

Bioindication et unités (concentrations vs quantités): Comparaison des cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd, Pb et Zn chez l'escargot *Helix aspersas*

F. Gimbert^{(1) (2)} et A. de Vaufleury⁽¹⁾

- 1) Laboratoire Chrono-Environnement, UMR CNRS/UFC UsC INRA 6249, Université de Franche-Comté, Place Leclerc, F-25030 Besançon cedex, France
- 2) Université de Genève, Institut F.-A. Forel, 10 route de Suisse, Case Postale 416, CH-1290 Versoix, Suisse

RÉSUMÉ

Parmi les bioindicateurs capables de renseigner sur la contamination des sols par des métaux, les escargots peuvent être utilisés en bioindication active ou passive. Les résultats de l'analyse des métaux dans leurs tissus au cours d'expositions in situ en microcosmes ou en laboratoire sont souvent présentés en concentration et plus rarement en quantité de métal par tissu ou par animal. Nous présentons ici les cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd, du Pb et du Zn chez des escargots (*Helix aspersa*) juvéniles exposés trois mois à un sol contaminé. Les cinétiques exprimées en concentrations ($\mu\text{g}_{\text{métal}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc.) sont comparées aux cinétiques exprimées en quantités ($\mu\text{g}_{\text{métal}}$) afin de caractériser les répercussions de la croissance des organismes sur les transferts des éléments traces métalliques étudiés. Sur la base de cette étude de cas, les intérêts de chacune des unités sont discutés et replacés dans un contexte plus large d'évaluation des risques.

Mots clés

Biodisponibilité, transfert, croissance, *Cantareus aspersus*, modélisation, évaluation du risque.

SUMMARY**BIOINDICATION AND UNITS (CONCENTRATIONS VS BODY BURDENS):****comparison of Cd, Pb and Zn accumulation and elimination kinetics in *Helix aspersa* snails**

Among the bioindicators able to inform about the soil contamination by trace metals, land snails can be used in active or passive bio-monitoring. The results of metal analysis in their tissues during *in situ* exposure in microcosms or in the laboratory are often presented in terms of concentrations and rarely as total body burdens. Here, we present Cd, Pb and Zn accumulation and elimination kinetics in juvenile *Helix aspersa* exposed for three months to a contaminated soil. Data expressed as concentrations ($\mu\text{g}_{\text{metal}}\cdot\text{g}^{-1}$ snail) are compared to data in body burdens ($\mu\text{g}_{\text{metal}}$) in order to characterize the repercussions of growth on the assessment of trace metal bioavailability and transfer. On the basis of this study case, the interests of each unit are discussed and replaced in a larger context of risk assessment.

Key-words

Bioavailability, transfer, growth, *Cantareus aspersus*, modeling, risk assessment.

RESUMEN**BIOINDICACIÓN Y UNIDADES (CONCENTRACIONES VS CANTIDADES):****comparación de las cinéticas de acumulación y de eliminación del Cd, Pb y Zn en el caracol *Helix aspersa***

Entre los bioindicadores capaces de informar sobre la contaminación de los suelos por metales, se puede usar los caracoles en bioindicación activa o pasiva. Se presentan a menudo los resultados del análisis de los metales en sus tejidos durante exposiciones *in situ* en microcosmos o en laboratorio en concentración y más raramente en cantidad de metal por tejido o por animal. Presentamos aquí las cinéticas de acumulación y de eliminación del Cd, Pb y Zn en los caracoles (*Helix aspersa*) juveniles esposados tres meses a un suelo contaminado. Se comparan las cinéticas expresadas en concentraciones ($\mu\text{g}_{\text{metal}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc) a las cinéticas expresadas en cantidades ($\mu\text{g}_{\text{metal}}$) con el fin de caracterizar las repercusiones del crecimiento de los organismos sobre las transferencias de los elementos en trazas metálicos estudiados. Sobre la base de este estudio de caso, los intereses de cada de las unidades están discutidos y colocados en el contexto más extenso de evaluación de los riesgos.

Palabras clave

Biodisponibilidad, transferencia, crecimiento, *cantareus aspersus*, modelización, evaluación del riesgo.

Les indicateurs biologiques sont définis comme les espèces capables de refléter la condition ou l'état de l'environnement dans lequel elles évoluent (Spellerberg, 2005). Leur utilisation pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes a une longue histoire aussi bien pour les environnements aquatiques (Phillips, 1977) que terrestres (Eijsackers, 1983). Pour les contaminants tels que les éléments traces métalliques (ETM), le concept d'espèce sentinelle (Goldberg *et al.*, 1983; Beeby, 2001) est basé sur l'existence d'une relation quantitative entre la concentration en métal dans l'organisme et celle détectée dans le milieu. Si cette relation existe, elle dépend à la fois des caractéristiques du milieu, de l'espèce et du métal considérés qui conditionnent la biodisponibilité et le transfert des ETM (Peijnenburg et Jager, 2003). Si la biodisponibilité des ETM apparaît aujourd'hui centrale dans l'évaluation des risques écologiques liés à la contamination des sols (ISO 17402, 2008), des efforts sont encore nécessaires pour affiner son estimation, principalement en décrivant la biodisponibilité comme un processus dynamique considérant les flux de contaminants dans les organismes et leur dépendance vis-à-vis du temps (Peijnenburg *et al.*, 1997; McMillen *et al.*, 2003). Ainsi, van Straalen *et al.* (2005) proposent les flux d'assimilation, plutôt que les concentrations internes, comme indicateurs de la biodisponibilité et de la toxicité sublétales des ETM pour les invertébrés du sol. Des expérimentations ont été conduites dans ce sens avec l'escargot *Helix aspersa* (syn. *Cantareus aspersus*; *Cornu aspersum*), mollusque gastéropode pulmoné reconnu pour ces capacités bioindicatives de la qualité des sols (de Vaufléury *et al.*, dans ce numéro; de Vaufléury *et al.*, 2006; ISO 15952, 2006). Les résultats obtenus au laboratoire (Gimbert *et al.*, 2006) et sur le terrain (Gimbert *et al.*, 2008a) ont ainsi démontré la pertinence des flux d'assimilation dans l'estimation de la biodisponibilité et du transfert du cadmium (Cd) à des fins d'évaluation des risques. Dans ces études, les auteurs ont exprimé leurs résultats à la fois sous forme de concentrations (quantité de métal par unité de masse, $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) et de quantités (quantité de métal par individu, μg). Les auteurs, tout en soulignant les intérêts respectifs des deux modes d'expression, montrent que les unités sont interchangeables uniquement dans le cas où les escargots ne croissent pas durant l'expérimentation. Or, dans de nombreuses études, les informations concernant l'évolution de la masse des organismes ne sont pas indiquées, ce qui rend certaines conclusions et comparaisons hasardeuses. Afin d'illustrer l'importance de la croissance des organismes dans l'évaluation des risques liés à la contamination des sols par les ETM, la présente contribution a pour objectif de déterminer les cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd, du plomb (Pb) et du zinc (Zn) (exprimées en concentrations et quantités) chez des escargots *H. aspersa* juvéniles exposés au cours d'une expérience de long terme en conditions contrôlées à un sol multicontaminé.

