AVERTISSEMENT

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

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

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

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

73566357

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv. 2001165
Cote S/MZ 01/39
Loc

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DE METZ

ECOLE DOCTORALE

Ressources, Procédés, Produits, Environnement

Par **François PIHAN**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

Mention : Sciences de la Vie

Spécialité : Ecotoxicologie

Caractérisation de Mollusques Gastéropodes Terrestres en tant que Bioindicateurs de la Contamination Polymétallique (Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Cu, Cd et Pb)

Soutenue le : 19/11/2001

Après avis de :

Mme I. PERES, Professeur, Université Nouvelle de Lisbonne (Portugal)	Rapporteur
M J.L. PINEAU, Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
M Y. RICHARD, Professeur, Ecole Vétérinaire de Lyon	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mlle P. VASSEUR, Professeur, Université de Metz	Président
Mme I. PERES, Professeur, Université Nouvelle de Lisbonne (Portugal)	Rapporteur
M J.L. PINEAU, Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
M Y. RICHARD, Professeur, Ecole Vétérinaire de Lyon	Rapporteur
M J.L. MOREL, Professeur, INPL-ENSAIA, Nancy	Examinateur
M L. GOMOT, Professeur, Université de Franche-Comté (Directeur de thèse)	Examinateur
Mlle L. GIAMBERINI, Maître de Conférences, Université de Metz	Examinateur
Mme A. de VAUFLEURY, Maître de Conférences, Université de Franche-Comté	Examinateur
M. J. GHANBAJA, Docteur. Ingénieur de recherche, Université de Nancy I	Examinateur

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ
031 465861 0

ANNEXE :
LEGENDE DES PLANCHES DE L'ETUDE HISTOLOGIQUE
(EXEMPLAIRE VOLANT)

	Abréviations	*Légende*
A	***Ac.***	Actine
	Al.	Aliment
	Aur.	Acide urique
B	***B.Br.***	Bordure en brosse
C	***C.***	Concrétion
	C.C.	Cell coat
	C.C.Ca.	Concrétion de la cellule à calcium
	C.C.G.D.	Cellule du canal de la glande digestive
	C.Ca.	Cellule à calcium de la glande digestive (cellule basophile)
	C.Ca.Cj.	Cellules à calcium du conjonctif
	C.Cj.	Capsule conjonctive
	C.D.	Cellule digestive
	C.D.Exc.	Cellule digestive en phase excrétrice
	C.D.Gd.	Cellule digestive de la glande digestive
	C.Ed.+	Couche électrondense
	C.j.	Conjonctif
	C.Ed.-	Couche peu électrondense
	C.M.	Crête mitochondriale
	C.N.	Concrétion du néphrocyte
	C.P.	Cellules à pores (« pore cells »)
	C.Pi.	Cellule pigmentée
	C.Pn.	Citerne périnucléaire
	C.r.-C.R.	Corps résiduel (système lysosomial, lipofuscine, figures myéliniques)
	C.REL.	Citerne du REL
	C.REL.C.	Citerne du REL avec condensat
	C.S.M.	Crête sacculaire mitochondriale
	C.Ur.	Canal urinaire primaire
	C.V.	Coalescence de vésicules
	Cj. P.	Conjonctif pédieux
	Cj. P.I.	Conjonctif péri-intestinal
	Cj.P.R.	Conjonctif péri-rénal
	Co.	Fibres de collagène
	Co.V.A.	Colloïdes de la vacuole apicale
	Cu.RE.	Cupule du réticulum endoplasmique lisse
D	***D.***	Desmosome
	D.C.	Déchets cellulaires
	D.Pu.	Déchets puriques
	De.	Desmosome cloisonné = jonction septée
E	***E.D.***	Epithélium dorsal
	E.D.X.	Analyse X
	Eh.	Entérohépatocyte
	E.E.L.S.	Analyse par perte d'énergie
	E.I.	Espace intercellulaire
	E.In.	Epithélium intestinal
	End.	Endocytose
	E.V.	Epithélium ventral
F	***F.***	Fente de filtration
	Fl.REL.	Floculum lié au REL
	Fl.VA.A.	Floculum vacuolaire
	F.M.	Figure myélinique (système lysosomial)
	F.N.-N.F.	Fibre nerveuse

	Abréviations	*Légende*
G	***G.***	Appareil de Golgi (dictyosome)
	G.Cy.	Granule cytoplasmique
	G.D.	Glande digestive
	Gl.	Glycogène
	Gr.M.	Grain métallique
	Gr.M.Al.	Granule métallique dans l'alimentation
	Gr.M.Eh.	Granule métallique d'entérohépatocyte
	Gr.M.Cj.	Granule métallique de cellule du conjonctif
	Gr.M.H.	Granule métallique dans l'hémocyte
	G.S.	Grain de sécrétion
H	***H.***	Hémocyte
	Hc.	Hémocyanine
	He.	Hémolymphe
	Het.	Hétérochromatine
I	***I.D.***	Interdigitation
	I.L.	Inclusion lipidique
	I.Mb.Pl.L.	Invagination de la membrane plasmique latérale
	Inv.	Invagination de la membrane plasmique
J	***J.S.***	Jonction serrée = « tight junction »
L	***L.***	Lumière
	L.B.	Lame basale
	L.C.U1.	Lumière du canal urinaire primaire
	L.C.G.D.	Lumière du canal de la glande digestive
	L.E.I.	Lésion de l'épithélium intestinal
	L.G.D.	Lumière de la glande digestive
	L.I.	Lumière intestinale
	L.R.	Lumière rénale
	L.Va.	Liquide vacuolaire
	La.R.	Lamelle rénale
	Lf.	Lipofuscine
	Ly.	Lysosome
	Ly1.	Lysosome primaire
	Ly2.	Lysosome secondaire (phagolysosome)

	Abréviations	*Légende*
M	***M.***	Mitochondries
	Mc.	Mucocyte
	M.D.	Mitochondrie en division
	M.F.	Mitochondrie filamenteuse et branchée
	M.M.	Matrice mitochondriale
	M.P.	Matrice du péroxysome (catalases)
	Mb.L.	Membrane du lysosome
	Mb.M.Ext.	Membrane mitochondriale externe
	Mb.M.Int.	Membrane mitochondriale interne
	Mb.N.	Membrane nucléaire
	Mb.P.	Membrane du péroxysome
	Mb.P.A.	Membrane plasmique apicale
	Mb.P.B.	Membrane plasmique basale
	Mb.P.L.	Membrane plasmique latérale
	Mb.Ph.Ly.	Membrane du phagolysosome
	Mb.V.C.	Membrane de la vacuole à concrétion
	Mb.Va.	Membrane de la vacuole apicale
	M.E.T.	Microscopie électronique à transmission
	M.P.	Matrice du péroxysome
	Mt.	Microtubule
	Mu.	Fibre musculaire
	Mv.	Microvillosités
N	***N.***	Noyau
	N.C.	Noyau de la concrétion
	N.Ne.	Noyau du néphrocyte
	N.Py.	Noyau pycnotique
	Ne.	Néphrocyte
	Ne.F.	Néphrocyte au stade final
	Ne.I.	Néphrocyte intermédiaire
	Ne.J.	Néphrocyte jeune
	Neu.	Neurocyte
	Nu.	Nucléole
	Nui.P.	Nucléoïde du péroxysome (uricase cristallisée formant un rhomboïde
	Nup.	Nucléoplasme
P	***P.***	Péroxysome
	P.C.	« Pore cell »
	P.Ca.	Grain de phosphate de calcium
	P.Ca.M.	Grain de phosphate de calcium (mitochondrial)
	P.Ex.	Produits d'excrétion
	P.F.	Péroxysome en formation
	Phly.	Phagolysosomes

	Abréviations	*Légende*
R	***R.***	Rein
	R.L.	Ribosomes libres
	REG.	Réticulum endoplasmique rugueux
	REL.	Réticulum endoplasmique lisse
	REL.Cu.	Cupule du REL, péri-péroxysome
	REL. L.Pn.	REL lamellaire périnucléaire
	REL.On.	REL ondulé
	REL.T.D.	REL tubulaire dense
	REL.T.L.	REL tubulaire lâche
	REL.T.Pn.	REL tubulaire périnucléaire
S	***S.R.***	Sac rénal
	S.S.	Sinus sanguin
	S.S.L.R.	Sinus sanguin de la lamelle rénale
	Si.	Silice amorphe
U	***Ul.***	Uretère primaire
	U.F.	Ultra-filtrat
	U.P.	Urine primaire
V	***V.C.***	Vacuole à concrétion
	V.E.	Vésicule d'endocytose = vésicule à manteau (micropinocytose)
	V.I.Va.	Vésicule intra-vacuolaire
	V.L.	Vésicule lipidique
	Va.	Vacuole
	Va.A.-VA.A.	Vacuole apicale
	Va.D.	Vacuole digestive
	Va.D.M.	Vacuole digestive avec présence de plomb
	Va.M.	Vacuole contenant des métaux
Z		*Zonula adhaerens*

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE DE METZ

ECOLE DOCTORALE

Ressources, Procédés, Produits, Environnement

Par **François PIHAN**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

Mention : Sciences de la Vie

Spécialité : Ecotoxicologie

Caractérisation de Mollusques Gastéropodes Terrestres en tant que Bioindicateurs de la Contamination Polymétallique (Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Cu, Cd et Pb)

Soutenue le : 19/11/2001

Après avis de :

Mme I. PERES, Professeur, Université Nouvelle de Lisbonne (Portugal)	Rapporteur
M J.L. PINEAU, Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
M Y. RICHARD, Professeur, Ecole Vétérinaire de Lyon	Rapporteur

Devant la commission d'examen formée de :

Mlle P. VASSEUR, Professeur, Université de Metz	Président
Mme I. PERES, Professeur, Université Nouvelle de Lisbonne (Portugal)	Rapporteur
M J.L. PINEAU, Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
M Y. RICHARD, Professeur, Ecole Vétérinaire de Lyon	Rapporteur
M J.L. MOREL, Professeur, INPL-ENSAIA, Nancy	Examinateur
M L. GOMOT, Professeur, Université de Franche-Comté (Directeur de thèse)	Examinateur
Mlle L. GIAMBERINI, Maître de Conférences, Université de Metz	Examinateur
Mme A. de VAUFLEURY, Maître de Conférences, Université de Franche-Comté	Examinateur
M. J. GHANBAJA, Docteur. Ingénieur de recherche, Université de Nancy I	Examinateur

JE DEDIE CE TRAVAIL A MES PARENTS

REMERCIEMENTS

Je remercie Monsieur le professeur L. Gomot, directeur de thèse et Madame Annette de Vaufleury, coencadrante, de m'avoir guidé avec efficacité dans cette recherche grâce à leur parfaite connaissance du matériel biologique et de leurs contacts très proches avec les héliciculteurs, alliant aussi recherche fondamentale et recherche appliquée. J'ai apprécié leur disponibilité et l'ambiance d'équipe de recherche qu'ils ont su créer entre les équipes de Besançon et de Metz dans le cadre de contrats communs.

Que Mademoiselle L. Giambérini trouve ici l'expression de ma gratitude pour la bienveillance avec laquelle elle a suivi, à Metz, mes recherches en histologie et microanalyse ainsi que la mise à disposition de la plate-forme technique nécessaire.

Ma reconnaissance s'adresse, plus particulièrement, aux rapporteurs de cette recherche :

- Madame I. Péres, professeur à l'Université Nouvelle de Lisbonne, qui, avec patience et malgré la difficulté de la langue, a accepté de juger une recherche sur un groupe zoologique éloigné de ses préoccupations en écotoxicologie ;
- Monsieur J.L. Pineau, professeur à l'Université de Nantes, préoccupé de santé humaine et convaincu de sa liaison directe avec la santé environnementale. Il s'est toujours montré intéressé par les résultats obtenus et considère, avec intérêt, le projet "Ecothèque" ;
- Monsieur Y. Richard, professeur à l'école vétérinaire de Lyon, qui a accepté de juger ce travail et a trouvé un intérêt dans le cadre d'une extension en cours des recherches sur les causes de mortalité survenant en élevage, tout particulièrement du fait de bactéries pathogènes.

Mes remerciements s'adressent également aux examinateurs qui, malgré de lourdes charges, ont témoigné de leur intérêt à la problématique abordée, mais aussi à titres divers m'ont aidé à atteindre l'objectif :

- Mademoiselle P. Vasseur, professeur à l'Université de Metz, directeur du laboratoire EBSE, qui, à ce titre, encourage la communication entre les chercheurs, permet la réalisation des acquisitions de matériels et représente le laboratoire dans l'Ecole Doctorale RP2E Nancy-Metz ;
- Monsieur J.L. Morel, professeur à l'ENSAIA-INPL de Nancy, qui aurait pu trouver dans les performances d'un organisme phytophage un concurrent sérieux aux plantes accumulatrices de métaux mais au contraire, l'accepte prochainement en implantation sur les friches industrielles dans le cadre des activités du CEFI. De plus, en tant que porteur du projet "Ecothèque", il aura à plaider pour la reconnaissance de l'escargot parmi les organismes bioindicateurs ;
- Monsieur J. Ghanbaja, docteur, ingénieur de recherche à l'Université de Nancy I, responsable du service commun de microscopie électronique et de microanalyse, qui, avec disponibilité, compétence et intérêt, s'est associé pleinement aux recherches sur un organisme éloigné de ses préoccupations propres de chercheur.

En fin de travail, j'ai une pensée particulièrement reconnaissante vis-à-vis de tous ceux qui m'ont aidé, encouragé à divers titres :

- Pour les travaux sur sites, la réalisation des microcosmes et la construction de la salle d'élevage : Monsieur Philippe Wagner et Monsieur J.F. Poinsaint ;

- Pour les études histologiques en microscopie optique et électronique : Madame A. Meyer ainsi que Monsieur Dominiak, responsable du service de microscopie électronique de Metz ;
- Pour les études isotopiques : Monsieur F. Laurensot, chargé d'études au laboratoire d'hygiène et de recherche en santé publique de la faculté de médecine de l'Université de Nancy I ;
- Pour la partie analytique en absorption atomique : Monsieur E. Morhain ;
- Pour la documentation scientifique : Madame M. Ollivier ;
- Pour le secrétariat administratif et scientifique : Mesdames C. Drui et N. Kleinen ;

Mes remerciements s'adressent aux directeurs des sites industriels pour avoir accepté l'implantation et l'aide au suivi des microcosmes (Cedilor et Aciérie électrique)

Merci à Christelle, Sandrine, Damien, Bénédicte et Franck, aux étudiants stagiaires pour leur aide efficace et leur esprit d'équipe.

Je souhaite également remercier toutes celles et ceux qui, dans les différents services de l'UFR Sci.Fa. et de la Présidence de l'Université contribuent à la gestion des chercheurs.

Ce travail a été financièrement soutenu par :

- Le GNPE, sous la présidence de Madame Oblin, et le Ministère de l'Agriculture ;
- Le MENRT : Progamme « Biotechnologies » 1998-2001 en partenariat avec l'Université de Besançon, l'IRH de Nancy et le CREED.

Je souhaite remercier la Direction des Abattoirs de Metz qui, par la mise à disposition de locaux, a permis de réaliser une salle d'élevage pour escargot.

