH bas) aux variations de pH que *L. rubellus* dans les sols témoins Effet du pH sur la toxicité du Cu différente selon l'espèce : pour *A.caliginosa*, pH n'influence pas la toxicité du Cu pour *L. rubellus*, EC50(production de cocons) diminue d'un facteur 2 lorsque le pH diminue de 2 unités	(Ma 1988)
Etude de la toxicité du Cu dans 2 sols sur la croissance, la reproduction et la dégradation de litière Sol 1 : pH 4,8 ; OM 5,7% ; argiles 2% Sol 2 : pH 7,3 ; OM 3,4% ; argiles 17% Variation du pH dans le sol 2	*Lumbricus rubellus*	Cu	A concentration égale, effet 2 fois plus important dans le sol 2 que dans le sol 1 (effet attribué à la moindre teneur en MO dans le sol 2) Production de cocons diminue en fonction de la dose aux pH 4,8 et 6,0 alors que la plus forte concentration en Cu n'a pas d'effet sur ce paramètre à pH 7,0 (*L. rubellus* a des performances beaucoup plus élevée dans le sol 2 témoin, Ma (1983), article en Hollandais) Met en évidence l'influence des caractéristiques des sols sur les performances des modèles animaux → effet de ces caractéristiques sur la toxicité des polluants à interpréter avec précaution	(Ma 1984)

Annexe 3. E. Suite

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	Espèce(s) étudiée(s)	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Etude de l'accumulation de 4 ETM en fonction de la teneur en MO, de la CEC et du pH des sols	*Annélides*	Cd, Cu, Pb, Zn	Facteurs de bioaccumulation augmentent d'un facteur 5 lorsque le pH diminue de 6,5 à 4,5 pour le Cd, Pb et Zn PH et CEC sont les paramètres les plus importants déterminants l'absorption par les annélides Pour le Cu, le pH n'est pas important et les concentrations dans les tissus sont plutôt corrélées aux teneurs en MO et aux CEC La MO aurait également une influence sur l'absorption de Pb	(Ma 1982; Ma *et al.* 1983)
Etude de l'accumulation de 4 ETM en fonction de différents paramètres physico-chimiques des sols	*Annélides*	Cd, Cu, Pb, Zn	Relation significative entre les concentrations en ETM dans les tissus et dans les sols (concentrations totales) Les corrélations sont améliorées par les variables pH et CEC pour le Pb, pas pour le Cu et le Zn Les corrélations sont améliorées par la variable teneur en MO pour le Cd	(Morgan et Morgan 1988)
Etude de l'accumulation de 5 ETM en fonction de différents paramètres physico-chimiques des sols	*Annélides*	Cd, Cu, Pb, Se, Zn	Les auteurs concluent que la mesure des paramètres physico-chimiques du sol (pH, CEC, teneur en MO) n'améliorent pas significativement la prédiction des concentrations dans les tissus des annélides à l'exception du pH qui était associé à des concentrations faibles ou fortes pour les ETM étudiés	(Beyer *et al.* 1987)
Tests d'écotoxicité aigus et chroniques dans la matrice ISO et 2 sols + analyse de résultats de la littérature	*Eisenia fetida* *Enchytraeus albidus* *Folsomia candida*	Cd	Même dans la matrice ISO, la toxicité du Cd varie considérablement (EC10 ou 50, LC50) → aucun modèle n'a pu être élaboré pour "normaliser" la toxicité du Cd pour les invertébrés terrestres en prenant en compte les facteurs qui contrôlent la biodisponibilité Contrairement au Zn, les concentrations toxiques pour le Cd sont très supérieures aux concentrations de fond En général, les ratio Zn/Cd dans les sols sont si élevés que le risque de toxicité lié au Zn est beaucoup plus élevé que le risque lié au Cd	(Lock et Janssen 2001a)
Exposition de *L. terrestris* à un sol expérimentalement contaminé, variation du pH L'expérience est menée en "mésocosmes" extérieurs	*Lumbricus terrestris*	Pb	Corrélations linéaires entre les concentrations en Pb dans les tissus et les concentrations dans les sols Pas d'effet significatif du pH sur l'accumulation du Pb mais distribution diffère (plus de Pb dans les muscles et moins dans le ganglion cérébral) L'absorption du Pb est fortement dépendante de la température, particulièrement dans les muscles : les concentrations sont divisées par 2 en période hivernale, sans doute en raison d'une activité de nourrissage réduite Tendance à une accumulation supérieure des juvéniles	(Bengtsson et Rundgren 1992)
Etude de l'influence du pH du sol sur la toxicité de 3 ETM dans un sol sableux	*Dondrobaena rubida*	Cd, Cu, Pb	Extractabilité des Cd et du Pb (acétate d'ammonium, 1M) augmente lorsque le pH diminue, pas d'influence sur le Cu L'absorption des ETM par les animaux est parfois corrélée avec les concentrations extraites, parfois non L'accumulation du Cd et du Pb dans les cocons n'est pas corrélée avec le pH alors que la concentration en Cu est 2 fois plus élevée à pH 6,5 qu'à pH 5,5 La survie des adultes est affectée par les 3 ETM à pH faible La production de cocon est diminuée de moitié lorsque le pH passe de 6,5 à 4,5 Effet hormesis sur la production de cocon par des faibles concentrations en ETM à pH 6,5 L'effet du pH sur l'éclosion des cocons est très important dans les témoins alors que le contraire est observé lorsque les animaux sont exposés à 100 $\mu g.g^{-1}$	(Bengtsson *et al.* 1986)