MÉTHODOLOGIE

Organismes

Deux cent cinq escargots Petits-Gris *Helix aspersa* ont été utilisés. Ces organismes ont été élevés en conditions optimales (Gomot-de Vaufléury, 2000) jusqu'à l'âge d'un mois ($0,82 \pm 0,13$ g), comme recommandé par l'Organisation Internationale de Standardisation (ISO 15952, 2006). Avant le début de l'expérimentation, les escargots ont jeûné durant 48 heures pour vider le contenu de leur tube digestif.

Sols

Deux types de sols ont été utilisés (*tableau 1*). Un sol naturel (ME4) contaminé par dépôts industriels et un sol artificiel (reconstitué selon les recommandations de l'Organisation de Coopération et de Développement Economique) nommé OCDE et utilisé comme sol de référence (non contaminé). Le sol ME4 est un alfisol limoneux argileux (Baize *et al.*, 1998) collecté dans le Nord de la France à proximité d'un ancien site métallurgique. Les 20 premiers centimètres ont été collectés manuellement après enlèvement de la couche végétale (prairie) et transférés au laboratoire. Après séchage à l'air, le sol a été tamisé (2 mm), homogénéisé et stocké jusqu'à son utilisation. Le substrat artificiel control (OCDE) consiste en un mélange de 70 % de sable fin, 20 % de kaolin et 10 % de tourbe broyée (OCDE, 1984). Le pH a été ajusté à $6,0 \pm 0,5$ (moyenne \pm écart type) par ajout de carbonate de calcium (CaCO_3). De l'eau déminéralisée a été ajoutée pour atteindre 50 ± 5 % de la capacité au champ. Les sols ont ensuite été soumis à une période d'équilibration d'un mois dans les conditions de l'expérimentation. Trois échantillons ont alors été prélevés pour les analyses physico-chimiques (*tableau 1*).

Modalités d'exposition

Les escargots ont été exposés durant 84 jours aux sols contaminé (ME4) et non contaminé (OCDE) (phase d'accumulation). Les organismes ont ensuite été transférés sur substrat OCDE sain pour 84 jours supplémentaires (phase de dépuración). Cent escargots ont été utilisés par traitement, uniformément répartis dans 10 conteneurs en polystyrène transparent (24 x 21 x 8 cm). Le fond des conteneurs était recouvert avec une couche de 1,5 cm (180 g, masse sèche) de substrat humidifié. Les escargots ont été nourris *ad libitum* avec de l'aliment Helixal® non contaminé (0,3, 1,3 et 80,0 mg.kg⁻¹ pour le Cd, le Pb, et le Zn, respectivement) fourni dans des boîtes de Pétri déposées sur le fond des conteneurs. Dans ces conditions, le sol était considéré comme seule source de contamination à la fois par voie dermale (diffusion à travers l'épithélium du pied) et digestive (ingestion de particules de sol) (Coeurdassier *et al.*,

Tableau 1 - Caractéristiques des sols utilisés.**Table 1** - Soil characteristics.

	OCDE	ME4
Argiles, %	13,6	23,8
Limons, %	12,6	65,4
Sables, %	73,8	10,8
Capacité au champ, mL.kg ⁻¹	619,1 ± 4,5	496,6 ± 4,5
pHeau	5,91 ± 0,02	7,80 ± 0,01
pHKCl	5,48 ± 0,04	7,27 ± 0,03
LOI (a), %	11,95 ± 0,80	9,06 ± 0,49
CaCO ₃ total, g.kg ⁻¹	8,7	96,0
Ca total, g. kg ⁻¹	5,42	45,9
Mg total, g. kg ⁻¹	1,0	5,7
CEC (b), cmol.kg ⁻¹	9,5	16,8
Ca échangeable, cmol.kg ⁻¹	21,5	37,6
Mg échangeable, cmol.kg ⁻¹	1,3	0,6
Cd extractable au CaCl ₂ (c), mg.kg ⁻¹	< LD (d)	0,41 ± 0,01
Pb extractable au CaCl ₂ (c), mg.kg ⁻¹	< LD	0,69 ± 0,10
Zn extractable au CaCl ₂ (c), mg.kg ⁻¹	< LD	1,24 ± 0,02
Cd total, mg.kg ⁻¹	0,032 ± 0,004	20,4 ± 0,2
Pb total, mg.kg ⁻¹	3,8 ± 0,2	1895,6 ± 227,7
Zn total, mg.kg ⁻¹	31,2 ± 2,9	1297,9 ± 225,4

(a) Loss On Ignition (12 h à 500°C)
 (b) Capacité d'Echange Cationique
 (c) Houbá et al., 1996
 (d) LD: limite de détection

2002). Durant l'expérimentation, les sols n'ont pas été renouvelés. Trois fois par semaine, les conteneurs ont été nettoyés, les fèces retirées, la nourriture renouvelée et les sols mixés. La photopériode était de 18 heures lumière et 6 heures obscurité, la température de 20 ± 2 °C et l'humidité relative de l'air de 80 à 95 %. L'humidité des sols a été maintenue constante par ajouts réguliers d'eau déminéralisée.