SOMMAIRE

PAGES

AVANT-PROPOS 1

PREMIERE PARTIE : PROBLEMATIQUE ET SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE 3

Chapitre I : Méthodes d'évaluation de la contamination en environnement terrestre 4

I.1. Introduction 4

I.2. Les tests biologiques appliqués à l'étude de la contamination de l'environnement terrestre. Intérêt des gastéropodes 4

I.3. Capacité de bioaccumulation des gastéropodes aquatiques et terrestres vis-à-vis des métaux. Comparaison avec les mollusques bivalves et d'autres invertébrés 7

I.4. Cinétique de contamination et de décontamination des métaux 12

I.5. Capacités de bioaccumulation des gastéropodes en fonction des différents métaux et de leur organotropisme 14

I.6. Possibilité de développer un test basé sur la croissance pondérale des escargots 23

Chapitre II : Aspects généraux concernant les métaux 25

II.1. La classification des métaux 25

II.2. Incorporation des métaux dans la cellule 26

II.3. Devenir des métaux dans la cellule 27

Chapitre III : Données anatomiques histologiques et physiologiques comparées des gastéropodes ; spécificité parmi les mollusques 29

III.1. Anatomie, histologie et physiologie du tractus digestif 29

III.2. Anatomie, histologie et physiologie du rein des gastéropodes 50

III.3. Les cellules du conjonctif, du sang et du système nerveux intervenant dans le métabolisme des métaux 66

III.4. Schéma général de la coordination entre les différents types cellulaires intervenant dans le métabolisme des métaux 72

DEUXIEME PARTIE : Matériel et Méthodes 76

Chapitre I : Les différentes espèces de gastéropodes utilisés 76

Chapitre II : Elevage – Nourriture – Croissance de référence 82

II.1. Paramètres environnementaux 82

II.2. Matériel d'élevage 84

II.3. Maintenance de l'élevage 84

Chapitre III : Monitoring actif et passif 89

Chapitre IV : Contamination en laboratoire 91

IV.1. Environnement des expériences 91

IV.2. Matériels 91

Chapitre V : Analyse des métaux 96

V.1. Spectrométrie d'absorption atomique 96

V.2. Analyse des isotopes du plomb 96

Chapitre VI : Méthodes histologiques (microscopie optique, électronique et microanalyse) 97

VI.1. Microscopie optique 97

VI.2. Microscopie électronique 98

VI.3. Analyse aux rayons X, spectre EEL et LAMMA 101

VI.4. Analyse d'image 103

Chapitre VII : Méthodes d'analyses statistiques 104

TROISIEME PARTIE : Résultats. Les Gastéropodes et la Bioindication de la Contamination polymétallique 105

Chapitre I : Etablissement d'une grille de contamination polymétallique appliquée à *Helix aspersa aspersa* 105

I.1. Screening des concentrations en cuivre (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa* 105

I.2. Screening des concentrations en zinc (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa* **109**

I.3. Screening des concentrations en cadmium (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa* à partir de lots d'*Helix aspersa aspersa* provenant de la nature et de lots d'élevage **113**

I.4. Screening des concentrations en manganèse (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa* **116**

I.5. Screening des concentrations en plomb (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa* **116**

I.6. Screening des concentrations en nickel (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa* **121**

I.7. Screening des concentrations en fer (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa* **126**

I.8. Screening des concentrations en chrome (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa* **126**

I.9. Conclusion et discussion sur les capacités de bioaccumulation d'*Helix aspersa aspersa*. Comparaison des capacités de bioaccumulation d'*Helix aspersa aspersa*, *Helix aspersa maxima* et *Helix pomatia*. Propositions concernant les concentrations en métaux dans l'aliment d'élevage **129**

Chapitre II : Comparaison des capacités de bioaccumulation de cuivre et de zinc chez deux sous espèces d'*Helix*, *Helix aspersa aspersa* et *Helix aspersa maxima* **140**

Chapitre III : Biosurveillance passive. Etude de la contamination polymétallique de populations autochtones en fonction d'activités anthropiques actuelles ou anciennes **150**

III.1. Biosurveillance en environnement soumis à un trafic automobile **150**

III.2. Biosurveillance en environnement d'ancienne exploitation minière. Mine de cuivre de Léouvé **159**

Chapitre IV : Biosurveillance active. Etude de la contamination polymétallique de lots d'*Helix aspersa aspersa* transférés **173**

IV.1. Biosurveillance en environnement autoroutier (A31). Site de Bouxières-sous-Froidmont **173**

IV.2. Biosurveillance en environnement industriel : utilisation de l'escargot comme organisme bioindicateur de la contamination polymétallique d'un centre d'enfouissement technique et de l'efficacité de la remédiation effectuée 183

IV.3. Biosurveillance en environnement anthropisé 196

IV.4. Biosurveillance en environnement industriel. Application de la bioindication par les gastéropodes sur un site sidérurgique (pour des raisons de confidentialité, la société n'est pas nommée ni localisée) et la friche industrielle associée 207

Chapitre V : Détermination de l'origine du plomb par l'étude de ses isotopes ^{206}Pb, ^{207}Pb et ^{208}Pb 243

V.1. Données bibliographiques 243

V.2. Nomenclature des échantillons : Sols, poudres métalliques, poussières d'aciérie, hydroxydes métalliques après traitement physico-chimique. Escargots d'élevage, escargot contaminés en laboratoire, escargot transférés *in situ* 252

V.3. Résultats et discussion 253

CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE 257

QUATRIEME PARTIE : ETUDE HISTOLOGIQUE ET MICROANALYTIQUE DE LA CONTAMINATION POLYMETALLIQUE CHEZ *Helix aspersa aspersa* 259

Introduction 259

Chapitre I : Rôle de la glande digestive dans l'absorption des métaux sous forme particulaire ou dissoute 259

I.1. Etude histologique de la glande digestive chez le témoin (microscopie optique et électronique) 260

I.2. Etude histologique de la glande digestive d'escargots contaminés par des métaux 274

I.3. Etude par microanalyse de la localisation des métaux dans les cellules de la glande digestive 274

Chapitre II : Rôle de l'intestin proximal dans l'absorption des métaux 284

II.1. Etude histologique de l'intestin proximal chez le témoin (microscopie optique et électronique MET) 284

II.2. Etude histologique de l'intestin proximal d'escargots contaminés par des métaux particulaires 285

II.3. Etude par microanalyse de la localisation des métaux dans les cellules de l'intestin proximal 298

Chapitre III : Le rein de *Helix aspersa aspersa* 300

III.1. Anatomie du rein 300

III.2. Le néphrocyte : étude en microscopie optique et électronique (MET) 300

III.3. L'uretère primaire 326

III.4. Etude par microanalyse de la localisation des métaux dans le néphrocyte 326

III.5. Conclusion et discussion sur la nature et le rôle des concrétions 352

Chapitre IV : Comparaison des concrétions de la glande digestive et du rein chez *Helix aspersa* 367

Chapitre V : Comparaison des concrétions des cellules à calcium digestives et des néphrocytes entre *Helix aspersa aspersa* et *Helix pomatia* 373

Chapitre VI : Localisation des métaux dans le pied 381

VI.1. Etude histologique du pied chez le témoin et les animaux contaminés par de la poudre de plomb 381

VI.2. Etude par microanalyse de la localisation des métaux dans le pied 381

Chapitre VII : Synthèse : Proposition et discussion des voies de passage, transport et élimination de la silice et des métaux 391

VII.1. Silice et aluminium 391

VII.2. Plomb, fer, cuivre, zinc et manganèse 394

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 398

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 404

LISTE DES FIGURES
(HORS PUBLICATIONS INTERCALEES)

Figure 1 (d'après Dallinger *et al.*, 1989) : Utilisation des isopodes en bioindication

Figure 2a : Voies de contamination par les métaux chez un gastéropode pulmoné terrestre

Figure 2b : Illustration des trois phases de la biodisponibilité des métaux en milieu terrestre adapté d'après les concepts proposés en milieu aquatique par Hamelink *et al.* (1994) modifié par Gomot (*in* Texier *et al.*, 1996)

Figure 3 : Différentes cinétiques d'accumulation dans les principaux organes de *Helix pomatia* nourris avec un aliment additionné de métaux lourds d'après Dallinger et Wieser (1984a)

Figure 4 : Flux de cadmium au travers des organes d'un spécimen moyen de *Helix pomatia.* (d'après Berger *et al.*, 1993)

Figure 5 : Concentrations en cadmium dans l'ensemble des tissus mous du corps et dans la glande digestive de *Helix pomatia* après une expérimentation de 21 jours avec une alimentation à base d'Agar enrichi par des concentrations différentes de cadmium (d'après Berger *et al.*, 1993)

Figure 6 : Relation entre la concentration d'un élément et ses effets (d'après Taylor, 1995)

Figure 7 : Diagramme du tractus digestif d'*Helix aspersa aspersa* Müller illustrant les différentes catégories cellulaires épithéliales, sous-épithéliales et glandulaires qui participent au processus extracellulaires et intracellulaires de la digestion (d'après Charrier, 1995)

Figure 8 a et b : a) : Photographie en MET d'une concrétion de calcium dans une cellule de la glande digestive de *Arion ater* (échelle : 0,25 µm) (*in* Cajaraville, 1995). b) Analyse élémentaire à la microsonde XD d'un granule minéralisé de la cellule basophile ou cellule à calcium de *Littorina littorea* (*in* Cajaraville, 1995) Association P/Ca/Mg

Figure 9 : Photographie en microscopie optique de la glande digestive de *Littorina littorea* avec cellules digestives (D), cellules basophiles à calcium (B) et lumière du tubule (L) (échelle 50 µm) (Cajaraville, 1995)

Figure 10 : Modèle de fractionnement de la métallothionéine liée au cadmium de la glande digestive d'*Helix pomatia* exposé au métal après une HPLC en phase inverse (d'après Dallinger, 1995)

Figure 11 : Expérience à court terme montrant l'inductibilité et la saturation en cadmium de la Cd-métallothionéine d'*Helix pomatia.*

Figure 12 : Hémocyanine de coefficient de sédimentation 100 S d'*Helix pomatia* (*in* Miller, 1994) et interprétation de la structure décamérique

Figure 13 : Interprétation cellulaire des expériences isotopiques (d'après Taylor, 1995) utilisant des métaux

Figure 14 : Concrétions rénales de *Helix pomatia* selon Bouillon. (1960)

Figure 15 : Synthèse explicative de la filtration par le rein chez les pulmonés terrestres (traduit de Skelding, 1973)

Figure 16 : Ultrastructure du rein de *Pomatias elegans* selon Martoja (1975)

Figure 17 : Ultrastructure du rein de *Theba pisana* traduit de Diaz Cosin (1977)

Figure 18 : Ultrastructure d'*Helix aspersa aspersa* interprété selon Sanchez *et al.* (1980)

Figure 19 : Schéma du catabolisme nucléique des bases puriques (selon Gomot, 1994)

Figure 20a : Néphrocyte de *Arion ater* selon Angulo et Moya (1984)

Figure 20b : Evolution cyclique des néphrocytes de *Theba pisana* (traduit de Diaz Cosin, 1977)

Figure 21 : Schéma de la cellule à calcium du tissu conjonctif des gastéropodes (*in* Cajaraville (1995) modifié de Mason (1983)). Classement dans les cellules à minéralisation externe

Figure 22 : Illustrations de la cellule à calcium du tissu conjonctif de *Littorina* (*in* Cajaraville, 1995)

Figure 23 : Schéma d'une « pore cell » de gastéropode *in* Cajaraville, 1995 modifié par Mason en 1983 chez *Littorina littorea*

Figure 24a : Cytoplasme d'une cellule à pores de *Lymnaea stagnalis* contenant de l'hémocyanine sous forme cristalline dans le réticulum endoplasmique granuleux dilaté (Prof Dr. T. Sminia)

Figure 24b : Cellule à pore du gastéropode *Lymnaea stagnalis* avec des molécules d'hémocyanine sous forme cristalline dans les citernes du réticulum endoplasmique granuleux dilaté (Prof Dr. T. Sminia)

Figure 25 : Photographie en microscopie électronique à transmission (échelle : 0,25µm) d'une structure de percolation avec pore chez *Littorina littorea* (*in* Cajaraville, 1995)

Figure 26 : Schéma illustrant la voie de mobilisation du cadmium dans l'ensemble des tissus de *Littorina littorea* avec l'indication des types de cellule impliqués dans l'élimination du métal (modifié de Marigomez *et al.*, 1990 et Nott *et al.*, 1993)

Figure 27 : Interprétation schématique du rôle des cellules à calcium dans les échanges calciques à travers les différents compartiments concernés chez les Pulmonés Stylommatophores. D'après Fournié et Chétail (1982)

Figure 28 : Schéma illustrant la voie de mobilisation des métaux traces de classe A ou B dans l'ensemble des tissus de gastéropodes hélicidés (Charrier, 2000)

Figure 29 : Schéma de la salle d'élevage

Figure 30 : Principe de l'interaction électron-matière

Figure 31 : Concentrations en cuivre dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature

Figure 32 : Concentrations en cuivre dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Figure 33 : Corrélation entre la concentration en cuivre dans l'aliment et la concentration en cuivre dans le pied (c_1) et les viscères (c_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Figure 34 : Concentrations en zinc dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature

Figure 35 : Concentrations en zinc dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Figure 36 : Corrélation entre la concentration en zinc dans l'aliment et la concentration en zinc dans le pied (c_1) et les viscères (c_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Figure 37 : Concentrations en cadmium dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

Figure 38 : Corrélation entre la concentration en cadmium dans l'aliment et la concentration en cadmium dans le pied (b_1) et les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Figure 39 : Concentrations en manganèse dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

Figure 40 : Corrélation entre la concentration en manganèse dans l'aliment et la concentration en manganèse dans le pied (b_1) et les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Figure 41 : Concentrations en plomb dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

Figure 42 : Corrélation entre la concentration en plomb dans l'aliment et la concentration en plomb dans le pied (b_1) et les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Figure 43 : Concentrations en nickel dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

Figure 44 : Corrélation entre la concentration en nickel dans l'aliment et la concentration en nickel dans le pied (b_1) et les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Figure 45 : Concentrations en fer dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

Figure 46 : Corrélation entre la concentration en fer dans l'aliment et la concentration en fer dans le pied (b_1) et les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Figure 47 : Concentrations en chrome dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

Figure 48 : Corrélation entre la concentration en chrome dans l'aliment et la concentration en chrome dans le pied (b_1) et les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Figure 49 : Concentrations en cuivre dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa maxima* d'élevage et dans l'aliment

Figure 50 : Corrélation entre la concentration en cuivre dans l'aliment et la concentration en cuivre dans le pied (b_1) et les viscères (b_2) d'*Helix aspersa maxima*

Figure 51 : Concentrations en zinc dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa maxima* d'élevage

Figure 52 : Corrélation entre la concentration en zinc dans l'aliment et la concentration en zinc dans le pied (b_1) et les viscères (b_2) d'*Helix aspersa maxima*

Figure 53a$_1$: Concentrations en plomb dans le pied d'*Helix pomatia*

Figure 53a$_2$: Concentrations en plomb dans les viscères d'*Helix pomatia*

Figure 54 : Gamme de concentration acceptable en cuivre + zinc dans l'aliment

Figure 55 : Concentrations en Cd, Cr, Ni et Pb dans les viscères des escargots prélevés au bord de l'autoroute A7 sur l'aire de la Manon

Figure 56 : Concentrations en Cu, Fe, Mn et Zn dans les viscères des escargots prélevés au bord de l'autoroute A7 sur l'aire de la Manon

Figure 57 : Concentrations en Cd, Cr, Ni et Pb dans les viscères des escargots prélevés dans le parc de Vaugrenier

Figure 58 : Concentrations en Cu, Fe, Mn et Zn dans les viscères des escargots prélevés dans le parc de Vaugrenier

Figure 59 : Situation géographique de la mine de cuivre du Cerisier (d'après Mari, 1992)

Figure 60 : Plan des travaux miniers sur le site du Cerisier (d'après Mari, 1992)

Figure 61 : Reconstitution du site de récolte des individus autochtones (Site de Léouvé)

Figure 62 : Concentrations métalliques en mg/kg de MS (Cu, Fe, Mn et Zn) dans les viscères des escargots des Lots L_1, L_2 et L_3 (*Helix pomatia*) – Site de Léouvé

Figure 63 : Concentrations métalliques en mg/kg de MS (Cd, Cr, Ni et Pb) dans les viscères des escargots des Lots L_1, L_2 et L_3 (*Helix pomatia*) – Site de Léouvé

Figure 64 : Concentrations métalliques en mg/kg de MS (Cd, Cr, Ni et Pb) dans les viscères des escargots des Lots L_4, L_5 (*Helix pomatia* ; n = 5) et L_6 (*Cepaea nemoralis* ; n = 5)