Annexe 3. E. Suite

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	Espèce(s) étudiée(s)	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Etude de l'influence de caractéristiques de la matrice ISO et de 3 sols naturels sur la toxicité de 7 composés organiques chez 2 espèces d'annélides	*Eisenia andrei* *Lumbricus rubellus*	1,2,3-trichlor oben-zène (TCB), DCA, 5 chlorop hé-nols (dont PCP)	Les différences entre sols disparaissent presque complètement quand les LC50 exprimées en de µg.g^{-1} sols sont recalculées en µg.ml^{-1} en utilisant les coefficients d'adsorption → les auteurs concluent que les données d'adsorption peuvent être utilisées pour extrapoler la toxicité de ces substances pour les annélides entre les différents sols → Comme l'adsorption augmente avec l'augmentation des teneurs en MO, les valeurs de LC50 peuvent être extrapolées entre les sols simplement à partir des différences de teneur en MO Cette approche n'est cependant pas applicable aux composés ionisables comme les chlorophénols Pour ces composés, l'adsorption est également influencée par le pH Si les données sont corrigées en tenant compte de la dissociation, l'adsorption est significativement corrélée avec la lipophilicité → ouvre la voie pour l'extrapolation des données de toxicité aiguë entre sols en utilisant les données d'adsorption calculées au moyen des QSARs → les cibles reproduction et croissance n'ayant pas les mêmes optimaux par rapport aux caractéristiques des sols, les auteurs suggèrent d'inclure les 2 paramètres dans les études de toxicité	(Van Gestel et Ma 1988, 1990; Van Gestel *et al.* 1991)
Etude de l'influence de caractéristiques de la matrice ISO sur la toxicité de 2 composés organiques Variations de la teneur en MO, de la nature et de la quantité d'argiles, du pH, de l'humidité du sol	*Eisenia fetida*	Chloroa cé-tamide Benom yl	Peu d'influence des teneurs en MO, de la nature et de la quantité d'argiles et du pH Faible influence de l'humidité du sol et de la température Pas étonnant pour la chloroacétamide, substance de référence des tests OCDE et CEE, en raison de sa faible adsorption dans les sols (artificiels au moins), pourtant résultats en contradiction avec ceux obtenus par van Gestel et van Dis (1988) Pour le bénomyl, résultats étonnants car contradictoires avec ceux obtenus par Lofs-Holmin (1980) qui montrent que l'adsorption de ce composé sur la MO et l'argile influencent sa toxicité	(Heimbach et Edwards 1983)
Effet du lindane dans les sols 1 et 2 de l'étude de (Ma 1984) sur la croissance, la reproduction et la décomposition de la litière	*Lumbricus rubellus*	Lindan e	Lindane plus toxique dans le sol 2, différence attribuée à la différence de teneur en MO	(Ma 1983)
Etude de l'influence du bénomyl sur la reproduction dans des mélanges fumier / sol sableux ou sol argileux	*Aporrectod ea caliginosa*	Benom yl	Benomyl beaucoup plus toxique dans le sol sableux, pouvant être attribué à une capacité d'adsorption moindre ou une sensibilité plus élevée des animaux élevés dans ce sol	(Lofs-Holmin 1982)
Etude de l'influence du bénomyl et du TCA sur la croissance et le développement sexuel dans des mélanges fumier / sol sableux ou sol argileux	*Allolobopho ra caliginosa* *A.chlorotica* *A.rosea* *Lumbricus terrestris*	Benom yl TCA	Toxicité des 2 composés beaucoup plus élevée dans le sol sableux	(Lofs-Holmin 1980)
Animaux exposés en laboratoire à un sol homogène, contaminé ou non (10 à 130 µg.g^{-1}), variation de l'humidité du sol (25, 35 et 45%), pH 5 constant + animaux exposés dans des sols hétérogènes, contaminés à des concentrations variables en Cu (13 à 210 µg.g^{-1}, pH variant de 4,6 à 5,2), mesures des températures du sol	*Lumbricus rubellus*	Cu	Pas d'effet de la variation de l'humidité du sol sur l'absorption du Cu par *L. rubellus* Pas de relation entre la concentrations totale en Cu dans les sols *in situ* et les concentrations dans les tissus des animaux qui présentent une très importante variabilité Relation entre la concentration totale en Cu dans les sols au laboratoire et les concentrations dans les tissus des animaux La variation temporelle des températures du sol affecte beaucoup l'accumulation du Cu dans les organismes exposés *in situ*	(Marinussen et van der Zee 1997)