Échantillonnage et analyses

Après 0, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 et 84 jours d'accumulation et 2, 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 et 84 jours de dépuración, cinq escargots de chaque traitement ont été prélevés au hasard dans cinq conteneurs différents (réplicats). Les escargots échantillonnés ont été placés dans des conteneurs propres pour une période de 48 heures de jeûne, puis pesés et sacrifiés par congélation à -80 °C. Après décongélation, le corps mou a été sorti de la coquille, le pied et les viscères séparés et séchés en étuve à 60 °C jusqu'à masse constante. Les tissus ont ensuite été digérés à 60 °C dans 4 ml d'acide nitrique (HNO₃ 50 %) puis analysés par spectrométrie d'absorption atomique (flamme et four). La qualité des analyses a été vérifiée avec du

matériel de référence (Tort-2, NRCC-CNLC, Canada) avec une tolérance inférieure à 10 %. Seuls les résultats des viscères (contenant le principal organe de stockages des ETM, la glande digestive) seront présentés ici.

Modélisation et statistiques

Pour décrire l'évolution des concentrations internes en ETM au cours du temps, deux modèles ont été utilisés, un pour le Cd (Eq. (1), Gimbert et al., 2006) et un autre pour le Pb et le Zn (Eq. (2), Widianarko et van Straalen, 1996).

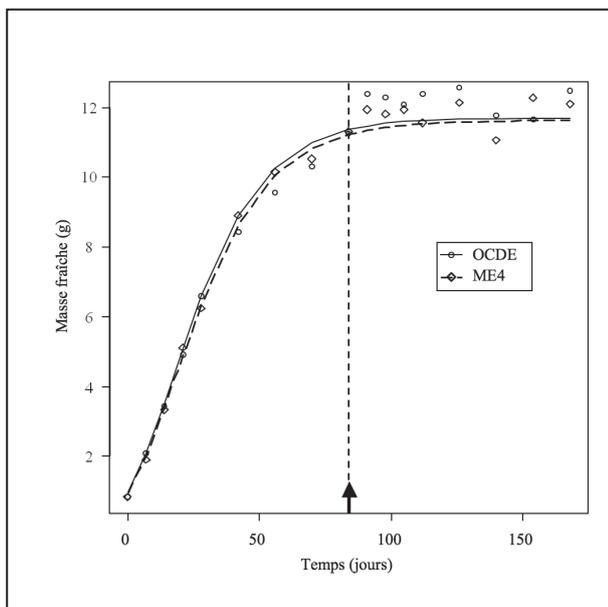
$$C_{esc.}(t) = C_{esc.}(0) + \frac{a}{k_2 + k_g} \left(1 - e^{-(k_2 + k_g)t} \right) \quad (1)$$

$$C_{esc.}(t) = C_{esc.}(0) + \frac{a}{k_2 + k_g} \left(e^{-k_g t} - e^{-k_2 t} \right) \quad (2)$$

où $C_{esc}(t)$ est la concentration interne dans les escargots ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc. MS) au temps (t); a est le flux d'assimilation ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc. MS.j⁻¹) qui est égal à $k_1 \cdot C_e$ avec k_1 , le taux d'absorption ($\text{g}_{\text{sol}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc. MS.j⁻¹); C_e , la concentration externe en ETM biodisponible

Figure 1 : Evolution temporelle de la masse fraîche moyenne des escargots exposés aux sols témoin (OCDE) et contaminé (ME4). Les courbes associées correspondent à l'ajustement du modèle de Gompertz (Gimbert *et al.*, 2008c). La flèche symbolise le passage à la phase de dépuraction (84 jours).

Figure 1 : Mean fresh mass of snails exposed to control soil (OCDE) or contaminated soil (ME4). Curves correspond to data fitted with the Gompertz model (Gimbert *et al.*, 2008c). The arrow indicates the end of exposure phase and start of depuration phase.



dans le sol ($\mu\text{g}_{\text{ETM}} \cdot \text{g}^{-1}$ sol MS); k_2 est le taux d'excrétion (j^{-1}) et k_g est le taux de croissance (j^{-1}).

L'évolution des concentrations internes des ETM au cours de la phase de dépuraction a été décrite par le modèle suivant (Eq. (3)).

$$C_{\text{esc.}}(t) = C_{\text{mr}} + (C_{\text{mu}} - C_{\text{mr}}) \times e^{(-k_2 \times (t - t_c))} \quad (3)$$

où C_{mu} est la concentration en ETM à la fin de la phase d'exposition ($\mu\text{g}_{\text{ETM}} \cdot \text{g}^{-1}$ esc MS), C_{mr} est la concentration en ETM résiduelle dans les escargots à la fin de la phase de dépuraction ($\mu\text{g}_{\text{ETM}} \cdot \text{g}^{-1}$ esc MS) et t_c est le temps auquel les organismes ont été transférés dans le milieu non contaminé (jours).

Une procédure similaire a été employée pour décrire les cinétiques d'accumulation et d'élimination des ETM en termes de quantités. Dans ce cas, le taux de croissance k_g a été supprimé et C ($\mu\text{g}_{\text{ETM}} \cdot \text{g}^{-1}$ esc MS) remplacé par Q (μg_{ETM}) (Gimbert *et al.*, 2008b).

Les paramètres d'accumulation et d'élimination ont été estimés en ajustant les modèles avec une procédure non-linéaire à effets mixtes (nonlinear mixed-effects, nlme) (Lindstrom et Bates, 1990). Les différences dans les estimations des

paramètres modélisés ont été jugées par la superposition des intervalles de confiance à 95 %. La modélisation et l'estimation des paramètres ont été effectuées avec le logiciel statistique R (version 2.2.1) (R Development Core Team, 2007).

RÉSULTATS

Croissance

La croissance des escargots exposés aux sols ME4 et OCDE est présentée en *figure 1*.

La masse des organismes, nourris *ad libitum*, augmente durant la phase d'exposition sans qu'aucune différence statistique ne mette en évidence une inhibition de croissance chez les individus exposés au sol contaminé ME4. A la fin de cette phase (84 jours), les escargots ont atteint une taille adulte. Durant la phase de dépuraction, la masse des escargots est restée constante avec une valeur moyenne de 11,3 g dans les deux traitements.