Figure 65 : Concentrations métalliques en mg/kg de MS (Cu, Fe, Mn et Zn) dans les viscères des escargots des Lots L_4, L_5 (*Helix pomatia* ; n = 5) et L_6 (*Cepaea nemoralis* ; n = 5)

Figure 66 : Schéma représentant le site de Bouxières-sous-Froidmont avec le lieu d'implantation des cages où les *Helix aspersa aspersa* ont été transférés

Figure 67 : Valeurs moyennes (n = 9 et écarts types) des concentrations en plomb dans les pieds et les viscères d'H.a.a. un mois après leur transfert en fonction de la distance des cages par rapport à l'autoroute A31

Figure 68 : Contenu en plomb par escargot (mg/escargot ; n = 9) selon un ordre croissant pour l'ensemble des cages et pour le lot témoin (A31)

Figure 69 : Evolution des concentrations moyennes en plomb montrant la cinétique de la contamination en plomb dans les pieds et les viscères d'H.a.a. in situ sur une période de 1 mois (n = 9) – A31

Figure 70 : Concentrations en plomb dans les viscères en fonction de l'éloignement à l'autoroute et après une semaine d'exposition (valeurs moyennes ; n = 5)

Figure 71 : Concentrations moyennes en plomb (mg/kg de poids sec) dans les pieds et les viscères en comparaison avec la concentration moyenne en plomb dans la nourriture Helixal® formulée en 1996

Figure 72 : Concentrations en fer, manganèse, nickel et plomb dans les lixiviats (CET) – Données de Cedilor

Figure 73 : Débits mensuels des lixiviats (m^3) – CET – Données de Cedilor

Figure 74-1 : Concentrations en cadmium (a), nickel (b), fer (c), et plomb (d) dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* et d'*Helix pomatia*

Figure 74-2 : Concentrations en chrome (e), manganèse (f), cuivre (g), et zinc (h) dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* et d'*Helix pomatia*

Figure 75a : Plan de l'aciérie et localisation des 5 stations proches des activités de production

Figure 75b : Concentrations en métaux dans les différents lots d'escargots autochtones ou transférés (A : Zn, B : Fe, C : Pb, D : Mn, E : Cr, F : Cu, G : Cd, H : Ni)

Figure 76 : Evolution du rapport isotopique $^{206}Pb/^{207}Pb$ en fonction des régions, de l'origine du plomb des essences, du sol de surface ou profond, des aérosols, de la pluie et des sources industrielles

Figure 77a : Corrélation entre les rapports isotopiques $^{208}Pb/^{206}Pb$ et $^{206}Pb/^{207}Pb$

Figure 77b : Corrélation entre les rapports isotopiques $^{206}Pb/^{207}Pb$ et $^{208}Pb/^{207}Pb$

Figure 77c : Corrélation entre les rapports isotopiques $^{208}Pb/^{206}Pb$ et $^{208}Pb/^{207}Pb$

Figure 78 : Représentation schématique de l'ultrastructure des différents types cellulaires d'un lobule de la glande digestive (échelle = 1 µm)

Figure 79 : Observation en microscopie électronique d'un corps résiduel de cellule digestive (G x 8.800)

Figure 80 : Spectre LAMMA d'une cellule digestive

Figures 81 a, b et c : Identification des formes de phosphore des concrétions des cellules à calcium

Figure 82 : Représentation d'un entérohépatocyte et d'un mucocyte de l'intestin proximal de *Helix aspersa aspersa.* (échelle = 1 µm)

Figure 83 : Schéma synthétique d'un néphrocyte en situation moyenne sur la lamelle rénale (néphrocyte au stade intermédiaire (Ne.I.). (échelle = 1 µm)

Figure 84 : Schéma de l'ultrastructure d'un néphrocyte de *Helix aspersa aspersa* au stade final, en situation apicale sur la lamelle rénale. (échelle = 1µm)

Figure 85 : Catabolisme des purines et des produits terminaux chez les animaux (d'après Berkaloff *et al.*, 1981)

Figure 86 : Détail d'une concrétion rénale (x 15.000)

Figure 87 : Spectre EEL au niveau d'une couche non-électrondense de la concrétion

Figure 88 : Formule d'un mucopolysaccharide

Figure 89 : Bilan de l'étude des constituants élémentaire du néphrocyte

Figure 90 : Cristaux d'urates chez l'Homme provoquant l'autolyse des granulocytes (d'après Theret *et al.*, 1985)

Figure 91 : Complexes poly-siliciques

Figure 92 : Effet du manganèse sur le poids sec du poids en absence et en présence de silice (1-55 mg SiO_2/litre). (modifié d'après Horst et Marschner, 1978)

Figure 93 : Autoradiographie montrant l'effet de la silice (0,75 mg SiO_2/litre) sur la distribution du ^{54}Mn dans les feuilles de pois contaminés pendant 6 jours par 0,1mM de ^{54}Mn (d'après Horst et Marschner, 1978 a)

Figure 94 : Exemple de champ du microscope étudié en analyse d'image. Concrétions de différentes tailles en fonction de leur stade de biogénèse chez *Helix aspersa aspersa*

Figure 95 : Répartition de la taille des concrétions en effectif cumulé (n = 127)

Figure 96 : Effectif des concrétions par classe de diamètre (en µm)

Figure 97 : Schéma illustrant les voies de passage, transport et élimination de Si et Al dans l'organisme de *Helix aspersa aspersa*

Figure 98 : Schéma illustrant les voies de passage, transport et élimination de Pb, Fe, Cu, Zn et Mn dans l'organisme de *Helix aspersa aspersa*

LISTE DES TABLEAUX
(HORS PUBLICATIONS INTERCALEES)

Tableau 1 (modifié de Taylor *in* Cajaraville, 1995) : Concentrations (mg/kg de poids sec) des métaux dans les tissus mous de quelques mollusques marins en relation avec la composition (µg/kg) de l'eau de mer (données de Bryan, 1976 et de Segar *et al.*, 1971)

Tableau 2 : Concentrations (mg/kg de poids sec) en cadmium, zinc, plomb et cuivre chez les gastéropodes aquatiques d'après Timmermans (1993)

Tableau 3 : Proposition de valeurs de concentrations en Cd, Zn, Pb et Cu de gastéropodes aquatiques des milieux non pollués et des milieux pollués (en mg/kg de poids sec)

Tableau 4 : Concentrations maximales et minimales chez cinq espèces de gastéropodes dulçaquicoles (en mg/kg de poids sec)

Tableau 5 : Facteurs de bioconcentration chez les invertébrés. Quelques exemples de macro, micro et déconcentreurs d'après Dallinger (1993)

Tableau 6 : Répartition des différentes concentrations en cadmium chez *Helix pomatia* après 21 jours en fonction de différents ajouts en cadmium dans la nourriture (d'après Berger *et al.*, 1993)

Tableau 7 : Concentrations en Zn, Cu, Cd et Pb des aliments utilisés à partir de 0 jour, aliment contaminé jusqu'à 32 jours, en µg/g de poids sec puis décontamination jusqu'à 80 jours

Tableau 8 : Concentrations en µg/g de poids sec en zinc, cuivre et cadmium des organes de *Helix pomatia*

Tableau 9 : Tableau périodique des éléments montrant ceux nécessaires à la vie (d'après Taylor, 1995)

Tableau 10 : Classification des métaux, selon Nieboer et Richardson (1980), en classes A, B et de transition et selon un degré croissant d'ionisation

Tableau 11 : Proposition de formulation d'aliments pour escargot

Tableau 12 : Résumé des différents aliments relevés dans la littérature et utilisés dans l'alimentation des escargots

Tableau 13 : Teneurs en cations dans les différents compléments minéraux de l'aliment (d'après Gomot, 1994)

Tableau 14 : Classement des différentes espèces d'escargots selon le dosage des macro-éléments P, Ca et Mg dans le pied et les viscères

Tableau 15 : Catégories cellulaires de la glande digestive des gastéropodes

Tableau 16 : Distribution des cellules à calcium épithéliales au niveau de la glande digestive des Mollusques (d'après Fournié et Chétail, 1982)

Tableau 17 : Séquence primaire des acides aminés d'une métalloprotéine d'*Helix pomatia* (d'après Dallinger, 1995)

Tableau 18 : Structure primaire d'une métallothionéine d'*Helix pomatia* (d'après Dallinger, 1995)

Tableau 19 : Biominéralisation le long de la chaîne alimentaire chez des Mollusques marins (d'après Nott et Nicolaidou, 1990)

Tableau 20 a, b et c : Résumé des données essentielles des connaissances sur le rein des gastéropodes

Tableau 21a : Distribution anatomique et systématique des cellules à calcium dans le tissu conjonctif des Mollusques (d'après Fournié et Chétail (1982))

Tableau 21b : Distribution anatomique et systématique des amœbocytes accumulant le calcium chez les Mollusques (d'après Fournié et Chétail, 1982)

Tableau 22 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des espèces utilisées

Tableau 23 : Composition de l'aliment Helixal®

Tableau 24a : Proposition de grille de contamination pour les viscères d'*Helix aspersa aspersa* pour Cu, Fe, Mn et Zn en mg/kg de MS

Tableau 24b : Proposition de grille de contamination pour les viscères d'*Helix aspersa aspersa* pour Cd, Cr, Ni et Pb en mg/kg de MS

Tableau 25 : Synthèse des capacités de bioaccumulation de *Helix aspersa aspersa* en fonction du métal et des parties de l'organisme analysées

Tableau 26 : Synthèse des capacités de bioaccumulation de *Helix aspersa maxima* en fonction du métal et des organes analysés

Tableau 27 : Récapitulatif des classes pour les différents métaux des espèces étudiées (aire de La Manon)

Tableau 28a : Récapitulatif des classes pour les différents métaux des espèces étudiées (Parc de Vaugrenier)

Tableau 28b : Profil de contamination polymétallique de *Eobania vermiculata* en fonction de leur lieu de récolte

Tableau 29 : Résumé des données de concentrations en métaux obtenues pour le minerai, les haldes, l'eau et les lots L_1, L_2 et L_3 (Site de Léouvé)

Tableau 30 : Classes d'appartenance des lots L_1, L_2 et L_3 selon les grilles de Pihan *et al.* (1995) et de Berger et Dallinger (1993)

Tableau 31 : Diagnostic des appartenances des lots Léouvé L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 (*Helix* pomatia) et L_6 (*Cepaea* nemoralis) à la grille de contamination établie par Pihan *et al.* (1995)

Tableau 32 : Classement des indices polymétalliques des différents lots par ordre décroissant

Tableau 33a : Résultats du test non-paramétrique de Mann-Whitney concernant la concentration en plomb ($mg.kg^{-1}$) dans les viscères - A31

Tableau 33b : Résultats du test non-paramétrique de Mann-Whitney concernant la concentration en plomb ($mg.kg^{-1}$) dans les pieds - A31

Tableau 34 : Résultats du test non-paramétrique de Mann-Whitney concernant le contenu en plomb (mg/escargot) - A31

Tableau 35 : Comparaisons des teneurs en métaux dans le lot 1/lot 3, lot 2/lot 1 et lot 2/lot 3 ; rappel des métaux présents ou non dans les lixiviats

Tableau 36 : Comparaison des diagnostics obtenus avec les deux espèces *Helix pomatia* (H.p.) et *Helix aspersa aspersa* (H.a.a.) dans deux situations différentes : l'utilisation d'animaux de la nature pour H.p. et des animaux d'élevage pour H.a.a

Tableau 37 : Situation de la contamination métallique 18 mois après la remédiation du CET

Tableau 38 : Comparaison entre les deux sites du CET (lots 8 et 9) où les escargots ont été transférés et la référence (lot 5). Comparaison entre les résultats à deux périodes différentes après la remédiation (1,5 ans : lot 7 ; 2,5 ans : lots 8 et 9)

Tableau 39 : Situation deux ans et demi après la remédiation du CET

Tableau 40 : Synthèse des résultats analytiques avant et après remédiation pour les huit métaux étudiés. H.p. : *Helix pomatia* ; H.a.a. : *Helix aspersa aspersa*

Tableau 41 : Classification des lots du CET selon la grille de Berger et Dallinger (1993). Les teneurs sont exprimées en $mg.kg^{-1}$ de poids sec

Tableau 42 : Teneurs en métaux dans les poussières de l'aciérie (four électrique)

Tableau 43 : Désignation des lots du site aciérie avec, entre parenthèse, l'origine des individus (E : élevage ; tr : transféré ; A : autochtone), le nombre d'individus et l'espèce (Ha.a. : *Helix aspersa aspersa* ; H.p. : *Helix pomatia* : C.n. : *Cepaea nemoralis*)

Tableau 44 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le zinc ; a classes proposées au chapitre I et b, nouvelle proposition

Tableau 45 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le fer ; a classes proposées au chapitre I ; b nouvelle proposition

Tableau 46 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le plomb ; a classes proposées au chapitre I ; b nouvelle proposition

Tableau 47 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination pour le manganèse ; a classes proposées au chapitre I

Tableau 48 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le chrome ; a classes proposées au chapitre I ; b nouvelle proposition

Tableau 49 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le cuivre ; a classes proposées au chapitre I

Tableau 50 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le cadmium ; a classes proposées au chapitre I

Tableau 51 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le nickel ; a classes proposées au chapitre I

Tableau 52 : Synthèse du classement des différents lots de l'aciérie pour les huit métaux étudiés (Zn, Fe, Pb, Mn, Cr, Cu, Cd et Ni)

Tableau 53 : Classement retenu pour les différentes stations du site sidérurgique étudié en retenant les données de *Helix aspersa aspersa* sauf pour la station St_7 (*Cepaea nemoralis*)

Tableau 54 : Etudes des isotopes du plomb dans les minerais de plomb, les essences et les rejets industriels

Tableau 55 : Teneurs en métaux, dans les lichens, normalisés sur l'aluminium (Doucet, 1997) ; rapports intermétalliques dans les lichens et références des rejets industriels

Tableau 56 : Etudes environnementales des isotopes du plomb

Tableau 57 : Eléments organiques (M.O. : C, N et O) et minéraux détectés en EDX dans les cellules digestives et les cellules à calcium de la glande digestive témoin et dans diverses conditions de contamination (25% de poudre de zinc ou de plomb dans l'aliment, 25% de poussières d'aciérie dans le sol et l'aliment et 444 ppm de sel de cadmium en solution dans le sol)

Tableau 58 : Eléments organiques (MO : C, N et O) et minéraux détectés en EDX dans l'entérohépatocyte

Tableau 59 : Eléments organiques (M.O. : C, N et O) et minéraux détectés en EDX dans le néphrocyte témoin dans diverses conditions de contamination (25% de poudre de plomb ou de poudre de zinc dans l'aliment, 25% de poussières d'aciérie dans le sol et l'aliment et 444 ppm de sel de cadmium en solution dans le sol)

Tableau 60 : Valeurs des rapports C/N et N/O des substances de référence (guanine, acide urique, urée, calmoduline, mucopolysaccharides) et de la matière organique des concrétions rénales de *Helix aspersa aspersa* et *Helix pomatia*

Tableau 61 : Etude des sphérocristaux des insectes planipennes. Teneurs relatives en éléments minéraux et présence de déchets puriques des organes des larves âgées terrestres ou aquatiques de planipennes (d'après Martoja *et al.*, 1978 modifié)

Tableau 62 : Comparaison des caractéristiques des concrétions des cellules à calcium et des néphrocytes chez *Helix aspersa aspersa* et *Helix pomatia*

Tableau 63 : Eléments détectés par EDX dans le pied de H.a.a.