Annexe 3. E. Suite

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	Espèce(s) étudiée(s)	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Etude de l'effet de l'ajout de Cd ou de Pb en concentration croissante dans un sol naturel exp. contaminé par du Cu sur l'accumulation du Cu dans les tissus	*Dendrobaena veneta*	Cu	Hypothèses : Cd va induire la synthèse de métallothionéines et augmenter les capacités d'accumulation du Cu Pb va limiter l'adsorption du Cu donc augmenter ses concentrations dans la solution du sol, le rendant plus disponible Aucun effet significatif de l'ajout de Cd ou de Pb (aux concentrations testées) sur les concentrations de Cu dans les tissus de *D. veneta*	(Marinussen *et al.* 1997)
Exposition de 7 populations de vers à leurs 7 sols pollués, exposition de 2 populations provenant d'un site acide et d'un site calcaire aux 7 sols pollués	*Lumbricus rubellus*	Ca, Cd, Cu, Pb, Zn	Les populations venant de sites pollués accumulent plus de Cd et de Zn que les pop. venant de sites non pollués Les concentrations en Cu sont faibles et identiques pour toutes les pop. Les concentrations en Pb sont les plus élevées pour une pop. venant d'un site pollué mais pas celui dont les concentrations en Pb étaient les plus élevées Les concentrations en Ca sont similaire entre les 2 types de pop. mais la pop. venant d'un site non pollué acide accumule le Ca plus efficacement que la pop. venant d'un site non pollué calcaire → les auteurs concluent que les différences entre pop. naturelles exprimées par des différences d'accumulation des ETM sont probablement une réponse plus commune pour une exposition au Cd ou au Zn que pour une exposition au Pb ou au Cu	(Marino et Morgan 1999)
Tests de toxicité normalisés (matrice ISO) et comparaisons des paramètres de toxicité (LC50 et EC50) avec les concentrations d'un site pollué	*Eisenia andrei*	Cd, Cu, Pb, Zn	Des concentrations en Zn supérieures à la LC50-14 jours ont été mesurés dans le site pollué Pourtant, des vers y sont présents → les auteurs concluent que les tests d'écotoxicité surestiment la biodisponibilité des ETM D'après les résultats, le Zn, plus que le Cd, semble poser problème *in situ*	(Spurgeon *et al.* 1994)
Analyses des concentrations en ETM dans les tissus, les ingesta et les excreta de 2 esp. exposées à des sols diversement pollués	*Lumbricus rubellus* *Aporrectodea caliginosa*	Ca, Cd, Cu, Pb, Zn	Ingestion sélective des composants du sol → différences de concentrations en ETM dans le sol et dans les ingesta → Les auteurs remettent donc en cause la validité des facteurs de bioaccumulation Différences significatives d'accumulation des différents ETM entre les 2 espèces étudiées (*L. rubellus* : épigé, *A. caliginosa* : endogé) : concentration en Zn plus élevée pour *A. c.* que pour *L. r.* pour des faibles concentrations en Zn dans les sols, pas de différence nette pour des concentrations élevées → les auteurs suggèrent que A. c., dans les sols peu riches en Zn, pourrait mobiliser du Zn pour les demandes physiologiques de la diapause que *L. r.* ne subit pas. Les espèces du genre *Apporectodea* sont capables de mobiliser du Zn dans le chloragosome Différences de concentrations en Cd, Pb et Zn dans les ingesta entre les 2 esp. sont accompagnées par des différences de concentrations dans les tissus → ce qui est réellement ingéré est donc très important dans la détermination de ce qui peut être accumulé → les auteurs concluent que les différences inter-spécifiques de concentrations en ETM reflètent la sélection de la nourriture et la "niche" "Exposure" and "Bioavailability" sont des concepts liés mais pas interchangeables. Les concentrations en Cd, Cu et Pb sont identiques dans les egesta, différence inter-spécifiques pour le Zn et le Ca Les concentrations en Pb et en Zn sont plus élevées dans les egesta que dans les ingesta, pas d'explications fournies Pas de relations simples entre les concentrations en ETM dans les ingesta et dans les tissus	(Morgan et Morgan 1999)