La croissance des escargots (masses sèches, données non présentées) a été modélisée (modèle de Gompertz) afin d'obtenir les valeurs des taux de croissance (k_g) à introduire dans les modèles d'accumulation. Les valeurs obtenues pour les viscères sont de 0,034 et 0,035 j^{-1} pour les sols OCDE et ME4, respectivement. Pour plus de détails, se référer à Gimbert *et al.* (2008c).

Cinétiques d'accumulation et d'élimination

Chez les individus exposés au sol témoin (OECD), aucune tendance d'accumulation n'a été observée dans les viscères avec des concentrations n'excédant jamais 1, 16 et 230 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ de Cd, Pb et Zn, respectivement, soit 0,9, 4 et 10 μg (données non présentées).

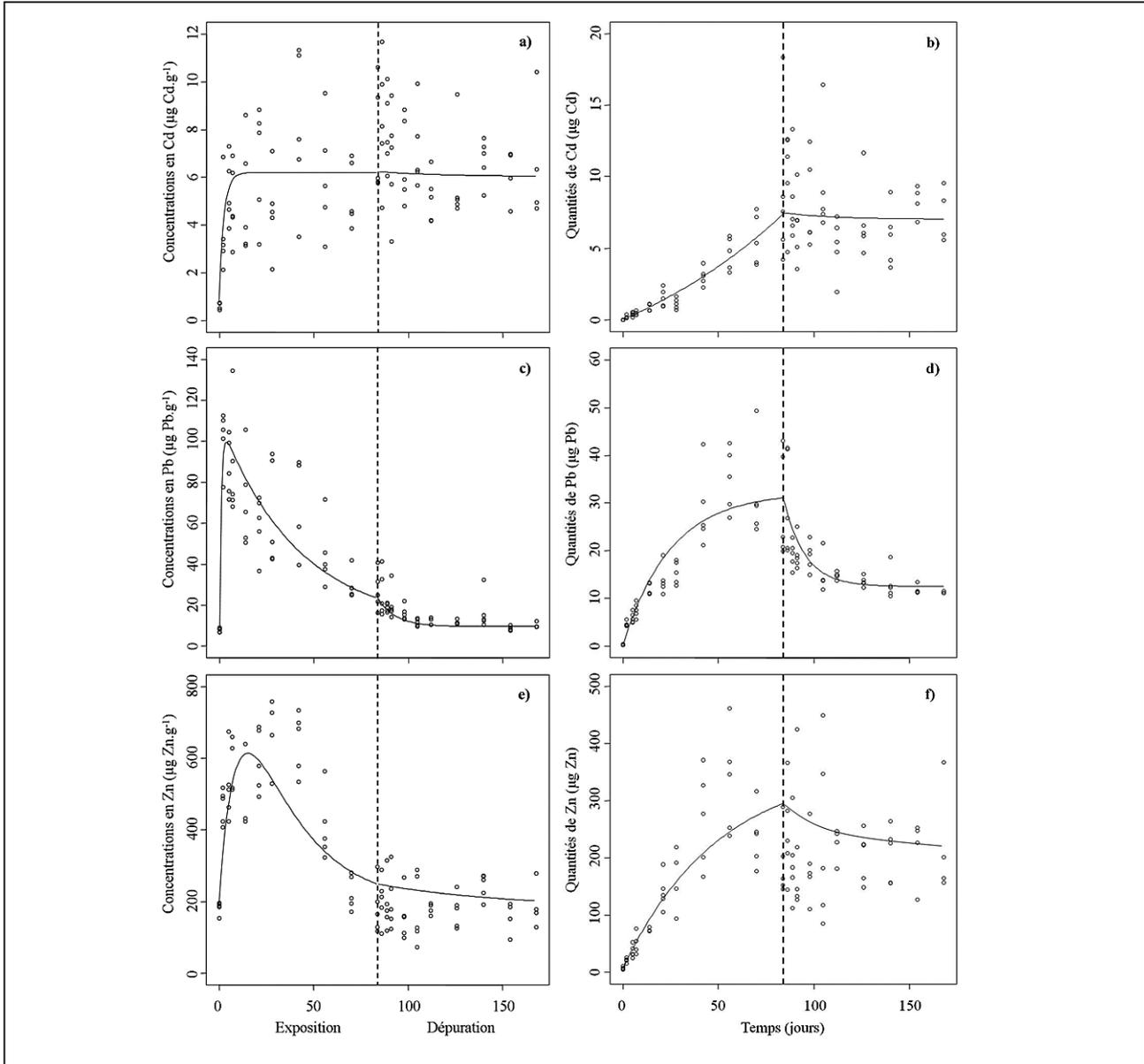
Les trois ETM étudiés présentent des patterns d'accumulation très contrastés à la fois en terme de concentrations que de quantités (*figure 2*). Les modèles ont été ajustés aux données individuelles d'accumulation et d'élimination. Les paramètres estimés sont donnés dans les *tableaux 2 et 3*.

Concentrations

Les concentrations internes en Cd augmentent avec le temps d'exposition: dans les viscères, un état d'équilibre est atteint après environ 14 jours d'exposition au sol contaminé (*figure 2a*). Pour le Pb et le Zn, les patterns d'accumulation sont caractérisés par une augmentation temporaire des concentrations internes au cours des premiers jours de la phase d'exposition (de 10 à 100 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Pb et de 200 à 600 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Zn), suivie par une rapide diminution ramenant, à la fin de la phase d'exposition, les concentrations internes à des valeurs proches de l'état initial (*figures 2c et e*).

Figure 2: Évolution temporelle des concentrations (a, c et e) et quantités (b, d et f) de Cd, Pb et Zn dans les viscères des escargots exposés au sol contaminé. Chaque point représente un escargot.

Figure 2: Concentrations (a, c et e) and burdens (b, d et f) of Cd, Pb et Zn in the viscera of snails exposed to the contaminated soil (ME4). Each point represents one snail.



Les modèles décrivent convenablement l'accumulation des ETM dans les escargots comme le montrent les coefficients de détermination (r) et les faibles différences entre les concentrations internes mesurées et calculées à la fin de la phase d'exposition. Dans les viscères, le flux d'assimilation (a) du Cd est très inférieur à ceux du Pb et du Zn (tableau 2). Le taux d'excrétion (k_2) du Cd n'est pas significativement différent de celui du Pb mais significativement inférieur à celui du Zn.