Tableau 64 : Localisations des éléments chez des gastéropodes terrestres et aquatiques selon Martoja et Martoja (1973) et comparaison avec les résultats du présent travail (tableau 65)

Tableau 65 : Proposition de grille de contamination pour les viscères de *Helix aspersa aspersa* pour Cu, Mn, Ni, Cd, Fe, Zn, Pb et Cr en mg/kg de MS en fonction des résultats des différentes expérimentations présentées dans ce travail

LISTE DES PLANCHES

Planche I : Résultats des études de détoxication des métaux par incorporations, dans les concrétions, de phosphate de calcium selon Nott et Nicolaidou (1990)

Planche II_1 : Coquilles des gastéropodes utilisés en biosurveillance active ou passive (d'après Kerney et Cameron, 1987)

Planche II_2 : Elevage de *Helix aspersa aspersa* en laboratoire

Planche II_3 : Matériel d'élevage d'*Helix aspersa aspersa*

Planche II_4 : Biomonitoring actif (figures 1 et 2) et minéralisation du matériel biologique pour analyse SAA

Planche II_5 : Expérience de contamination par des métaux particulaires en laboratoire

Planche II_6 : Appareils d'analyse des métaux. Microscopie électronique en transmission. Analyse d'image

Planche III_{1a} : Site de collecte de gastéropodes autochtones

Planche III_{1b} : Site de collecte de gastéropodes autochtones sur des restanques entre Vallauris et Antibes-lès-Pins

Planche III_2 : Site de Léouvé

Planche III_3 : Implantation de cages selon un transect autoroutier

Planche III_4 : Différents aspects de la remédiation du CET

Planche III_5 : Vue en coupe du CET et vue de dessus avec localisation des différents lots d'escargots

Planche III_{6a} : Site sidérurgique. Unité de production

Planche III_{6b} : Site sidérurgique. Unité de production

Planche III_7 : Site sidérurgique. Parc à cendres

Planche III_8 : Site sidérurgique. Parc à cendres

Planche IV_1 : Histologie de la glande digestive d'un animal témoin (échelle = 10 µm)

Planche IV_2 : Histologie de la glande digestive d'animaux de sites contaminés (1 et 2) ou contaminés par ajout de poudre de plomb dans la nourriture (3 et 4) (échelle = 10 µm)

Planche IV_3 : Histologie de la glande digestive d'animaux contaminés par ajout de poudre de plomb dans la nourriture (échelle = 10 µm)

Planche IV_4 : Ultrastructure de la glande digestive d'un animal témoin (échelle = 0,5 µm)

Planche IV_5 : Ultrastructure de la glande digestive d'un animal témoin ; Cellule digestive (figure 1) et cellule à calcium (figures 2 et 3) (échelle = 0,5 µm)

Planche IV_6 : Ultrastructure de la glande digestive d'animaux contaminés sur site autoroutier (fig. 1) ou par de la poudre de plomb dans la nourriture (fig. 2 et 3) (échelle = 0,5 µm)

Planche IV_7 : Microanalyse de la localisation des métaux dans les cellules de la glande digestive

Planche IV_8 : Microanalyse de la localisation des métaux dans les cellules à calcium

Planche IV_9. : Histologie de l'intestin proximal (échelle = 10 µm)

Planche IV_{10}. : Histologie de l'intestin proximal (échelle = 10 µm)

Planche IV_{11} : Histologie de l'intestin proximal (échelle = 10 µm)

Planche IV_{12} : Ultrastructure de l'intestin proximal (échelle = 0,5 µm)

Planche IV_{13} : Ultrastructure de l'intestin proximal (échelle = 0,5 µm)

Planche IV_{14} : Microanalyse de la localisation des métaux dans les cellules de l'intestin proximal

Planche IV_{15} : Rein (microscopie optique) (Echelle = 10 µm)

Planche IV_{16} : Rein (microscopie optique) (Echelle = 10 µm figures 1 et 2 ; 1 µm figure 3)

Planche IV_{17} : Histologie des types cellulaires, localisés à proximité du rein, et intervenant dans le métabolisme des métaux. Animaux contaminés par ajout de poudre de plomb dans la nourriture (échelle = 10 µm pour les figures 1 à 3 ; 1 µm pour la figure 4)

Planche IV_{18} : Rein (microscopie optique) (Echelle = 10 µm figure 1 ; 1 µm figures 2 et 3)

Planche IV_{19} : Rein (microscopie optique) (Echelle = 10 µm)

Planche IV_{20} : Rein (microscopie électronique) (Echelle = 0,5 µm)

Planche IV_{21} : Rein (microscopie électronique) (Echelle = 0,5 µm)

Planche IV_{22} : Rein (microscopie électronique) (Echelle = 0,5 µm)

Planche IV_{23} : Rein (microscopie électronique) (Echelle = 0,5 µm)

Planche IV_{24} : Microanalyse de la localisation des métaux dans le néphrocyte d'escargot contaminé par l'ajout de poudre de plomb dans la nourriture (figures 1 à 13)

Planche IV_{25} : Microanalyse de la localisation des métaux dans le néphrocyte d'escargot contaminé par l'ajout de poudre de zinc dans la nourriture (25% de zinc) après 4 semaines

Planche IV_{26} : Microanalyse de la localisation des métaux dans le néphrocyte d'escargot contaminé par l'ajout de poussières d'électrofiltres d'aciérie dans la nourriture (25%) et le sol (25%)

Planche IV_{27} : Composition des concrétions rénales en présence de sol contenant 75% de cendres d'aciérie (nourriture Hélixal® $2^{ème}$ âge)

Planche IV_{28} : Composition élémentaire des concrétions rénales après intoxication par un sel de cadmium additionné dans un sol artificiel

Planche IV_{29} : Spectres EEL de la guanine, de l'acide urique et de l'urée

Planche IV_{30} : Spectre EEL de la calmoduline et spectre EDX de la calmoduline avec détection du soufre

Planche IV_{31} : Spectres EEL d'une concrétion rénale de *Helix aspersa aspersa* témoin d'élevage. Figure N : schéma d'un néphrocyte et localisation des spectres EEL correspondant aux figures 8, 9 et 10

Planche IV_{32} : Spectre EEL d'une couche non-électrondense d'une concrétion de *Helix aspersa aspersa* en présence d'une nourriture contaminée au plomb (25% dans la nourriture) et spectre EEL d'une couche électrondense d'une concrétion de *Helix pomatia*

Planche IV_{33} : Microanalyse d'une concrétion d'escargot contaminé par ajout de poussières d'aciérie dans le sol (25%) et l'aliment (25%)

Planche IV_{34} : Analyse de la partie organique des concrétions d'animaux contaminés par du sel de cadmium (444 ppm) dans le sol artificiel

Planche IV_{35A} : Microanalyse de l'additif calcique de certains aliments pour l'héliciculture

Planche IV_{35B} : Morphologie comparée des corps résiduels (C.R.) de la glande digestive, des concrétions des cellules à calcium (CCCa) de la glande digestive et des concrétions rénales (C.N.) chez *Helix aspersa (échelle 10 µm)*

Planche IV_{36} : Comparaison de la composition de l'aliment Helixal® et des fécès chez *Helix aspersa* (échelle = 10 µm)

Planche IV_{37} : Histologie de la glande digestive et du rein chez *Helix pomatia* (échelle figures 1 et 3 : 10 µm et figure 2 : 1 µm)

Planche IV_{38} : Etude morphologique des concrétions des cellules à calcium de la glande digestive et des concrétions rénales chez *Helix pomatia* (échelle figures 1 à 4 : 10 µm)

Planche IV_{39} : Microanalyse des concrétions rénales et des concrétions des cellules à calcium de *Helix pomatia*

Planche IV_{40} : Histologie des types cellulaires intervenant dans le métabolisme des métaux et localisés dans le tissu conjonctif pédieux. Cellules à calcium et « pore cells » (échelle 10 µm pour les figures 1, 2 et 3 ; 1µm pour la figure 4)

Planche IV_{41} : Accumulation de plomb dans le système nerveux. Animal contaminé par ajout de plomb dans la nourriture (échelle 10 µm pour les figures 1 et 2 ; 1 µm pour la figure 3)

Planche IV_{42} : Microanalyse EDX de la localisation des métaux dans le pied d'*Helix aspersa aspersa* contaminé par de la poudre de zinc

Planche IV_{43} : Microanalyse EDX de la localisation des métaux dans le pied d'*Helix aspersa aspersa* contaminé par de la poudre de plomb, par un sel de cadmium (444 ppm)

AVANT-PROPOS

Après l'obtention d'un DEA en Sciences Agronomiques des Universités de Nancy-Metz dont le mémoire avait pour objectif l'étude de la valeur nutritive chez le ruminant d'aliments issus d'un traitement biomécanique, j'avais envisagé poursuivre en thèse sur la même problématique. Les ravages de l'ESB, l'augmentation du nombre de N.M.C.J. en Angleterre et le désengagement des industriels ont mis fin à toutes les recherches visant au développement de technologies de valorisation de certaines biomasses qui se sont révélées, très justement, à haut risque.

Il s'est avéré que cette période correspondait à une demande des héliciculteurs (GNPE) quant à une démarche de reconnaissance de la qualité de leur production. Dès lors, avec l'aide de monsieur le professeur Gomot, j'ai pu orienter ma recherche vers un double objectif de recherche fondamentale et appliquée puisque, d'une part, du fait de caractéristiques biologiques spécifiques, l'escargot présente des capacités en partie connues de bioaccumulation des métaux et que d'autre part, ces capacités peuvent nuire à la qualité de la production si l'aliment distribué présente en lui-même des concentrations trop élevées en métaux.

La démarche suivie a donc consisté à concilier recherche fondamentale et appliquée sur une même problématique à savoir la caractérisation de Mollusques gastéropodes terrestres en tant que bioindicateurs de la contamination polymétallique (Cr, Mn, Fe, Zn, Cu, Cd et Pb, et dans certaines conditions Al).

Les activités de recherche fondamentale et de recherche appliquée se sont déroulées simultanément avec la participation à des congrès relevant de l'écotoxicologie aussi bien qu'à des séminaires et journées de travail des producteurs d'escargots dont le groupement national entretient des relations avec plusieurs équipes de recherche (Universités de Besançon, de Rennes, de St Etienne, Centre INRA du Magneraud) et des centres professionnels.

Le présent mémoire suit plus ou moins cette démarche en traitant dans une première partie de la problématique et des données bibliographiques pouvant venir la conforter, nourrir une discussion ou ouvrir de nouvelles perspectives.

Il s'est avéré, au vu des premiers résultats, qu'une recherche spécifique des données existantes sur le rein des gastéropodes et sa physiologie devait être entreprise, c'est pourquoi un chapitre exhaustif est réservé à ce sujet. Les autres chapitres de cette première partie concernent la problématique de la bioindication des métaux.

La deuxième partie traite classiquement des matériels et méthodes sans faire état, du fait de la diversité des sites et des conditions expérimentales, du détail de toutes les expériences développées dans la troisième partie. Les renseignements sont fournis chapitre par chapitre dans la troisième partie.

La troisième partie présente les résultats obtenus avec une discussion chapitre par chapitre. Le premier chapitre est un screening des capacités bioaccumulatrices de *Helix aspersa aspersa* à partir des données obtenues avec les lots sauvages ou d'élevage en provenance des héliciculteurs de tout le territoire français et de certains laboratoires de recherche. Une grille de contamination a été proposée avec 4 classes pour chacun des 8 métaux. La mise en évidence d'une contamination possible par l'aliment a orienté la recherche vers un essai d'aliments contrôlés avec et sans ajouts de compléments dont le cuivre. Les capacités bioaccumulatrices différentes entre les espèces ont été étudiées pour le zinc et le cuivre chez *Helix aspersa aspersa* et *Helix aspersa maxima*. L'obtention d'animaux d'élevage exempts de toute contamination métallique (du moins au-dessus d'un seuil défini comme compatible avec

les apports et la diversité du fond pédogéologique) a permis de mettre au point et d'effectuer des travaux de biosurveillance active avec transfert d'animaux d'élevage dans des microcosmes adaptés. Les résultats de biosurveillance active ont été comparés à ceux provenant de la biosurveillance passive (récolte d'animaux autochtones de diverses espèces).

La multiplication des sites étudiés a eu pour objectif de pouvoir balayer une gamme très étendue en concentrations métalliques dans l'environnement (proximité autoroutière, trafic urbain, centre d'enfouissement technique de déchets industriels avant et après remédiation, ancienne mine d'extraction de cuivre, aciérie électrique et son parc à cendres). La grille proposée après le premier screening a été testée et a fait l'objet de nouvelles propositions dans la gamme des concentrations métalliques les plus élevées et, heureusement, non rencontrées dans le cadre des productions d'escargots ou des milieux naturels peu anthropisés.

Bien que traitant de résultats, une quatrième partie a été individualisée car elle concerne les études histologiques et microanalytiques réalisées dans l'objectif de localiser les métaux dans l'organisme et d'établir les voies de pénétration, de transport et d'élimination des différents métaux. Le néphrocyte ayant révélé être le support d'un métabolisme spécifique de la silice, une recherche élargie sur les connaissances se rapportant à cet élément a été effectuée et est présentée dans cette partie. De plus, le néphrocyte est le lieu d'une compartimentation des métaux favorables à une étude par microanalyse.

La conclusion reprend les faits acquis en troisième et quatrième parties et ouvre les perspectives de nouvelles recherches fondamentales et appliquées en cours dans les laboratoires de Besançon, de Metz et de Lyon.

PREMIERE PARTIE :
PROBLEMATIQUE ET SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

L'objectif de cette première partie est l'analyse des données bibliographiques éclairant la problématique d'une possible caractérisation de mollusques gastéropodes en tant que bioindicateurs de la contamination polymétallique. Trois chapitres traitent successivement :

- Chapitre I : des méthodes d'évaluation de la contamination polymétallique en environnement terrestre et de l'intérêt des gastéropodes par comparaison avec les autres organismes ;

- Chapitre II : d'un rappel des aspects généraux concernant la classification des métaux, leur incorporation et leur devenir dans la cellule ;

- Chapitre III : des données anatomiques, histologiques et physiologiques comparées des gastéropodes et de leur spécificité parmi les mollusques et par rapport à d'autres organismes bioindicateurs. Compte tenu des apports nouveaux concernant le rein, cet organe a fait l'objet d'une étude histologique détaillée.
  En fin de chapitre, un schéma général visualise la coordination entre les différents types cellulaires intervenant dans le métabolisme des métaux, schéma établi pour un mollusque gastéropode marin, la Littorine, en présence d'une contamination par le cadmium.

Chapitre I : Méthodes d'évaluation de la contamination en environnement terrestre

I.1. Introduction

Les éléments métalliques dans l'environnement se trouvent pour la plupart à l'état de traces. L'évaluation de la contamination de l'environnement terrestre par ces éléments est souvent difficile à réaliser en raison de la complexité et de l'hétérogénéité de la composition des sols. Pour évaluer cette contamination, plusieurs méthodes existent. Les méthodes analytiques chimiques donnent des indications fractionnées qui concernent à la fois les organismes vivants (flore, faune, micro-organismes, ...) et les composantes physico-chimiques (sol, air, eau). Ces méthodes ne mesurent cependant pas l'impact réel de la contamination métallique sur l'ensemble de l'écosystème. Par ailleurs, l'étude des éventuelles modifications de la biocénose peut donner des informations sur les conséquences des contaminations ; ce type d'étude est extrêmement difficile à mettre en place car il demande de nombreuses ressources humaines et des observations à plus ou moins long terme avec la réalisation d'inventaires exhaustifs concernant la faune et la flore. Enfin, il est possible d'étudier les effets nocifs de contaminants par des expérimentations en laboratoire et parallèlement *in situ* en utilisant des organismes bioindicateurs. Ces méthodes permettent d'obtenir des indications sur l'impact, à court terme, des contaminants dans l'environnement. Cependant, il s'agit d'une méthode qui ne reflète pas toute la complexité d'un biotope et de sa biocénose.