Annexe 3. E. Suite et fin

Origine des sols étudiés et/ou description succincte de l'expérience	Espèce(s) étudiée(s)	ETM étudiés	Principaux résultats	Références
Détermination des facteurs de bioaccumulation et des taux d'absorption de 3 ETM (seuls ou en mixture) dans des matrices ISO, variations des teneurs en P et en MO	*Eisenia fetida*	Cd, Pb, Zn	Les concentrations des vers exposés aux sols amendés par du P sont plus faibles que dans les sols non amendés pour le Pb, pas d'effet notable sur le Cd et le Zn (l'amendement diminue le pH) La quantité de P ajoutée a peu d'effet sur l'importance de la réduction de la biodisponibilité du Pb Les auteurs attribuent cet effet à la réduction de la solubilité de Pb liée à la formation de pyromorphites grâce à l'amendement en P Les amendements en MO ont augmenté les concentrations en Pb dans les organismes exposés au Pb seul et l'ont diminué dans les organismes exposés à la mixture	(Pearson *et al.* 2000)
Prélèvements de 20 sols (Pennsylvanie, US) et d'annélides	*Annélides*	As, Cd, Cr, Cu, Pb, Se, Zn	Faibles coefficients de corrélation (< 0,57 au mieux) entre les concentrations dans les tissus des annélides et les concentrations totales dans les sols Grande variabilité inter-spécifique, concentrations en certains ETM (Pb notamment) élevées même pour des ind. prélevés dans des sites non pollués	(Beyer et Cromartie 1985)

Résumé

Les transferts **d'éléments en trace métalliques** (ETM) et de **polluants organiques** au sein des **chaînes alimentaires** constituent une des conséquences possibles de la pollution des écosystèmes. L'objectif général de cette thèse était d'améliorer l'évaluation de la **biodisponibilité**, des **transferts** et des **effets** de polluants métalliques (principalement le **cadmium** (Cd) mais aussi le **cuivre** (Cu), le **nickel** (Ni), le **plomb** (Pb) et le **zinc** (Zn)) et d'un polluant organique, l'**herbicide isoproturon**, dans des réseaux trophiques. Les réseaux étudiés dans le cadre de cette thèse ont été composés, en fonction des expériences, de 2 ou 3 compartiments parmi les suivants : sol – producteur primaire (**laitue *Lactuca sativa***, **colza *Brassica napus*** ou **maïs *Zea mays***) – consommateur primaire (**escargot *Helix aspersa***) – prédateur (**coléoptère carabidé *Chrysocarabus splendens***). Trois approches complémentaires utilisant des réseaux trophiques de complexité croissante ont été mises en œuvre.

La première approche a permis d'étudier la biodisponibilité et les transferts entre 2 maillons d'une chaîne alimentaire en conditions contrôlées (laboratoire). La **technique de dilution isotopique**, jusqu'à présent uniquement utilisée pour caractériser la **phyto**disponibilité des éléments majeurs et des éléments trace dans les sols, a été adaptée pour la première fois à un organisme animal, l'escargot *H. aspersa* (évaluation de la **zoo**disponibilité). Ces travaux ont permis de démontrer que les escargots, contrairement aux plantes, ont accès au pool de Cd non isotopiquement échangeable dans les sols, pool considéré dans les procédures d'évaluation du risque comme non biodisponible. L'étude du transfert du Cd d'un végétal (*B. napus*, contaminé par dépôts en surface) vers *H. aspersa* a démontré une bioaccumulation importante du Cd dans les tissus des escargots et des effets sur la croissance et la consommation d'*H aspersa* aux fortes concentrations. Le **facteur de bioaccumulation** (FBA, ici défini comme le rapport de la concentration en un polluant dans les tissus d'un organisme sur la concentration de ce même polluant dans sa nourriture) était supérieur à 2. Ces résultats suggèrent que des escargots vivants dans des environnements contaminés pourraient représenter un **risque** pour leurs prédateurs. Afin de vérifier cette hypothèse, le transfert du Cd depuis des escargots contaminés vers un de leurs prédateurs, le Carabe *C. splendens*, a été étudié. L'exposition des carabes aux proies contaminées à la plus forte concentration testée a provoqué une mortalité significative (pendant la métamorphose). Les concentrations en Cd des carabes étaient très faibles et très inférieures à celles mesurées dans les tissus des escargots. Ces résultats confirmen d'autres études qui ont montré que la **biomagnification** (augmentation des concentrations d'un polluant d'un maillon à l'autre d'une chaîne alimentaire) n'est pas un schéma général du transfert des polluants dans les écosystèmes contaminés.