Au cours de la phase de dépuraton, le Cd n'est pas éliminé des viscères et les concentrations internes conservent des valeurs proches de $6 \mu\text{g Cd.g}^{-1}$ (figure 2a). Ce comportement est reflété par les taux d'excrétion estimés par le modèle comme non significativement différents de zéro ($p = 0,935$) (tableau 3). Les concentrations internes en Pb diminuent significativement ($k_2 = 0,109 \text{ d}^{-1}$) pour atteindre des valeurs proches de l'état initial à la fin de la phase de dépuraton. Pour le Zn, aucun

Tableau 2: Estimation des paramètres cinétiques de l'accumulation du Cd, du Pb et du Zn dans les escargots exposés au sol contaminé sur la base des concentrations (Conc.) et des quantités (Qtés).

Tableau 2: Estimation of kinetic parameters of Cd, du Pb et du Zn accumulation in snails exposed to the contaminated soil on the basis of concentrations (Conc.) or burdens (Qtés).

		Mesuré	Estimés par les modèles						r ²	Modélisés
		Cesc(84) (± IC)	a	min/max	p-value	k ²	min/max	p-value	Cesc(84)	
		µg.g MSesc. ⁻¹	µg _{ETM} .g ⁻¹ esc MS.j ⁻¹			j ⁻¹			µg.g MSesc. ⁻¹	
Conc.	Cd	6.35 ± 1.31	2.122 ^a	1.076/3.168	0.000	0.354 ^a	0.140/0.568	0.002	0.479	6.07
	Pb	27.03 ± 9.40	133.1 ^b	20.6/245.6	0.028	1.168 ^a	0.077/2.260	0.045	0.502	21.53
	Zn	191.68 ± 71.78	153.8 ^b	136.1/171.6	0.002	0.107 ^{ab}	0.074/0.139	0.001	0.626	240.30
		Qesc(84) (± IC)	a	min/max	p-value	k ²	min/max	p-value	Q _{esc} (84)	
		µg	µg _{ETM} .d ⁻¹			j ⁻¹			µg	
Qtés	Cd	8,88 ± 5,56	0,059 ^a	0,049/0,070	< 0,001	-0,009 ^a	-0,017/-0,002	0,017	0,716	7,43
	Pb	29,29 ± 11,14	1,273 ^b	1,044/1,502	< 0,001	0,040 ^b	0,030/0,051	< 0,001	0,773	31,05
	Zn	290,95 ± 59,29	7,069 ^c	5,802/8,336	< 0,001	0,020 ^c	0,009/0,030	< 0,001	0,680	295,22

Les valeurs minimum et maximum sont les intervalles de confiance (IC) à 95 %. Les valeurs présentant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les valeurs négatives des taux d'excrétion (k₂), bien qu'utilisées pour le calcul des C_{esc} modélisées, n'ont pas de réalité biologique et doivent être considérées comme nulles.

Tableau 3: Estimations des paramètres cinétiques de l'élimination du Cd, du Pb et du Zn des escargots précédemment exposés au sol contaminé sur la base des concentrations (Conc.) et des quantités (Qtés).

Tableau 3: Estimation of kinetic parameters of Cd, du Pb et du Zn elimination in snails exposed to the contaminated soil on the basis of concentrations (Conc.) or burdens (Qtés).

		Mesuré	Estimés par les modèles						r ²
		Cesc(168) (± IC)	k ₂	min/max	p-value	C _{mr}	min/max	p-value	
		µg.g MS ⁺	j ⁻¹			µg.g MSesc. ⁻¹			
Conc.	Cd	6.49 ± 1.55	0.029 ^a	-0.645/0.703	0.935	6.29	4.14/8.43	0.000	0.024
	Pb	10.22 ± 1.24	0.109 ^b	0.042/0.176	0.003	11.83	9.79/13.88	0.000	0.468
	Zn	189.00 ± 63.25	0.018 ^a	-0.405/0.442	0.933	193.57	37.08/350.07	0.022	0.004
		Qesc(168) (± IC)	k ₂	min/max	p-value	Q _{mr}	min/max	p-value	
		µg	j ⁻¹			µg			
Qtés	Cd	7,37 ± 1,91	0,039 ^a	-0,467/0,554	0,884	7,06 ^a	4,98/9,14	< 0,001	0,005
	Pb	11,70 ± 0,87	0,090 ^b	0,063/0,118	< 0,001	12,49 ^b	11,54/13,44	< 0,001	0,548
	Zn	222,25 ± 98,32	0,027 ^a	-0,052/0,107	0,368	210,04 ^c	184,32/235,75	< 0,001	0,015

Les valeurs minimum et maximum sont les intervalles de confiance (IC) à 95 %. Les valeurs présentant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les valeurs négatives des taux d'excrétion (k₂) n'ayant pas de réalité biologique doivent être considérées comme nulles.

taux d'excrétion significatif n'a été estimé par le modèle. Les concentrations internes se stabilisent autour de 200 µg Zn.g⁻¹ dans les viscères (figure 2d).

Quantités

Durant la phase d'exposition, les quantités en Cd augmentent linéairement, atteignant environ 7 µg après 84 jours (figure 2b). Cet aspect linéaire indique l'absence d'excrétion comme observé dans le tableau 2. Le taux d'excrétion du Cd prend en effet une valeur négative qui, sans réalité biologique, doit être considérée

comme nulle. Pour le Pb, un état d'équilibre est atteint après environ 42 jours d'exposition au sol contaminé avec une valeur d'environ 32 µg (figure 2d). Par contre, les quantités de Zn n'atteignent pas un équilibre sur la durée d'exposition considérée ici (Figure 2f), mais l'accumulation n'est pour autant linéaire du fait de l'existence de processus d'excrétion significatifs estimés par le modèle (k₂ = 0,020 j⁻¹; p < 0,001) (tableau 2).