I.2. Les tests biologiques appliqués à l'étude de la contamination de l'environnement terrestre. Intérêt des gastéropodes

En ce qui concerne l'étude des milieux terrestres, il existe des tests avec des plantes vascularisées et seulement trois tests officiels de laboratoire qui utilisent des invertébrés (Keddy *et al.*, 1994). Deux tests : ISO/DIS 11268-1 et ISO/DIS 11268-2 qui utilisent le ver de terre *Eisenia foetida* et le test ISO/TC 190SC_4WG qui utilise le collembole *Folsomia candida.* A côté de ces tests classiques, il y a eu, ces dernières années, un accroissement de l'utilisation des techniques en microcosmes et mésocosmes car celles-ci permettent d'obtenir des données dans des conditions simulant les conditions du terrain. Pour prédire l'impact environnemental des produits chimiques sur l'écosystème sol, un microcosme de laboratoire doit offrir des caractéristiques comparables à celles du sol et fournir des données facilement interprétables. Jusqu'à présent, ce type d'étude pose des problèmes de répétabilité et les informations sont toujours difficiles à extrapoler au milieu terrestre (Edwards *et al.*, 1996). De plus les animaux utilisés sont principalement des décomposeurs comme les nématodes, les vers de terre ou encore certains arthropodes. Dallinger *et al.* (1989) ont proposé le crustacé isopode terrestre *Porcellio scaber* comme bioindicateur de la pollution des sols, par le cadmium et le plomb, de l'agglomération d'Innsbruck (Autriche). Le centre ville présente la pollution la plus élevée ainsi que la proximité des voies principales de circulation automobile. Les vents dominants venant du sud expliquent le niveau de pollution supérieur des quartiers nord. Il y a décroissance progressive des concentrations en cadmium et zinc du centre vers la périphérie.

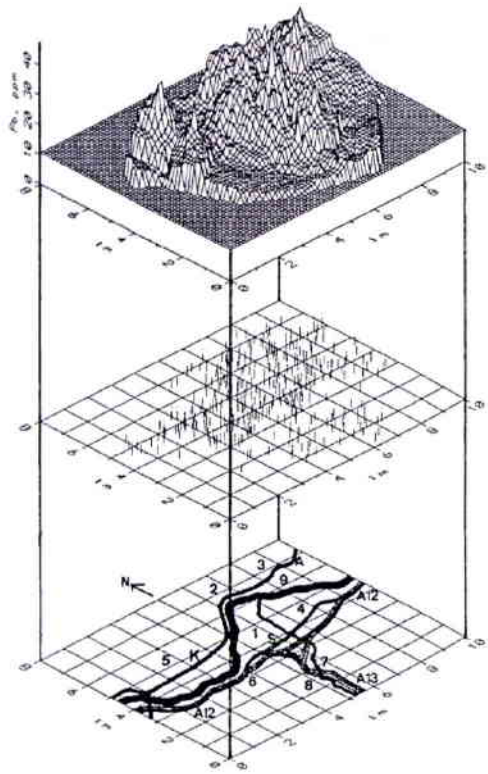


Figure 1 (d'après Dallinger *et al.*, 1989) : Utilisation des isotopes en bioindication.

- **Diagramme supérieur : représentation tridimensionnelle des concentrations en plomb d'isopodes prélevés dans l'agglomération d'Innsbruck (Autriche) ;**
- **Diagramme intermédiaire : points de prélèvement dans l'aire étudiée ;**
- **Diagramme inférieur : cartographie simplifiée de l'agglomération**
  - **Différents quartiers n°1 à 9 depuis le centre ville (1) à la zone industrielle (9) ;**
  - **A, K et S : routes principales de la ville dont A12 ET A13 autoroutes ;**
  - **Autres figurés : Rivières Inn et Sill.**

Il est donc nécessaire d'obtenir des informations sur l'action des polluants vis-à-vis d'un nombre important d'espèces clés de la biocénose (NRC-CNRC, 1995) afin de disposer d'une échelle de sensibilité qui permettrait d'évaluer plus précisément l'intensité ainsi que la diversité des effets toxiques des polluants.

C'est au regard de ces objectifs que l'utilisation d'escargots terrestres en tant que bioindicateurs de la contamination métallique des sols a été proposée.

Les gastéropodes terrestres représentent un chaînon important des chaînes alimentaires des écosystèmes terrestres, contribuant aux cycles des minéraux et des nutriments (Thompson *et al.*, 1993).

En milieu terrestre, les escargots présentent des relations très étroites avec plusieurs éléments de leur biotope (figure 2a).

1) Les contacts avec le sol sont importants, même si l'escargot se déplace sur une couche de mucus sécrétée par l'épithélium ventral de la sole pédieuse ;
2) Lors de certains comportements, le contact est amplifié, par exemple lorsque l'animal creuse le sol pour pondre, pour hiberner ou pour rechercher une certaine humidité lors des heures chaudes de la journée ;
3) Lors de l'éclosion et des premiers stades du développement, le contact avec le sol et sa couche superficielle est important ;

4) Il y a une prise alimentaire de particules du sol et des poussières lorsque l'animal s'alimente de débris végétaux à même le sol ou de végétaux enracinés ayant, d'une part, absorbés certains métaux du sol et d'autre part, jouant le rôle de piège à poussières lors des dépôts secs (régime saprophage et phytophage) ;
5) Il y a absorption d'eau météorique, directement sur les végétaux ou d'eau ayant ruisselée ou percolée dans les sols ;
6) Il y a, par la respiration pulmonée, une possible pénétration d'air vicié ou d'aérosols pouvant apporter une contamination métallique au contact de l'épithélium pulmonaire avec une possibilité de contaminer le sang.

Les voies de contamination sont donc multiples par voie transcutanée, voie alimentaire et voie respiratoire.

L'intérêt majeur de l'escargot est d'ordre physiologique par ses capacités à bioaccumuler, à des degrés variés, les métaux présents dans son environnement.

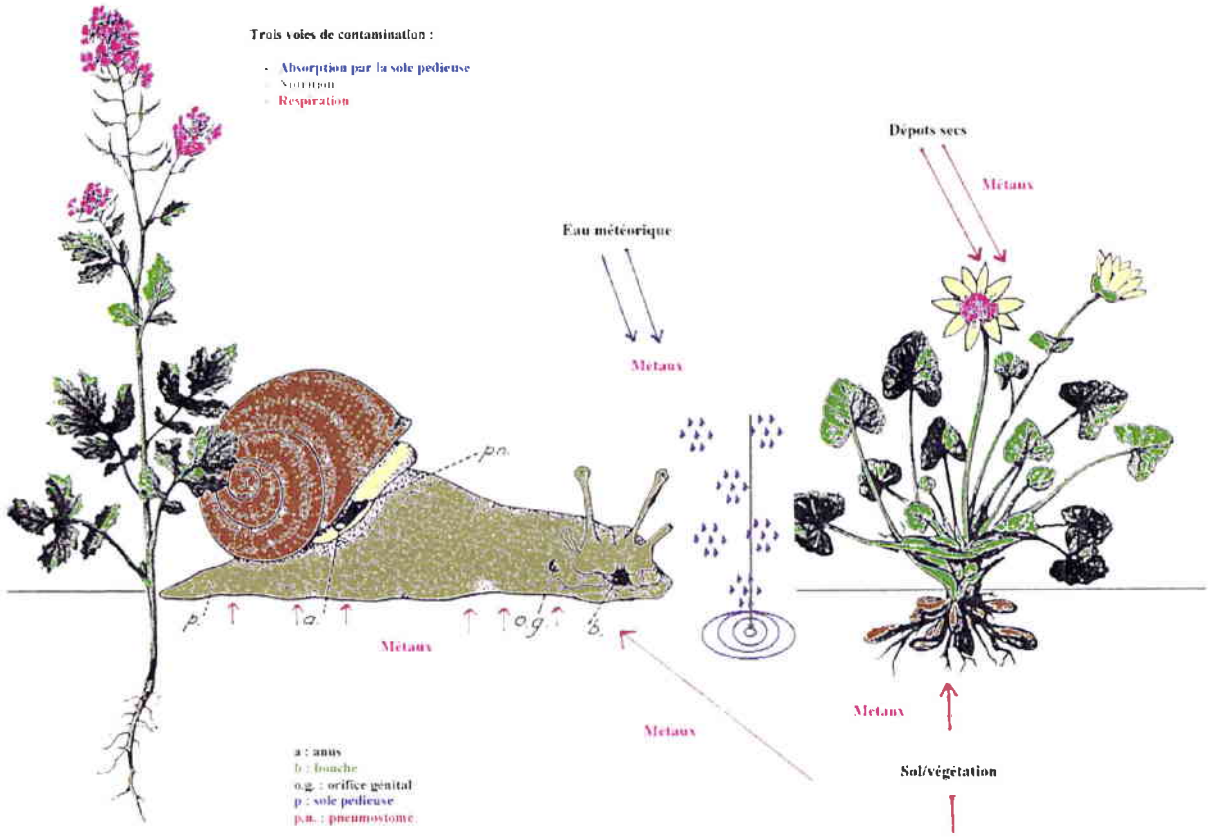


Figure 2a : Voies de contamination par les métaux chez un gastéropode pulmoné terrestre

I.3. Capacité de bioaccumulation des gastéropodes aquatiques et terrestres vis-à-vis des métaux. Comparaison avec les mollusques bivalves et d'autres invertébrés

I.3.1. Bioconcentration des métaux par les mollusques marins

Les études en milieu marin non pollué montrent (tableau 1) que les mollusques bivalves ou gastéropodes peuvent concentrer les métaux du milieu avec un facteur de 10^2 à 10^5. Le manganèse, le fer, le cobalt et le cuivre sont des éléments essentiels, le chrome et le nickel peuvent avoir une fonction nécessaire mais l'argent, l'aluminium, le cadmium et le plomb sont des polluants (Taylor *in* Cajaraville 1995). Cette distinction dans le rôle physiologique des métaux sera détaillée ultérieurement.

Tableau 1 (modifié de Taylor *in* Cajaraville, 1995) : Concentrations (mg/kg de poids sec) des métaux dans les tissus mous de quelques mollusques marins en relation avec la composition (µg/kg) de l'eau de mer (données de Bryan, 1976 et de Segar *et al.*, 1971)

Métaux	Eau de mer	Bivalve (nourriture filtrée) *Mytilus edulis*	FB	Gastéropode (herbivore) *Littorina litorrea*	FB
Ag	0,1	0,03	3.10^2	2,5	$2,5.10^4$
Al	5	76	$1,52.10^4$	286	$5,7.10^4$
Cd	0,05	5,1	$10,2.10^4$	2	4.10^4
Co	0,02	1,6	8.10^4	1,6	8.10^4
Cr	0,6	1,5	$2,5.10^3$	2,5	4.10^3
Cu	3	9,6	$3,2.10^3$	70	$2,3.10^4$
Fe	3	1700	$5,6.10^5$	435	$1,45.10^5$
Mn	2	3,5	$1,7.10^3$	26	$1,3.10^4$
Ni	2	3,7	$1,8.10^3$	3,2	$1,6.10^3$
Pb	0,03	9,1	3.10^5	9	3.10^5
Zn	5	91	$1,8.10^4$	99	$1,98.10^4$
Poids sec		***11,1%***		***25,6%***	

Cette capacité de bioaccumulation peut permettre la surveillance de l'environnement vis-à-vis de contaminations accidentelles. C'est ainsi qu'en comparant les teneurs en Cu, Ni, Zn et Pb des gastéropodes (*Lunella coronatus* et des lamellibranches (*Pinctada radiata*) prélevés en 1990 et 1994, Bu-Olayan et Sabrahmanyam (1997) ont mis en évidence l'impact de la guerre du Golf sur la qualité des eaux de la côte du Koweit avec une augmentation significative des concentrations totales en Cu, Ni et Zn due aux déversements de pétroles.

Les facteurs de bioaccumulation sont donc importants en milieu aquatique marin. Ceci se vérifie en milieu aquatique dulçaquicole chez les gastéropodes d'eau douce.

I.3.2. Bioconcentration des métaux par les gastéropodes dulçaquicoles

Le tableau 2 rassemble les concentrations en Cd, Zn, Pb et Cu de trois genres de gastéropodes aquatiques (Timmermans, 1993).

Tableau 2 : Concentrations (mg/kg de poids sec) en cadmium, zinc, plomb et cuivre chez les gastéropodes aquatiques d'après Timmermans (1993) ; NA : non analysé

Milieux	Espèces	Cadmium	Zinc	Plomb	Cuivre
Rivière Brett et Chelmer non polluées (UK)	*Lymnaea sp.*	0,095-0,262	NA	0,758–1,921	NA
Fox River (US)	*Physa sp.*	2,44	49,06	19,05	22,77
Point source	*Physa sp.*	5,66	174,30	34,81	17,79
Rivières Dommel et	*Lymnaea ovata*	0,32	78	0,68	14
Hollande (site pollué)	*Physa fontinalis*	0,51-3,15	70–89	1,99–9,60	79 – 108
Maarsseveen (Hollande) :	*Potamopyrgus jenkensi*	0,68-0,80	75–86	4,72–5,16	96–107
- Lac I (non pollué	*Potamopyrgus jenkensi*	0,90	87–101	10,7–11,7	108–111
- Lac II (non pollué)	*Lymnaea ovata*	0,10	78	0,79	24

Le zinc et le cuivre sont des métaux essentiels considérés comme régulés. Leurs concentrations varient dans de faibles mesures et en présence de concentrations élevées dans le milieu, leurs concentrations augmentent dans les organismes.

Le plomb et le cadmium sont des métaux non essentiels. Dans des conditions normales, leurs concentrations sont faibles mais lors d'exposition à des concentrations élevées, ils sont nettement accumulés par les organismes.

Selon ces données, il est possible de proposer des valeurs seuils de concentrations des milieux non pollués et les concentrations atteintes dans les milieux prospectés(en mg/kg de poids sec) (tableau 3).

Tableau 3 : Proposition de valeurs de concentrations en Cd, Zn, Pb et Cu de gastéropodes aquatiques des milieux non pollués et des milieux pollués (en mg/kg de poids sec) ; *_Potamopyrgus jenkensi_, accumulant plus que _Lymnaea_ et _Physa_, n'est pas pris en compte.

Milieux	Cadmium	Zinc*	Plomb	Cuivre
Non pollués	0,01-0,2	75-86	0,7-1,9	24
Pollués	0,3-5,66	78-174	2-34,8	14-108

Selon les auteurs, la capacité des gastéropodes et des crustacés à synthétiser et stocker l'hémocyanine dans la glande digestive entraîne, chez ces organismes, la présence d'une concentration élevée en cuivre, concentration indépendante des concentrations dans l'environnement. Par ailleurs, il est constaté que les organismes de petite taille accumulent plus que les organismes de grande taille. Les explications sont très variées :

- Surface proportionnellement supérieure chez les petits organismes d'où absorption supérieure ;
- Métabolisme plus lent chez les organismes de taille supérieure ;
- Prise de petites particules plus riches en métaux par les petits organismes.

En milieu aquatique, on estime que les ions métalliques libres sont les formes les plus biodisponibles avec un transport par diffusion facilitée. La prise de métaux traces par la nourriture a été très rarement étudiée au sein des chaînes alimentaires d'eau douce. Selon les métaux, la part respective de chaque voie transcutanée et digestive est variable, par exemple le zinc est accumulé par voie transcutanée mais le cadmium par voie digestive.

Une étude chez le gastéropode prosobranche *Melanopsis praemorsa* (Mazlani *et al.*, 1994) concerne la bioaccumulation, en milieu aquatique, du zinc, du cuivre et du cadmium en fonction de la contamination du système d'irrigation distribuant les eaux usées de la ville de Marrakech. Les concentrations varient selon la contamination du site mais aussi selon la saison. Le tableau 4 donne, par comparaison, les concentrations minimales et maximales obtenues chez cinq espèces de gastéropodes d'eau douce. Le manque de données sur la concentration en métaux dans l'eau ne permet pas d'établir les facteurs de bioaccumulation.