Dans une deuxième approche, des **microcosmes** permettant l'étude d'au moins 3 maillons ont été mis au point pour étudier au laboratoire les transferts de 5 ETM dans le système "sol (2 sols agricoles : 1 pollué et 1 non-contaminé) – végétal (la laitue *L. sativa*) – invertébré (l'escargot *H. aspersa*)". Après 4 semaines d'exposition, les concentrations en Cd, en Zn et en Pb étaient très supérieures dans les tissus des escargots exposés au sol pollué. Les concentrations en Cu, en revanche, n'étaient pas différentes entre les escargots exposés au sol pollué et ceux exposés au sol non-contaminé, suggérant une régulation de cet ETM. Les concentrations en Ni étaient supérieures dans les animaux exposés au sol non-pollué, reflètant les concentrations supérieures en Ni de ce sol (origine géochimique). La cinétique du transfert a été suivie pendant 2 mois chez les escargots exposés au sol pollué et a montré une augmentation régulière des concentrations en Cd et en Zn, une augmentation rapide suivie d'une stabilisation des concentrations en Pb, une régulation des concentrations en Cu et en Ni. Des microcosmes ont été utilisés pour étudier les transferts "sol – escargot", "maïs (*Z. mays*) – escargot" ou "sol – maïs – escargot" de l'herbicide isoproturon **marqué au ^{14}C**. Le transfert sol – escargot a été très majoritaire comparé au transfert plante – escargot. L'isoproturon a été retrouvée en très faible quantité dans les tissus des escargots et les métabolites présents dans des tissus étaient, pour la plupart, inconnus (c'est à dire différents de ceux issus de la dégradation de l'isoproturon dans des sols, des plantes et des microorganismes). L'herbicide n'a pas eu d'effet sur la croissance d'*H. aspersa*.

Enfin, une troisième approche utilisant les microcosmes développés précédemment a permis l'étude ***in situ*** des transferts de 5 ETM depuis des sols amendés par des boues de station d'épuration vers *H. aspersa*. Les amendements n'ont pas eu d'effets létaux et sublétaux sur les escargots. Une augmentation rapide (5 et 7 semaines d'exposition) et significative des concentrations en Zn dans les tissus des animaux a été démontrée.

En conclusion, l'adaptation avec succès de la technique de dilution isotopique à *H. aspersa* devrait permettre d'améliorer l'évaluation de la biodisponibilité des ETM pour les invertébrés du sol (**zoodisponibilité**). L'ensemble des expériences de transfert a contribué à une meilleure connaissance des voies de transfert de polluants et de leurs effets dans un réseau trophique "sol – plante – consommateur primaire – prédateur". Les microcosmes mis au point élargissent la palette des outils d'évaluation des risques de transfert des polluants dans les réseaux trophiques.

Mots-clés: transferts de polluants, réseaux trophiques, biodisponibilité, bioaccumulation, biomagnification, effets, cadmium, cuivre, nickel, plomb, zinc, herbicide isoproturon, technique de dilution isotopique, escargot *Helix aspersa*, laitue *Lactuca sativa*, colza *Brassica napus*, maïs *Zea mays*, coléoptère carabidé *Chrysocarabus splendens*

Assessment of the bioavailability and the transfer of organic and metallic pollutants in "soil – plant – invertebrate" food webs

Pollution of ecosystems by **metallic trace elements** (MTEs) and **organic compounds** may lead to pollutant transfer in **food webs**. The aim of this work was to improve the assessment of **bioavailability**, **transfer** and **effects** of various MTEs (mainly **cadmium** (Cd) but also **copper** (Cu), **nickel** (Ni), **lead** (Pb) and **zinc** (Zn)) and an organic pollutant, the **herbicide isoproturon**. The food webs studied in this work were made up of 2 or 3 compartments among the following: soil – primary producer (**lettuce *Lactuca sativa*, colza *Brassica napus* and maize *Zea mays***) – primary consumer (**snail *Helix aspersa***) – secondary consumer (**carabid beetle *Chrysocarabus splendens***). Three complementary approaches using food webs of increasing complexity were exploited.