Durant les 84 jours de la phase de dépuración, le Cd n'est pas éliminé des viscères et les quantités accumulées conservent des valeurs proches de 7 µg (figure 2b) en liaison avec le taux

d'excrétion non significatif modélisé ($p = 0,884$) (Tableau 3). Pour le Pb, les quantités accumulées à 84 jours diminuent pour atteindre un autre état d'équilibre après environ 42 jours de dépuratation (figure 2d). Cependant, les processus d'excrétion ($k_2 = 0,090 \text{ j}^{-1}$, $p < 0,001$) n'ont pas permis de retrouver un état initial: seulement 60 % du Pb accumulé dans les viscères a été éliminé. Pour le Zn, même si l'allure de la courbe suggère qu'une excrétion a lieu (figure 2f), aucun taux d'excrétion significatif n'a été prédit par les modèles sur la durée de la phase de dépuratation considérée ($k_2 = 0,027$; $p = 0,368$).

DISCUSSION

Concentrations vs quantités

Exprimées en concentrations, les cinétiques d'accumulation mettent en évidence l'existence d'un plateau dans l'accumulation du Cd et d'une diminution des concentrations internes en Pb et Zn chez les organismes pourtant toujours exposés au sol contaminé. Ainsi, tout en établissant l'existence d'une accumulation de ces contaminants, les concentrations mesurées ne soulignent qu'un risque environnemental limité lié à l'exposition des organismes à un sol pluricontaminé. *A contrario*, les mêmes résultats exprimés sous la forme de quantités individuelles montrent une accumulation linéaire pour le Cd et des courbes tendant vers un équilibre pour le Pb et le Zn. Les quantités mesurées dans les organismes sont élevées, les équilibres pas toujours atteints au cours de l'exposition pourtant longue (84 jours) et donc les risques potentiellement importants. Deux modes d'expression, deux jeux de données différents, deux interprétations du risque différentes mais une seule façon de les relier: la croissance.

En effet, la comparaison des valeurs des paramètres estimés par les modèles selon les deux modes d'expression des données permet de voir qu'à la fois les concentrations et les quantités sont utilisables pour une estimation fiable des taux d'excrétion durant la phase de dépuratation au cours de laquelle la masse des organismes ne varie plus. Par contre, l'augmentation de la masse des animaux et l'effet de dilution des concentrations lors de la phase d'exposition empêchent d'utiliser indifféremment l'une ou l'autre des unités.

Si la somme de l'excrétion (k_2) et de la dilution par la croissance (k_g) est supérieure à l'assimilation (a), alors les concentrations internes diminueront, comme cela a été observé pour le Pb et le Zn. Si ces processus s'équilibrent, les concentrations internes atteindront un plateau, comme cela fut le cas avec le Cd dans les viscères. Si l'assimilation reste supérieure, l'accumulation sera linéaire (comme observée, sur la durée d'exposition considérée, pour le Cd dans le pied des escargots, Gimbert *et al.*, 2006).

Si l'intégration du taux de croissance dans les modèles d'accumulation permet de dissocier l'excrétion vraie dans les processus l'élimination *sensu largo* (excrétion + dilution par la croissance), l'estimation pertinente de la croissance des organismes sur la durée d'exposition considérée n'est pas aisée (Gimbert *et al.*, 2008c). De plus, si la croissance doit être considérée dans le cas d'organismes juvéniles, la diminution de la masse des organismes doit aussi faire l'objet d'une attention particulière et ce, même lorsque des organismes adultes sont utilisés, dans les cas où ces organismes présentent des signes de toxicité sublétales (amaigrissement) ou des fluctuations de masse plus ponctuelles et aiguës en liaison, par exemple, avec la production d'œufs, de cocons ou les conditions environnementales (saison, climat...). Dans ces cas, ce n'est plus une dilution par la croissance qui doit être prise compte mais une surconcentration des contaminants. Pour limiter ces variations liées à la masse, l'utilisation d'escargots subadultes (de Vaufléury *et al.* dans ce numéro) est possible.

Pour l'analyse statistique des cinétiques d'accumulation des contaminants, l'utilisation des quantités plutôt que des concentrations tissulaires est recommandée (Moriarty, 1983) car ce mode d'expression peut être affecté par les changements plus ou moins rapides de la masse des organismes (Spacie et Hamelink, 1985). Nos résultats montrent que les quantités, en liaison avec leur traitement toxicocinétique, s'avèrent tout à fait utilisables dans l'évaluation de la biodisponibilité et du transfert des ETM (Gimbert *et al.*, 2006, 2008a). Dans cette dernière étude, les auteurs ont ainsi mis en évidence un impact de la saison sur le transfert sol-plante-escargot du Cd, plus important en automne qu'au printemps. Sans observer les mêmes résultats en quantités, les auteurs auraient pu conclure sur l'influence de la saison sur la biodisponibilité et le transfert du Cd. En réalité, il s'avère que la saison n'impacte pas le comportement du contaminant dans le milieu mais agit de façon indirecte sur les concentrations internes en Cd en modifiant la croissance des organismes (Gimbert *et al.*, 2008a).