Tableau 4 : Concentrations maximales et minimales chez cinq espèces de gastéropodes dulçaquicoles (en mg/kg de poids sec)

Espèces	Zinc mg/kg PS	Cuivre mg/kg PS	Cadmium µg/kg PS	Référence
***Melanopsis praemorsa* (Prosobranche)**	172-840	23-343	1.400-20.000	Mazlani *et al.* (1994)
***Melanopsis marocana* (Prosobranche)**	122-161	23-25	1.900-4.700	Rada (1985)
***Radix peregra* (pulmoné)**	131-167	116-161	94-170	Forstner *et al.* (1981)
***Physa sp.* (Pulmoné)**	29-93	10-58	165	Cosson (1987)
***Lymnaea stagnalis* (Pulmoné)**		7	8.600	Pip (1992)

La bioaccumulation des métaux, par rapport à l'eau, chez les gastéropodes aquatiques, est supérieure à celle des gastéropodes terrestres. Vinot *et al.* (2000) ont montré que dans une retenue artificielle contaminée par le cuivre avec 20 µg/l dans l'eau et 455 mg/kg de poids sec dans les sédiments, le gastéropode pulmoné *Lymnaea ovata* présente une concentration en cuivre de 244 mg/kg de poids sec, le prosobranche *Viviparus viviparus* 242 mg/kg de poids sec et le prosobranche *Bithynia tentaculata* 604 mg/kg de poids sec soit les concentrations les plus élevées rencontrées dans les organismes de l'écosystème étudié (algues, plancton, crustacés, mollusques, poissons).

Les facteurs de bioaccumulation du cuivre par rapport à l'eau sont respectivement de x12.200 pour *Lymnaea ovata*, de x12.100 pour *Viviparus viviparus* et de x 30.200 pour *Bithynia tentaculata*. Tous ces facteurs relèvent d'une capacité de macroconcentreurs. Par contre, les facteurs de bioaccumulation par rapport aux sédiments sont de x0,53 pour *Lymnaea ovata* et pour *Viviparus viviparus*. Seul *Bithynia tentaculata* présente un facteur de bioaccumulation de 1,32 avec des capacités de microconcentreur ($1 < FB < 2$). Les régimes alimentaires différents peuvent expliquer cette diversité dans la réponse plutôt que l'appartenance à des familles différentes puisque *Viviparus viviparus* et *Bithynia tentaculata* sont des prosobranches.

Selon Rainbow et Dallinger (1993), la prise de métaux, leur régulation et leur excrétion, chez les invertébrés dulçaquicoles, font appel à des mécanismes différents de ceux des invertébrés marins. Compte tenu de la balance osmotique entre l'invertébré et l'eau, les mécanismes de prise par des pompes ioniques doivent être prépondérants, bien que selon le mode de prise de nourriture, des métaux puissent emprunter la voie digestive avec l'absorption de particules.

Les invertébrés, dont les gastéropodes aquatiques qui nécessitent une importante demande en calcium, présentent une corrélation entre la prise de calcium et, par exemple, le cadmium. C'est le cas chez *Littorina littorea* (Bjerregaard et Depledge *in* Rainbow et Dallinger, 1993).

Par contre, chez le gastéropode d'eau douce *Lymnaea palustris*, il y a une prédominance de prise de radiocobalt (^{60}Co) par la voie digestive sur la prise directe à partir de l'eau.

Après la phase de prise de métal, il existe ou non une capacité de régulation. Le gastéropode *Physa integra* présente, par exemple, une accumulation du cadmium et du plomb, métaux non essentiels ; dans cet exemple, les concentrations en métaux, dans le gastéropode, sont corrélées à celles en métaux dissous dans l'eau.

Adewunmi *et al.* (1996) propose d'utiliser les concentrations en métaux des gastéropodes aquatiques (*Biomphalaria pfeifferi*, *Bulinus globosus*, *Lanistes libicus*, *Lymnaea natalensis*, *Potadoma moerchi*, *Melanoides tuberculata*, *Gabiella africana*, *Pila ovum* et *Bellamya*) pour des études de biosurveillance dont l'objectif est d'évaluer la charge en métaux des barrages artificiels et des rivières en région tropicale (Nigéria). Les concentrations les plus élevées détectées ont été de 2.352 µg/g pour Cu, 52,1 µg/g pour Pb et 31,6 µg/g pour Cd.

Des études complémentaires, utilisant des radio-isotopes, sont nécessaires pour établir un bilan complet entrée, accumulation et excrétion des métaux.

I.3.3. Bioconcentration des métaux par les gastéropodes terrestres

En ce qui concerne les gastéropodes terrestres, Dallinger (1993) classe les différentes espèces en fonction de la capacité à concentrer le contaminant qui se trouve dans l'environnement. Cette classification a été proposée par Bohac et Pospisil en 1989. Le facteur de bioaccumulation est obtenu par le rapport de la concentration du contaminant dans l'organisme sur la concentration du contaminant dans l'environnement.

- Si FB > 2 : l'organisme est désigné macroconcentreur,
- Si 1 < FB ≤ 2 : l'organisme est désigné microconcentreur,
- Si FB ≤ 1 : l'organisme est désigné déconcentreur.

Le tableau 5 indique que les gastéropodes terrestres, *Helix pomatia*, *Helix aspersa*, *Cepaea nemoralis* et *Arianta arbustorum* sont des macroconcentreurs de cadmium. C'est aussi le cas de *Helix pomatia*, *Helix aspersa* et *Arianta arbustorum* pour le cuivre et de *Helix pomatia* et *Arianta arbustorum* pour le zinc. Ils sont microconcentreurs pour le plomb (*Helix pomatia* et *Arianta arbustorum*) et pour le zinc (*Helix aspersa*).

Par rapport à d'autres invertébrés terrestres, oligochètes, crustacés, insectes, myriapodes, les facteurs de bioaccumulation sont au moins égaux et souvent plus élevés pour le cuivre, le zinc et le cadmium, mais sont sans commune mesure avec ceux rencontrés en milieu aquatique puisque, au mieux, l'ordre de grandeur ne dépasse pas les dizaines contre 10^2 à 10^5 en milieu aquatique.

Tableau 5 : Facteurs de bioconcentration chez les invertébrés. Quelques exemples de macro, micro et déconcentreurs d'après Dallinger (1993)

	FB >2 MACROCONCENTREURS		1 < FB < 2 MICROCONCENTREURS		FB < 1 DECONCENTREURS	
Espèces	**Métal**	**FB**	**Métal**	**FB**	**Métal**	**FB**
Helix pomatia (Gastéropode pulmoné)	Cd Zn Cu	6-10 1-9 10	Pb	1,3		
Helix aspersa (Gastéropode pulmoné)	Cu Cd	1,5-10 3-8	Zn	0,3-2		
Cepaea nemoralis (Gastéropode pulmoné)	Cd	18-33				
Arianta arbustorum (Gastéropode pulmoné)	Cd Zn Cu	20 7,3 17,2	Pb	1,6		
Lombricus rubellus (Oligochète)	Cd Pb Zn	5 0,01-4 0,15-2,8	Pb	1,3	Cu	0,01-06
Allobophora calliginosa (Oligochète)	Cd	12				
Porcellio scaber (Crustacé isopode)	Cd Zn Cu	6 7 12-14			Pb	0,43
Oniscus asellus (Crustacé isopode)	Cd Cu	7 3			Pb Zn	0,23 0,2
Formica sanguinea (Insecte hyménoptère)	Cd	3				
Orchesella cincta (Insecte collembole)					Cd	< 1
Lithobius forficulatus (Myriapode chilopode)					Cd	0,5

Chez les invertébrés terrestres, il est admis que la prise des métaux traces, s'effectuant essentiellement par la nourriture, l'animal ne peut contrôler le flux entrant sauf par évitement s'il y répulsion. Dans ce cas, c'est la capacité d'élimination qui est le facteur décisif dans la régulation de la concentration en ces éléments.

Comme la perte d'eau, liée à une excrétion intense, ne correspond pas à l'économie d'eau nécessaire pour un invertébré terrestre, les produits d'excrétion sont des produits solides : acide urique et purines. Les gastéropodes terrestres ont développé, en plus de la formation d'urée et d'acide urique, la capacité de stocker les produits d'excrétion pendant les périodes de déshydratation avec une excrétion rapide lors de la réhydratation. Les gastéropodes, comme d'autres invertébrés (nématodes, oligochètes, crustacés, arachnides, myriapodes, insectes), pratiquent la compartimentation des métaux traces dans des vésicules avec inactivation et détoxication. Ces vésicules peuvent être évacuées soit dans la lumière intestinale, avec les fécès, soit dans l'urine et sans perte importante d'eau. Les métaux traces sont chimiquement inactivés par liaisons avec les protéines soufrées (métallothionéines) et sont stockés dans des compartiments cellulaires. Certains invertébrés, déconcentreurs, ont la capacité d'excréter rapidement les métaux traces (insectes coléoptères carabides).

Dans la bioindication, il convient que la concentration en métal de l'ensemble du corps soit le reflet de la concentration en ce métal dans l'environnement. En fait, chez les invertébrés, seuls quelques organes bioaccumulent les métaux traces alors que le reste du corps n'est pas concerné par la bioaccumulation.

Par exemple, chez *Helix pomatia*, c'est la glande digestive qui stocke le cadmium, le plomb et le zinc (Dallinger et Wieser, 1984a) et c'est probablement une réponse adaptative à la vie terrestre. Il y a séquestration dans les granules de phosphate de calcium des cellules à calcium (granule de type C selon Hopkin, 1989). Selon certains auteurs, ces granules font partie du système lysosomal de la cellule. D'autres processus existent tels que la complexation de certains métaux (cadmium, cuivre et zinc) par des métallothionéines du cytosol des cellules digestives. Dans le cas des escargots et particulièrement de *Helix pomatia*, il n'y a pas accumulation de ces métallothionéines dans le système lysosomal (Dallinger, 1993). Par ailleurs, les métallothionéines lient principalement du cadmium et peu de zinc. L'hypothèse est que chez les gastéropodes, les métallothionéines n'agissent plus dans la régulation des métaux essentiels mais sont mobilisés vers une plus grande efficacité dans la détoxication d'éléments non essentiels tels que le cadmium.

I.4. Cinétique de contamination et de décontamination des métaux

I.4.1. Facteurs intervenant dans la biodisponibilité des métaux

La bioaccumulation des métaux *in situ* dépend de leur biodisponibilité, elle-même sous l'influence de nombreux facteurs. La figure 2b, établie par Gomot (*in* Texier *et al.*, 1996), illustre les trois phases de cette biodisponibilité et les multiples sujets possibles d'études.

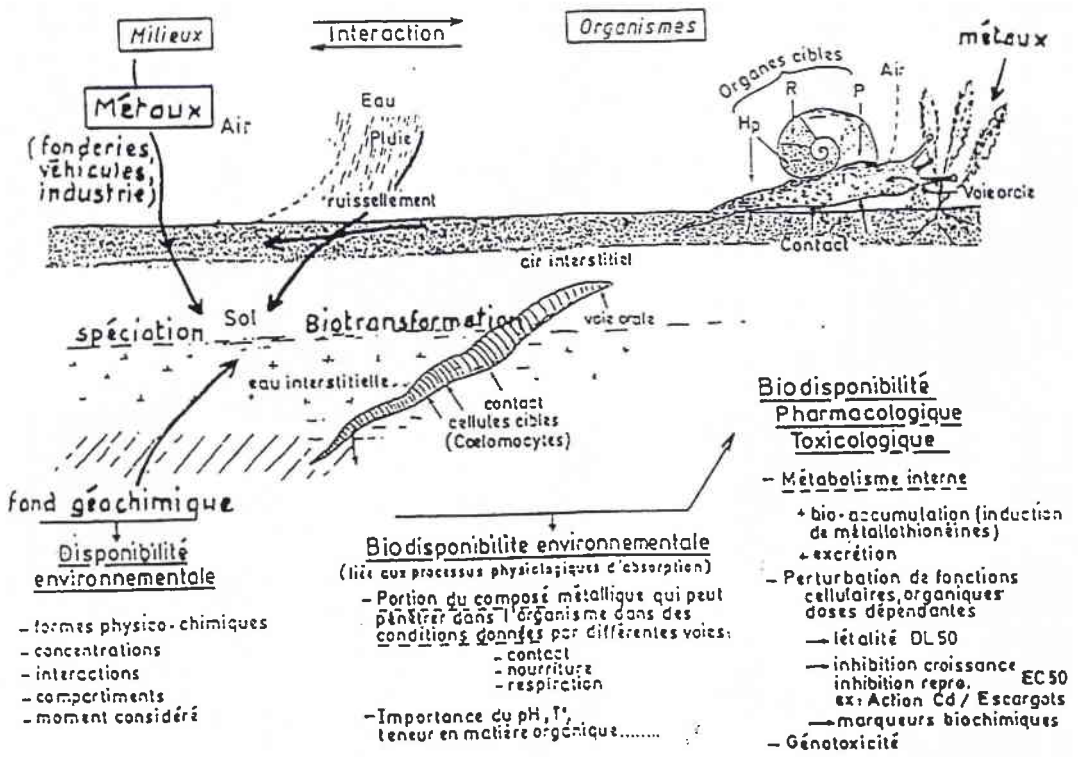


Figure 2b : Illustration des trois phases de la biodisponibilité des métaux en milieu terrestre adapté d'après les concepts proposés en milieu aquatique par Hamelink *et al.* (1994) modifié par Gomot (*in* Texier *et al.*, 1996)

Dans le présent travail qui se situe dans la phase préparatoire et explicative de la proposition de tests normalisés de croissance et de bioaccumulation chez l'escargot, ma contribution concerne, plus spécialement, les métaux sous forme particulaire, avec prise en compte des voies de pénétration dans l'organisme, puis des processus intervenant dans leur bioaccumulation et leur élimination.

Les trois dispositifs classiques dans les études écotoxicologiques, utilisant des animaux sentinelles, ont été mis en jeu :

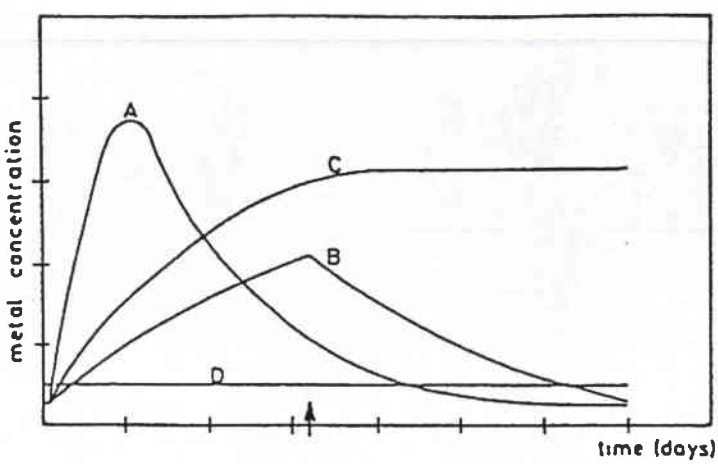
- La récolte d'animaux *in situ* vivant dans des conditions naturelles d'exposition ;
- Le transfert, en microcosmes, d'animaux obtenus en élevage contrôlé ou provenant de sites de référence ;
- L'exposition, en laboratoire, d'animaux obtenus en élevage contrôlé à des contaminations métalliques simples ou multiples, les métaux étant fournis principalement sous la forme particulaire.

I.4.2. Cinétiques d'accumulation et organotropisme des métaux chez l'escargot

L'expérience apportant le plus de données est celle réalisée par Dallinger et Wieser en 1984a, chez *Helix pomatia*, en fournissant une nourriture contaminée (laitue) par des solutions de zinc, de cuivre, de cadmium et de plomb pendant 32 jours, puis une nourriture non contaminée pendant 40 à 50 jours. Les analyses concernent le tube digestif antérieur (pharynx + œsophage + estomac), le tube digestif postérieur (différentes portions de l'intestin), la glande digestive, la glande salivaire, le manteau, le rein, le pied, la glande de l'albumen et l'appareil reproducteur, l'hémolymphe et enfin, les fécès.