The first approach allowed studying pollutant bioavailability and transfers between 2 links of a food chain under controlled conditions. The **isotopic dilution technique**, until now only used to characterise the **phyto**availability of major elements and MTEs in soils, was adjusted for the first time to an animal organism, the snail *H. aspersa* (assessment of **zoo**availability) This work showed that snails, contrarily to plants, accessed the non-isotopically exchangeable Cd pool in soils, considered as non-bioavailable by current risk assessment procedures. The study of Cd transfer from plants (*B. napus* contaminated by surface deposition) to the snail *H. aspersa* showed a high bioaccumulation of Cd in snail tissues and effects on snail growth and consumption at high concentrations. The **bioaccumulation factor** (BAF, herein defined as the ratio of the concentration of a pollutant in the tissues of an organism divided by the concentration of this pollutant in its food) was higher than 2. These results suggest that snails inhabiting polluted environments could represent a **risk** for their predators. To test this hypothesis, the transfer of Cd from contaminated snails to one of their predators, the carabid beetle *C. splendens*, was studied. Exposure of beetles to the most highly contaminated preys led to a significant increase in mortality (during metamorphosis). Cd concentrations in beetles were very low and much lower than those measured in snail tissues. These results confirmed previous studies, which showed that biomagnification (increase of a pollutant concentration from one level in a food chain to the upper link) is not a general rule for pollutant transfers in contaminated ecosystems.

In a second approach, microcosms were developed to study the transfers in at least three links of a food web. In a first experiment, the transfer of 5 ETMs was studied in the system "soil (2 agricultural soils: one contaminated and one non-polluted) – plant (lettuce *L. sativa*) – invertebrate (snail *H. aspersa*)". After 4 weeks of exposure, Cd, Zn and Pb concentrations were much higher in the tissues of snails exposed to the polluted soil. Cu concentrations were not different between snails exposed to the polluted soil and those exposed to the non-contaminated one, suggesting MTE regulation by snails. Ni concentrations were higher in snails exposed to the non-polluted soil. The transfer kinetic, which was studied for 2 months in the snails exposed to the polluted soil, showed a regular increase of Cd and Zn concentrations, a rapid increase then a stabilization of Pb concentrations and a regulation of Cu and Ni concentrations.

In a second experiment, microcosms were used to study the transfers "soil – snails", "maize (*Z. mays*) – snails" and "soil – maize – snails" of a ^{14}C-labelled herbicide, the isoproturon. The transfer "soil – snails" was much higher than the transfer "maize – snails". Metabolites of isoproturon were determined in snail tissues. Very small quantities of native isoproturon were found in snail tissues and the metabolites were mainly unknown residues (i.e. different from those obtained during isoproturon degradation in soils, plants and microorganisms). The herbicide did not exert toxic effects on snail growth.

Finally, a third approach using the microcosms (previously described), allowed the *in situ* study of the transfer of 5 ETMs from soils amended by sewage sludge to the snail *H. aspersa*. Amendments did not exert either lethal or sublethal effects on snails. In contrast, a rapid (5 and 7 weeks of exposure) and significant increase of Zn concentrations in snail tissues was showed.

In conclusion, the successful adaptation of the isotopic dilution technique to *H. aspersa* snails should improve the assessment of ETM bioavailability to soil invertebrates (**zooavailability**). The transfer experiments made in this work contribute to a better knowledge of pollutant transfer routes in a "soil – plant – primary consumer – predator" food web. In addition, the microcosms developed in this work constitute a new tool for evaluating the risk of pollutant transfer in food webs.

Keywords: pollutant transfer, food webs, bioavailability, bioaccumulation, biomagnification, toxic effects, cadmium, copper, nickel, lead, zinc, isoproturon (herbicide), isotopic dilution technique, snail (*Helix aspersa*), lettuce (*Lactuca sativa*), rape (*Brassica napus*), maize (*Zea mays*), carabid beetle (*Chrysocarabus splendens*)