Implications en évaluation des risques écologiques

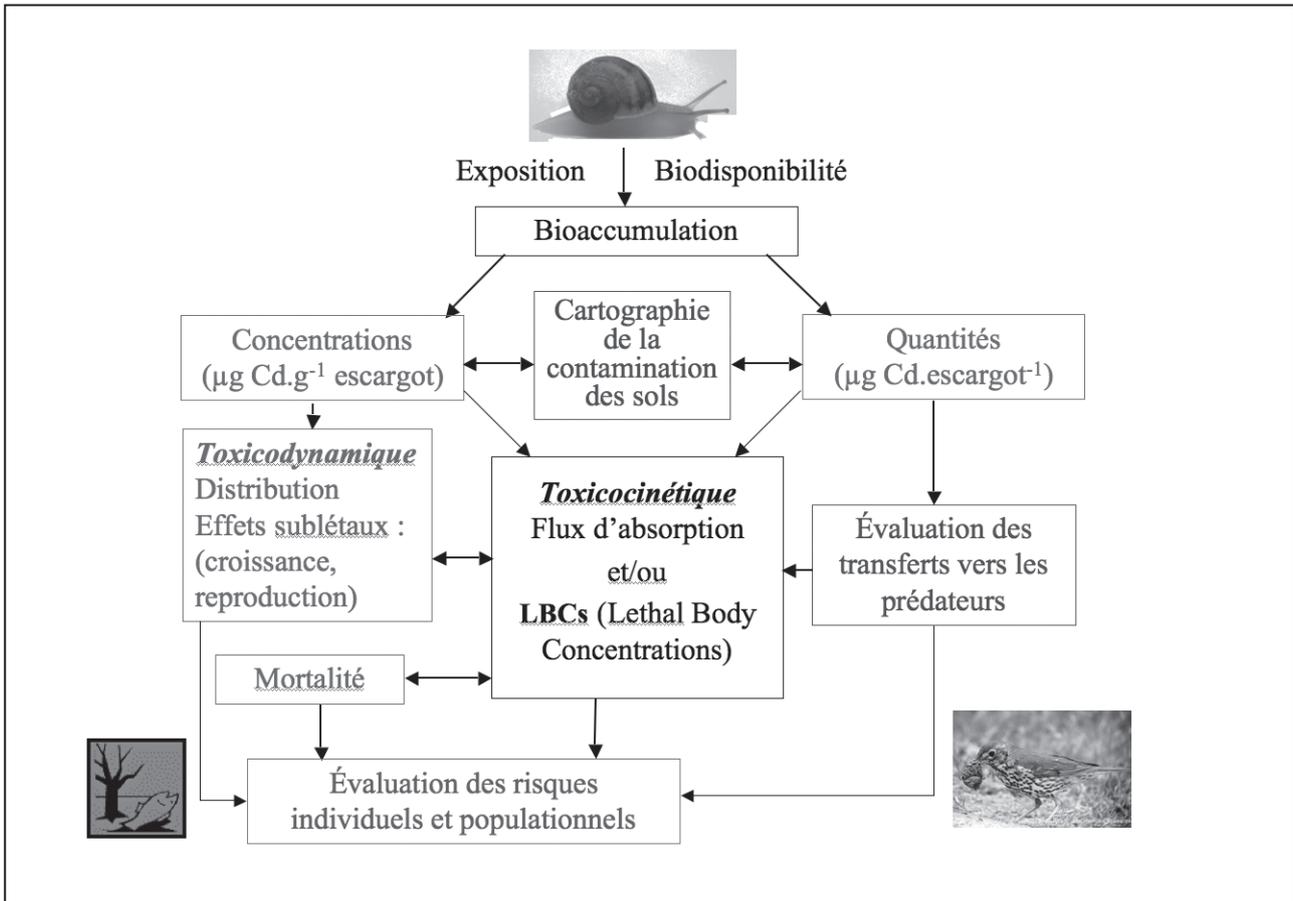
Sur la base du test d'effet standardisé au niveau international (ISO 15952, 2006), les escargots *H.aspersa* juvéniles ont été choisis comme modèle d'étude. Les modifications de leur masse au cours du temps empêchent d'utiliser indifféremment les concentrations ou les quantités pour évaluer la biodisponibilité et le transfert des ETM. Cependant, les deux unités présentent des intérêts complémentaires et différents éléments peuvent être proposés pour guider le choix de l'une ou de l'autre (figure 3).

Le critère fondamental dans l'orientation du choix de l'unité est l'objectif de l'étude (figure 3).

Les investigations concernant le risque toxique d'une substance présente dans l'environnement nécessitent de

Figure 3. Schéma général des utilisations des escargots en bioindication et de leurs applications en évaluation du risque environnemental lié à la contamination des sols par les ETM.

Figure 3. General scheme of using snails as bioindicators and applications in environmental risk assessment of soils contaminated by metals.



considérer les concentrations internes ($\mu\text{g.g}_{\text{organisme}}^{-1}$). Les effets sublétaux observés après exposition des organismes à la matrice contaminée, dépendant de la vitesse à laquelle la substance pénètre dans l'organisme, pourront être mis en relation avec les flux d'absorption (van Straalen *et al.*, 2005; Gimbert *et al.*, 2008a). La mortalité ou l'inhibition de croissance, quant à elles, dépendent du niveau atteint par les concentrations internes: c'est le concept de "lethal body concentration" (LBC) (McCarty et Mackay, 1993; Crommentuijn *et al.*, 1994; van Straalen, 1996; Lanno *et al.*, 1998) ou CBR (Critical Body Residues) qui définit par exemple une inhibition de la croissance de 50 % chez des escargots présentant des concentrations en Cd dans les viscères de $720 \mu\text{g.g}^{-1}$ (de Vaufléury *et al.*, 2006). Ces concepts présument qu'un organisme mourra ou verra certaines de ses fonctions inhibées, à une concentration totale interne donnée en liaison avec l'arrêt ou la perturbation d'un certain nombre de fonctions vitales. Si de nombreux travaux rapportent l'intérêt de ce concept, il souffre cependant de certains défauts, l'un des

plus importants étant la difficulté voire l'impossibilité d'établir une relation directe entre les concentrations internes totales atteintes et les effets toxiques chez les organismes capables de détoxifier tout ou partie de l'ETM accumulé.

L'utilisation des quantités est recommandée dans les études visant à étudier les transferts de contaminants dans les réseaux trophiques. Si les quantités totales accumulées durant la phase d'exposition correspondent aux charges ingérables par les prédateurs (Scheifler *et al.*, 2002), elles ne renseignent pas complètement sur les quantités assimilables et potentiellement toxiques, qui nécessitent l'identification des formes de stockages dans la proie (Hispard *et al.*, 2008a et b). L'évaluation des effets toxiques potentiels liés à l'ingestion par le prédateur d'une proie contaminée pourra également nécessiter l'analyse des concentrations internes résultantes. L'utilisation des quantités, et des concentrations si les variations de masse des organismes restent faibles, sont également utilisables dans des approches de screening et de cartographie de la contamination des milieux

(figure 3). Le calcul des flux d'assimilation (a) est indépendant de l'unité considérée si les organismes conservent une masse constante au cours de l'exposition. Dans le cas contraire, au vu des résultats obtenus, les quantités semblent les plus à même à estimer les flux d'assimilation et donc à évaluer la biodisponibilité et les transferts des ETM pour *H. aspersa*.