Les faits les plus marquants concernent :

- Une importante et rapide réponse d'élimination des métaux dans les fécès avec pour conséquence, la limitation de l'absorption par le tractus digestif ou une excrétion plus rapide puisque les produits du rein sont mélangés aux fécès lors de leur élimination ;
- Il y a quatre types de réponses (A à D figure 3) :



Flèche : Arrêt de la fourniture de l'aliment contaminé (D'après Dallinger et Wieser, 1984a).
Courbe A : Réponse rapide en aigu (estomac avec zinc, hémolymphe avec cadmium et plomb).
Courbe B : Accumulation permanente pendant la phase expérimentale puis détoxication (ex. manteau, pied, glande digestive avec cuivre, hémolymphe avec zinc).
Courbe C : Accumulation à long terme (50 jours) (glande digestive et manteau avec zinc).
Ligne D : Aucun changement dans la concentration en métal (glande salivaire et cadmium).

Figure 3 : Différentes cinétiques d'accumulation dans les principaux organes de *Helix pomatia* nourris avec un aliment additionné de métaux lourds d'après Dallinger et Wieser (1984a)

- Réponse A : organes présentant une augmentation rapide de la concentration en métal puis décroissance avant même que commence la phase de décontamination. C'est le cas du zinc dans l'estomac, les glandes salivaires et le rein, ou du cadmium et du plomb dans l'hémolymphe. Il s'agit de processus de compartimentation avec, pour certains métaux, intervention de métalloprotéines (cf. chapitre III.1.2.2.3.2) ou d'autres molécules se liant aux métaux,
- Réponse B : organes présentant une augmentation continue de la contamination en métaux pendant toute la période d'exposition, puis décroissance après arrêt de la contamination. C'est le cas du cuivre dans le manteau, la glande digestive, le pied ou du zinc dans l'hémolymphe,
- Réponse C : organes présentant une accumulation à long terme du métal qui persiste après arrêt de la contamination (au moins 50 jours). C'est le cas du zinc dans la glande digestive et le manteau, du cadmium dans la glande digestive, du plomb dans la glande digestive, l'estomac, la glande salivaire, la glande de l'albumen et le manteau. Il s'agit d'un organotropisme avec bioaccumulation expliquant la capacité bioindicatrice de nombreuses espèces d'invertébrés. La bioaccumulation met en jeu soit des métalloprotéines (métallothionéines) ou la compartimentation des métaux dans des structures cellulaires spécifiques, variables selon le métal considéré. La glande digestive est prépondérante vis-à-vis du cadmium, du zinc et du plomb. Il faut également retenir l'existence de transfert d'un compartiment cellulaire à un autre,
- Réponse D : il n'y a pas de modification significative des concentrations en métal lors d'exposition en chronicité. C'est le cas du cuivre dans l'hémolymphe, la glande de l'albumen et les tissus reproducteurs ou du cadmium dans la glande salivaire, le manteau, le pied ou encore du plomb dans le rein, le pied et les tissus reproducteurs. Les auteurs ne peuvent cependant conclure sur la possibilité ou non d'une bioaccumulation après une plus longue période d'exposition limitée dans l'expérience à 32 jours.

Selon les auteurs, cette classification est trop rigoureuse car il y a, expérimentalement, des exemples de variante de réponse intermédiaire entre A et C, c'est le cas du zinc dans le manteau.

- Il existe de plus une certaine rythmicité dans les phénomènes d'accumulation et d'excrétion. C'est le cas du cuivre en liaison avec un rythme naturel de digestion et de résorption.

I.5. Capacités de bioaccumulation des gastéropodes en fonction des différents métaux et de leur organotropisme

Les expériences, en laboratoire, de Dallinger et Wieser (1984) montrent l'importance de considérer le métabolisme lié à chaque métal. Par ailleurs, *in situ*, les escargots sont en présence d'un mélange variable de divers métaux qui peuvent induire chez l'animal soit des effets simplement additifs, soit des synergies, soit, enfin, des antagonismes. Ces derniers aspects sont encore peu étudiés chez les gastéropodes mais ne doivent pas être oubliés.

Les différents métaux seront donc étudiés séparément dans l'ordre suivant : fer, zinc, cuivre, plomb, cadmium, manganèse, chrome et nickel puis regroupés en fonction des connaissances acquises en ce qui concerne les interactions, par exemple le zinc-cadmium.

I.5.1. Le fer

Le fer est considéré comme un oligo-élément (Kabata-Pendias *et al.*, 1995). Meinke *et al.* (1974) rapportent que le fer est accumulé dans la glande à albumen. Selon Brooks *et al.* (1992) chez *Helix aspersa*, le fer est accumulé majoritairement dans la glande digestive ce qui montre l'importance de cet organe dans la compartimentation de ce métal. Il est présent dans la glande digestive sous forme de granules ; de fait le fer est lié à une protéine, la ferritine, qui se trouve aussi dans le foie et le rein des rats et des hommes. Toujours selon Brooks *et al.* (1992), le fer suit la même voie d'accumulation que l'aluminium.

I.5.2. Le zinc, macroconcentration et microconcentration

Le zinc est un oligo-élément essentiel impliqué dans la formation et la fonction de nombreuses enzymes (Kabata-Pendias *et al.*, 1995). Meinke et Schaller (1974) rapportent que, chez l'escargot, le zinc est accumulé dans l'hémolymphe et dans le pied. Le zinc voit sa concentration augmenter de façon linéaire en fonction du poids des individus chez *Helix aspersa* (Coughtrey et Martin, 1977). L'effet toxique du zinc a été testé sur un certain nombre de mollusques terrestres et notamment sur la limace ; Marigomez *et al.* (1986c) rapportent que *Arion ater*, en laboratoire, tolère de fortes concentrations en zinc dans la nourriture ce qui tend à prouver que ce métal dans des conditions naturelles n'a pas d'effet sur la mortalité des individus. Par ailleurs, Popham et d'Auria (1980) montrent que lorsque la limace présente une faible concentration en calcium, la capacité à accumuler le zinc est diminuée. Chez *Helix pomatia*, Dallinger et Wieser (1984) mettent en évidence le passage du zinc par l'intestin antérieur et postérieur, un transport qui augmente avec le temps, par l'hémolymphe, une bioaccumulation à long terme dans la glande digestive (70% du métal bioaccumulé) et le manteau. Selon Brooks *et al.* (1992), chez *Helix aspersa*, le zinc est également accumulé dans la glande digestive ce qui montre l'importance de cet organe dans la détoxication de ce métal.

A titre de comparaison, le rôle joué par la glande digestive, chez les gastéropodes, l'est par le rein chez le lamellibranche *Mytilus edulis* (George et Pirie, 1980).

Berger *et al.* (1993a) ont pu établir le bilan du flux de zinc à travers les organes de *Helix pomatia*. Le rôle majeur joué par la glande digestive dans la bioaccumulation est nettement démontré (environ 50% du zinc corporel) puis dans l'ordre de décroissance, le pied et le manteau, puis le reste du corps moins l'intestin et enfin l'intestin.

Dallinger *et al.* (1993) citent des concentrations en zinc pouvant atteindre 2.000 µg/g de poids sec chez des escargots et des limaces de sites contaminés.

Selon Dallinger (1993), chez *Helix pomatia*, une fraction du zinc est liée à une protéine non métallothionéine de la glande digestive, d'un poids moléculaire de 1.000 à 4.000 Da dont la nature exacte n'est pas encore élucidée. Une autre fraction est associée à une fraction contenant les granules de lipofuscines des cellules digestives et les concrétions de pyrophosphates de calcium des cellules à calcium. Selon les auteurs, le zinc est incorporé dans des concrétions mais n'est pas présent dans les lipofuscines, ce qui a par ailleurs été vérifié chez *Helix aspersa*. *Helix pomatia* est un macroconcentreur, *Helix aspersa* est un microconcentreur, une proportion prépondérante de zinc étant séquestrée dans les granules de pyrophosphate de calcium des cellules basophiles de la glande digestive.

Gomot (1994) a montré que le zinc est le métal majeur des viscères chez plusieurs espèces d'escargots comestibles (*Helix pomatia*, *Helix aspersa aspersa*, *Helix aspersa maxima* et *Helix lucorum*) avec des variations interspécifiques. Certains aliments sont diversement complémentés en zinc, sulfate de zinc, carbonate de zinc et chlorure de zinc, ce qui peut expliquer les variations dans les concentrations en zinc constatées dans les viscères. Des interactions entre les différents constituants des aliments doivent être considérées comme par exemple la teneur en calcium, Ireland et Marigomez (1992) ayant montré une corrélation entre le taux de zinc dans la glande digestive et celui de calcium dans l'aliment.

Onat et Topcnoglu (1999) ont étudié, en laboratoire, la demi-vie biologique du ^{65}Zn chez le gastéropode côtier de la Mer Noire *Ropana venosa*, celle-ci est de 66 jours dans les parties molles (75 jours pour ^{134}Cs). Le Danube apporte 6.000 tonnes par an de zinc dans la Mer Noire et un contrôle des produits de la mer, prélevés en Mer Noire, est indispensable. Le fait que les gastéropodes présentent une capacité de bioaccumulation avec une détoxication lente milite pour leur utilisation dans la biosurveillance de la contamination par les métaux et les radionucléides entre autres ceux émis lors de l'accident de Chernobyl (^{134}Cs, ^{137}Cs, ^{106}Ru et ^{110}Ag).

I.5.3. Le cuivre et la macroconcentration

Le cuivre est un oligo-élément essentiel pour les gastéropodes car il participe à la constitution de l'hémocyanine, avec une distribution dans l'ensemble de l'organisme. Chez *Helix aspersa*, le cuivre n'est pas fortement bioaccumulé dans la glande digestive et il voit sa concentration augmenter de façon linéaire en fonction du poids des individus (Coughtrey et Martin, 1976). Selon Moser et Wieser (1979) puis Dallinger et Wieser (1984a), l'accumulation du cuivre chez *Helix pomatia* commence dans l'intestin postérieur, le pied et le manteau et augmente légèrement avec le temps d'exposition. Le pied est l'organe qui contient le plus de cuivre. Il n'y a qu'une légère augmentation de la concentration en cuivre dans la glande digestive, ce qui indique que cet organe n'est pas le site majeur d'accumulation. Dans les autres organes, la concentration en cuivre varie peu (intestin antérieur, glande de l'albumen, appareil reproducteur, pied et hémolymphe). L'intestin postérieur joue un rôle important par élimination vers les fécès. Les glandes salivaires interviennent avec incorporation au produit de sécrétion. Selon Marigomez *et al.* (1986c), *Arion ater* tolère, en laboratoire, de fortes concentrations en cuivre dans la nourriture ce qui tend à prouver que ce métal dans des conditions naturelles n'a aucun effet sur la mortalité des individus. Le cuivre intervenant dans la synthèse de l'hémocyanine, il n'est pas toxique pour les mollusques et en particulier pour les escargots aux concentrations susceptibles d'être rencontrées dans le milieu naturel. De nombreuses études ont montré que le cuivre peut se déposer au sein de granules insolubles intracellulaires dans la glande digestive de la plus part des invertébrés terrestres, cependant aucun granule de cuivre (cuprosomes) n'a été trouvé chez *Helix aspersa* (Laskowski *et al.*, 1996a).

Selon Dallinger (1993), *Helix pomatia*, *Helix aspersa* et *Arianta arbustorum* sont des macroconcentreurs de cuivre. Le cuivre de la glande digestive est associé probablement à une métallothionéine de faible poids moléculaire et une autre fraction est liée à l'hémocyanine, protéine transportant l'oxygène et pouvant, en cas d'excédent de cuivre, servir de lieu de stockage. Une dernière fraction est séquestrée dans les granules de pyrophosphate de calcium des cellules basophiles. La libération du cuivre dans la lumière intestinale est cyclique en même temps que les concrétions de pyrophosphate sont évacuées. Les gastéropodes, bien que macroconcentreurs de cuivre, sont capables d'éliminer ce métal par l'intestin et la glande digestive.

Selon Gomot (1994), le cuivre est le métal majeur du pied contrairement au zinc qui est le métal majeur des viscères. C'est une constante chez plusieurs espèces (*Helix pomatia*, *Helix aspersa aspersa*, *Helix aspersa maxima* et *Helix lucorum*) avec des différences interspécifiques dans les concentrations liées à des vitesses différentes de croissance

	Cu	Fe	Zn
Pied	0,1 à 0,3 ‰	> 0,06 à 0,1 ‰	> 0,06 à 0,08 ‰
Viscères	0,04 à 0,06 ‰	< 0,3 à 0,7 ‰	< 1,4 à 2,4 ‰

La même étude met en évidence, avec certains aliments, une corrélation entre la concentration en cuivre dans les pieds et les viscères. Par ailleurs, il est possible de fournir aux animaux un aliment additionné de poudre de lait qui élimine fortement la concentration en cuivre dans l'escargot et qui permet d'obtenir, en laboratoire, des animaux de référence présentant une concentration en cuivre inférieure à celle d'animaux de zones naturelles considérées comme non ou peu contaminées. La possibilité d'obtenir, en laboratoire, des animaux de référence représente l'un des intérêts majeurs dans le choix d'un bioindicateur. L'escargot est un macroconcentreur de cuivre mais il existe des différences entre espèces ; *Helix aspersa aspersa* bioaccumule plus le cuivre que *Helix aspersa maxima* ; *Helix pomatia* présente des capacités de bioaccumulation supérieures à celles de ces deux dernières espèces. L'âge des animaux et les teneurs en calcium dans l'aliment influencent le niveau de concentration en cuivre.

Swaileh et Ezzughaygar (2000) ont étudié l'influence d'un ajout de cuivre dans l'alimentation sur la prise de nourriture et le taux de croissance chez *Helix engaddensis*. La NOEC 1 mois est de 20 µg/g ; la LOEC 1mois est de 100 µg/g. Les auteurs signalent que l'escargot détecte la présence de cuivre et refuse de se nourrir à partir d'une certaine concentration. Par ailleurs, l'effet sur la croissance est réversible. Les modifications du comportement du gastéropode marin *Babylonia lutosa* dans sa prise de nourriture ont été proposées comme outil de bioessai des effets du cuivre par Cheung et Wong (1999) à Hongkong (corps en extension, pied non fixé, impossibilité de se déplacer, corps rétracté dans la coquille).

La toxicité du cuivre (LD50) vis-à-vis de *Deroceras reticulatum* (Young et Wilkins, 1989) est estimée à 124 µg/g de poids d'animal par voie épidermique et à 287 µg/g par voie orale. Si on considère la quantité d'aliment ingéré par jour et le poids des escargots (Gomot, 1994), il faudrait que l'aliment contienne environ 14 g/kg de poids sec de cuivre soit 200 fois la concentration en cuivre préconisée en ajout dans l'aliment de type INRA. Cependant, pour des raisons de mauvais mélange, il a été constaté une mortalité dans certains élevages.

I.5.4. Le plomb et la microconcentration

La contamination par le plomb peut s'effectuer aux abords des centres industriels, des routes et autoroutes. En effet, pour améliorer la combustion dans les moteurs, du plomb tétraméthylé et tétraéthylé est ajouté à l'essence à des taux d'à peu près 0,6 g/l (Davies *et al.*, 1972). Après la combustion, les trois quarts de ce plomb se retrouvent dans l'atmosphère sous forme de particules de plomb halogéné (PbCl.Br) ou sous forme de complexes d'ammonium halogéné et de fer halogéné. Les aérosols de ces composés de plomb contaminent les sols et les plantes près des routes. Dallinger et Wieser (1984a) ont montré, chez *Helix pomatia*, le passage rapide du plomb dans l'hémolymphe puis une accumulation lente dans la glande digestive, le manteau et la glande à albumen, encore plus lente dans l'intestin postérieur et la glande salivaire.