CONCLUSION

Si les concentrations totales accumulées dans un tissu peuvent être liées à une toxicité, les quantités, elles, informent sur les charges en ETM transférables dans les réseaux trophiques. Les deux unités sont donc à considérer car elles apportent des images complémentaires des mécanismes physiologiques qui régissent les transferts des ETM dans des organismes en croissance.

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient vivement les Drs Michaël Coeurdassier et Renaud Scheifler ainsi que Christiane Lovy, Jean-Claude Lambert et Nadia Crini pour leur soutien technique. Ces travaux ont bénéficié du soutien financier du Conseil Régional de Franche-Comté, de l'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME, contrats n° 0175037 et 0572C0058) ainsi que l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR, programme STARTT, contrat n° ANR-05-ECC-004).

Bibliographie

- Baize D., Girard M.C. (coord.), Hodgson J.M., Eskenazi N.R., Baize D. (trans.), 1998 - A Sound Reference Base for Soils: The "Référentiel Pédologique". INRA Editions, Versailles, France, 324 p.
- Beeby A., 2001 - What do sentinels stand for? *Environmental Pollution* 112, 285-298.
- Coeurdassier M., Gomot-de Vaufléury A., Lovy C., Badot P.M., 2002 - Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53, 425-431.
- Crommentuijn T., Doodeman C.J.A.M., Doornekamp A., van der Pol J.J.C., Bedaux J.J.M., van Gestel C.A.M., 1994 - Lethal body concentrations and accumulation patterns determine time-dependent toxicity of cadmium in soil arthropods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1781-1789.
- de Vaufléury A., Coeurdassier M., Pandard P., Scheifler R., Lovy C., Crini N., Badot, P.M., 2006 - How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25, 797-806.
- de Vaufléury, A., Fritsch C., Gimbert F., Pauget, B., Coeurdassier, M., Crini, N., Scheifler R., 2009 - Utilisation et intérêts des escargots et des micromammifères pour la bioindication de la qualité des sols. *Etude et gestion des sols*, vol. 16/3-4:203-218.
- Eijsackers, H., 1983 - Soil fauna and soil microflora as possible indicators of soil pollution. *Environmental Monitoring and Assessment* 3, 307-316.
- Gimbert F., de Vaufléury A., Douay F., Scheifler R., Coeurdassier M., Badot P.M., 2006 - Modelling chronic exposure to contaminated soil. A toxicokinetic approach with terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environment International* 32: 866-875.
- Gimbert F., de Vaufléury A., Douay F., Coeurdassier C., Scheifler R., Badot P.-M., 2008c - Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70 (138-146).
- Gimbert F., Mench M., Coeurdassier C., Badot P.-M. de Vaufléury A., 2008a Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field. *Environmental Pollution* 152, 736-745.
- Gimbert F., Vijver M.G., Coeurdassier M., Scheifler R., Peijnenburg W.J.G.M., Badot P.M., de Vaufléury A., 2008b - How subcellular partitioning can help to understand heavy metal accumulation and elimination kinetics in snails. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(6), 1284-1292.
- Goldberg E.D., Koide M., Hodge V., Flegal A.R., Martin J., 1983 - US Mussel Watch: 1977-1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuarine and Coastal Shelf Science* 16, 69-93.
- Gomot-de Vaufléury A., 2000 - Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 41-50.
- Hispard F., de Vaufléury A., Cosson R.P., Devaux S., Scheifler R., Coeurdassier M., Gimbert F., Martin H., Richert L., Berthelot A. and Badot P.-M., 2008a - Comparison of transfer and effects of Cd on rats exposed in a short experimental snail-rat food chain or to CdCl₂ dosed food. *Environment International* 34, 381-389.
- Hispard F., de Vaufléury A., Martin H., Devaux S., Cosson R.P., Scheifler R., Richert L., Berthelot A., Badot P.-M., 2008b - Effects of subchronic digestive exposure to organic and inorganic cadmium on biomarkers in rat tissues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 70, 490-498.
- ISO 15952, 2006 - Soil quality. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 17402, 2008 - Soil quality - Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. (International Organization for Standardization).
- Lanno R.P., LeBlanc S.C., Knight B.L., Tymowski R., Fitzgerald D.G., 1998 - Application of body residues as tool in the assessment of soil toxicity. *In*: Sheppard, S.C., Bembridge, J.D., Holmstrup, M., Posthuma, L. (Eds). *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. SETAC Press, Boca Raton, pp. 41-52.
- Lindstrom M.J. et Bates D.M., 1990 - Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics* 46, 673-687.
- McCarty L.S. et Mackay D., 1993 - Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. *Environmental Science and Technology* 27, 1719-1727.
- McMillen S.J., van Gestel C.A.M., Lanno R.P., Linder G.L., Pauwels S.J., Stephenson G.L., 2003 - Biological measures of bioavailability. *In*: Lanno, R.P. (Ed.). *Contaminated soils: from soil-chemical interactions to ecosystem management*. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, pp. 293-343.
- Moriarty F., 1983 - *Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems*, Academic Press, London, 233 p.
- Organisation for Economic Co-operation and Development OECD), 1984 - Test N° 207: Earthworm acute toxicity tests. *OE CD Guidelines for the Testing of Chemicals* 1, 1-9.
- Peijnenburg W.J.G.M. et Jager T., 2003 - Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 63-77.
- Peijnenburg W.J.G.M., Posthuma L., Eijsackers H.J.P., Allen H.E., 1997 - A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 37, 163-172.
- Phillips D.J.H., 1977 - The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. A review. *Environmental Pollution* 13, 281-317.

- R Development Core Team, 2007 - R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- 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 carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* 48: 571-579.
- Spacie, A. et Hamelink, J.L., 1985 - Bioaccumulation. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (Eds). *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Corp., Washington, USA, p. 495-525.
- Spellerberg I.F., 2005 - *Monitoring ecological change*. Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge, England, 410 p.
- van Straalen N.M., 1996 - Critical body concentrations: their use in bioindication. In: Van Straalen, N.M., Krivolutsky, D.A. (Eds.), *Bioindicator Systems for Soil Pollution*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht pp. 5-16.
- van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M., 2005 - Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* 136, 409-417.
- Widianarko B et van Straalen N., 1996 - Toxicokinetic-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 402-406.