Il n'y a pas d'accumulation significative dans le pied, le rein et l'appareil reproducteur. C'est la glande digestive qui constitue l'organe majeur et à long terme d'accumulation (90%). Tous les gastéropodes ne présentent pas cette capacité d'accumulation. Selon Williamson (1980), *Helix hortensis* excrète rapidement le plomb. Chez les mollusques aquatiques, le plomb est plus bioaccumulé dans le rein que dans la glande digestive (*Mytilus edulis*, Schulz Baldes, 1974 ; *Littorina littorea*, Mason et Simkiss, 1983). Selon Coughtrey et Martin (1976) puis Brooks *et al.* (1992) chez *Helix aspersa*, le plomb est accumulé dans la glande digestive ce qui montre l'importance de cet organe dans la détoxication de ce métal. Meinke et Schaller (1974) rapportent que le plomb est aussi accumulé dans l'hémolymphe. Marigomez *et al.* (1986c) rappellent que le plomb doit être fourni en laboratoire, à de fortes concentrations (1000 ppm), pour augmenter la mortalité des limaces *in vitro* ce qui tend à prouver que ce métal dans des conditions naturelles n'a aucun effet sur la mortalité des individus puisqu'il ne se trouve pas naturellement à de telles teneurs. Newman *et al.* (1994) indiquent que lors d'une exposition à une forte concentration en plomb, les limaces et les escargots ont une forte teneur en calcium dans leurs tissus ce qui signifie que le métabolisme du calcium subi une modification qui peut être liée à une certaine forme de tolérance envers ce métal ; le plomb est séquestré dans des granules intracellulaires ou dans la coquille par modification du métabolisme essentiel du calcium chez *Helix aspersa* Müller. Ce changement métabolique est lié à une transformation génétique des populations exposées. Selon Laskowski *et al.* (1996b), le plomb est le métal qui est le mieux régulé par l'animal. Son assimilation et son excrétion sont sous le contrôle de mécanismes physiologiques qui peuvent s'adapter en fonction des concentrations du métal dans la nourriture.

Selon Dallinger (1993), 90% du plomb assimilé par *Helix pomatia*, dans un environnement de fonderie, se trouvent dans la glande digestive dans des granules de lipofuscines des cellules digestives. Ils appartiennent au système lysosomal et sont évacués, pour une faible part, dans la lumière de la glande par destruction des cellules. L'intestin postérieur joue également un rôle dans l'élimination du plomb. En effet, il y a accumulation de plomb dans les cellules à mucus puis libération dans la lumière du tube digestif. Bien que le plomb appartienne aux métaux de transition, avec des propriétés importantes de la classe B, il y a bien liaison entre le plomb et les atomes de soufre des substances constitutives du mucus.

I.5.5. Le cadmium et la macroconcentration

Les escargots sont connus comme macroconcentreurs de cadmium même dans des environnements non contaminés avec un facteur x10 par rapport à d'autres invertébrés du sol (Knutti *et al.*, 1988).

De faibles concentrations en cadmium (10, 25 ppm) produisent un oedème au niveau de l'épithélium. Avec des teneurs de 100, 300 et 1000 ppm des cellules globuleuses apparaissent avec des nécroses locales. Les teneurs en cadmium, habituellement rencontrées dans la nature, ne causent pas de mortalité significative chez *Helix aspersa* (Russel *et al.*, 1981). Le cadmium est un métal connu pour perturber l'homéostasie du calcium chez les invertébrés marins (Gnassia-Barelli *et al.*, 1995).

Selon Dallinger et Wieser (1984a), chez *Helix pomatia*, il y a un passage rapide du cadmium dans l'hémolymphe, puis il y a une importante augmentation de sa concentration dans la glande digestive et l'intestin. C'est la glande digestive et l'intestin antérieur qui représentent les organes principaux de bioconcentration (80% du cadmium corporel). Les concentrations en cadmium du rein, du manteau, du pied et de la glande salivaire varient peu.

La bioaccumulation dans la glande digestive s'effectue par liaison avec des protéines de type métallothionéines (Williamson (1980) chez *Helix hortensis*, Dallinger et Wieser (1984b) chez *Helix pomatia*).

Selon Brooks *et al.* (1992) chez *Helix aspersa*, le cadmium est accumulé dans la glande digestive ce qui montre l'importance de cet organe dans la détoxication de ce métal.

Berger *et al.* (1993) ont pu établir expérimentalement le bilan du flux de cadmium à travers les organes de *Helix pomatia* (figure 4). Le rôle majeur joué par la glande digestive dans la bioaccumulation est nettement démontré, puis dans l'ordre de décroissance, l'intestin, le pied ainsi que le manteau et le reste du corps. L'élimination par les fécès est faible (2 µg/g de fécès) alors que chez *Arianta arbustorum*, l'élimination peut atteindre 600 µg/g de fécès (tableau 6 et figures 4 et 5).

L'ajout de cadmium à la nourriture (10 et 100 µg/g de poids sec) augmente la concentration en cadmium de l'ensemble du corps mais c'est principalement dû à l'augmentation de celle de la glande digestive.

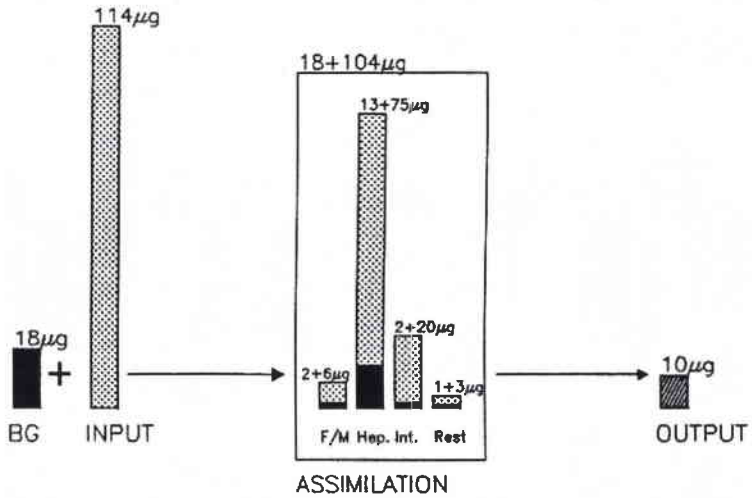


Figure 4 : Flux de cadmium au travers des organes d'un spécimen moyen de *Helix pomatia*. Les taux moyens sont symbolisés par des histogrammes au sommet desquels sont mentionnés les valeurs de cadmium en µg. Le cadmium assimilé est représenté par les teneurs du bruit de fond (BG) plus les teneurs imputables à la nourriture enrichie en cadmium. Le bruit de fond provient d'animaux de référence (d'après Berger *et al.*, 1993).

BG : Concentration de l'escargot à T_0.

INPUT : Apport par l'aliment.

ASSIMILATION :

- **F/M : Pied et manteau**
- **Hep. : Glande digestive**
- **Int. : Intestin**
- **Rest : Reste du corps**

OUTPUT : Elimination par les fécès

Tableau 6 : Répartition des différentes concentrations en cadmium chez *Helix pomatia* après 21 jours en fonction de différents ajouts en cadmium dans la nourriture (d'après Berger *et al.*, 1993)

Cadmium	Ensemble du corps après 21 jours	Glande digestive après 21 jours
Référence sans ajout	5	23
Ajout de 10 µg/g PS	12	42
Ajout de 100 µg/g de PS	30	140

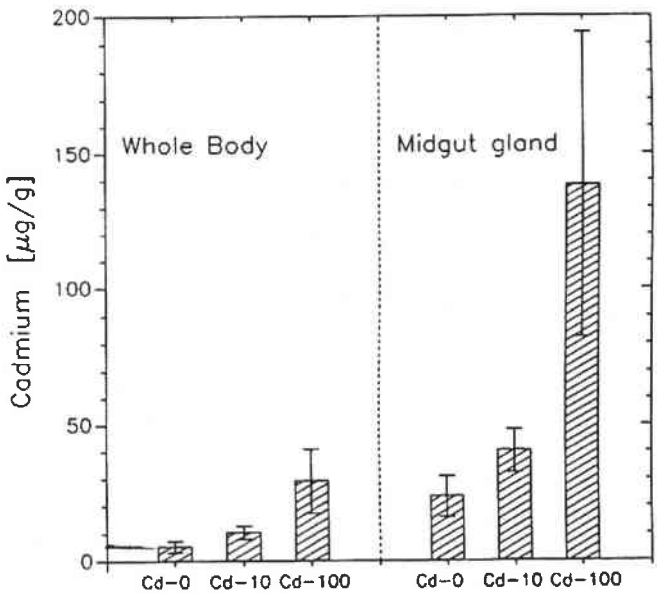


Figure 5 : Concentrations en cadmium dans l'ensemble des tissus mous du corps (à gauche) et dans la glande digestive (à droite) de *Helix pomatia* après une expérimentation de 21 jours avec une alimentation à base d'Agar enrichi par des concentrations différentes de cadmium (d'après Berger *et al.*, 1993)

Après ajout de 10 µg/g de poids sec, les concentrations corporelles sont compatibles avec celles observées chez des animaux en environnement modérément contaminé tel que les villes et les voies routières. Après ajout de 100 µg/g de poids sec, elles sont comparables avec celles observées chez des animaux en environnement de fonderies et de mines. Les concentrations corporelles en cadmium les plus élevées, observées sur certains sites, chez *Helix pomatia* sont de 100 µg/g de poids sec.

Selon Dallinger (1993), la macroconcentration du cadmium par *Helix pomatia* peut-être interprétée comme l'impossibilité par l'animal d'éliminer ce métal qui reste lié, sur de longues périodes, au métallothionéines sans qu'il y ait excrétion dans la lumière du tube digestif et élimination par les fécès.

Tableau 7 : Concentrations en Zn, Cu, Cd et Pb des aliments utilisés à partir de 0 jour, aliment contaminé jusqu'à 32 jours, en µg/g de poids sec puis décontamination jusqu'à 80 jours

Métaux	Laitue non contaminée	Laitue contaminée
Zinc	205	760
Cuivre	28	533
Cadmium	4,5	160,5
Plomb	2,1	936

Tableau 8 : Concentrations en µg/g de poids sec en zinc, cuivre et cadmium des organes de *Helix pomatia* sauf pour l'hémolymphe en µg/ml (Hémo : hémolymphe ; G. sal. : glande salivaire ; Int. Ant. : intestin antérieur : Int. post. : intestin postérieur ; G. dig. : glande digestive ; G. albu. : glande à albumen ; Ap. reprod. : appareil reproducteur)

Métal	Tps (jours)	Hémo.	G. sal.	Int. ant.	Int. post.	G. dig.	Rein	Manteau	Pied	G. albu.	Ap. reprod.	Fécès
Zn	0	3,8	674	163	153	585	115	69	99	308	92	359
	32	4,6	558	276	360	1285	53	69	99	216	117	602
	70-80	4,2	777	258	408	1274	72	112	72	378	98	1716
Cu	0	40,8	338	115	112	96	63	102	95	176	87	56
	32	58,1	322	132	236	174	79	253	150	160	110	199
	70-80	49,6	704	159	420	90	28	105	82	263	189	117
Pb	0	0,10	134	13	18	50	72	20	13	9	11	168
	32	0,07	74	38	104	1540	47	23	9	69	12	552
	70-80	0,12	248	50	125	1473	24	44	15	147	15	496
Cd	0	0,07	33	64	59	78	4	17	8	nd	nd	48
	32	0,09	17	169	92	192	7	14	5	nd	nd	74
	70-80	0,12	38	384	307	212	13	6	6	nd	nd	184

Swaileh et Ezzughaygar (2000) ont étudié l'influence d'un ajout de cadmium dans l'alimentation sur la prise de nourriture et le taux de croissance de *Helix engaddensis*. La NOEC 1mois est de 50 µg/g ; la LOEC 1mois est de 100 µg/g. Les effets du cadmium sont irréversibles ce qui démontre, par rapport au cuivre dont les effets sont réversibles, une action toxique.

Selon Pandeswara et Yallapragada (2000), le gastéropode marin intertidal *Turbo intercostalis* peut être retenu comme une espèce utile aux études de biosurveillance par ses capacités à accumuler le cadmium principalement dans le complexe glande digestive + gonade (GDG) puis, à un moindre degré, dans le manteau et le pied. Il y a, par ailleurs, un transfert progressif du cadmium contenu dans le manteau vers GDG.

Lam *et al.* (1997) ont établi un modèle à deux compartiments (pied et viscères) de prise et de relargage de cadmium par le gastéropode aquatique *Brotia hainanensis*. Le flux d'entrée du cadmium (fourni sous forme de $CdCl_2$-$2H_2O$) à la concentration de 0,8 mg/l est de 17,96µg/g/j pour les viscères et de 6,92µg/g/j pour le pied. Le taux de transfert des viscères au pied est de 0,024µg/g/j et le taux d'excrétion par le pied de 0,118 µg/g/j.

La pénétration par le pied se ferait par simple diffusion alors qu'au niveau des branchies et de l'intestin il y aurait diffusion et/ou transport par des protéines membranaires.

Selon Laskowski *et al.* (1996 a et b), la détoxication du cadmium chez les escargots s'effectue par la liaison d'ions métalliques sur des métallothionéines et sur des protéines de faibles poids moléculaires.

I.5.6. Le manganèse

Les études sur la bioaccumulation du manganèse sont encore restreintes chez les invertébrés et limitées à l'Homme se contaminant par des poussières de dioxyde de manganèse (MnO_2) lors des activités d'extractions minières. Chez l'Homme, on note une polyglobulie, une hyperthyroïdie, une hyperthermie, une baisse de la tension artérielle, un déficit de la fertilité (INRS, 1997). MnO_2 est un composé très réactif en raison de son pouvoir oxydant très puissant. Dans certaines conditions, des ions Mn^{3+}, très oxydants, peuvent être produits avec la formation d'espèces activées de l'oxygène et l'établissement d'un état de stress oxydant et/ou la possibilité de définir des marqueurs biologiques (peroxydation lipidique, superoxyde dismutase).

Des études spécifiques sont actuellement en cours sous la tutelle de l'INSERM, de l'INRS et de l'INERIS. Compte tenu de ces nouvelles orientations, il nous a semblé utile de suivre la bioaccumulation du manganèse par les gastéropodes.

I.5.7. Le chrome

Selon Cœurdassier et de Vaufleury (2000), il y a accroissement de la concentration en chrome des tissus d'escargots lorsque la teneur en chrome dans la nourriture augmente.

I.5.8. Le nickel

Le nickel n'a pas fait l'objet de recherches spécifiques chez les invertébrés bioindicateurs. Des données nouvelles concernent l'Homme avec, de même que pour le manganèse, des perturbations physiologiques chez les soudeurs. Elias *et al.* (1989) signalent des aberrations chromosomiques de lymphocytes circulants chez 55 soudeurs. Certains individus présentent une augmentation significativement plus élevée en manganèse et nickel dans le sérum et les urines sans qu'une corrélation soit formellement établie.

I.5.9. Interactions entre deux métaux : le zinc et le cadmium

Berger *et al.* (1993) ont étudié les interactions entre le zinc et le cadmium chez *Helix pomatia* en ce qui concerne le contenu en métaux, les concentrations dans les tissus et la distribution entre les organes. Les résultats essentiels sont les suivants :

- Il n'y a aucune action de teneurs élevées en zinc dans la nourriture sur l'assimilation du cadmium et réciproquement. Il n'y a ni synergie, ni antagonisme,
- Les concentrations en zinc dans les organes de *Helix pomatia* ne sont pas influencées par la présence de cadmium dans la nourriture et réciproquement,
- Une exposition au cadmium n'a pas d'effet sur la distribution corporelle du zinc et réciproquement.

Ces conclusions sont différentes de celles établies chez les vertébrés et chez les mollusques lamellibranches.

- Chez les vertébrés, le zinc accroît la production de métallothionéines et simultanément l'absorption intestinale du cadmium augmente. La toxicité du cadmium est jugulée par l'administration simultanée de zinc.
- Chez les mollusques lamellibranches (*Anodonta cygnea*), des teneurs élevées en zinc conduisent à une réduction dans l'accumulation de cadmium. Il y a compétition entre les deux métaux vis-à-vis des sites de liaison sur les métallothionéines.

Les gastéropodes possèdent des voies différentes biochimiques de séquestration intracellulaire pour le zinc et le cadmium. Dans la glande digestive de *Helix pomatia*, 86% du cadmium et seulement 21% du zinc sont retrouvés dans la fraction soluble de la glande digestive. 95% du cadmium soluble est lié à des métallothionéines contre seulement 10% pour le zinc. La grande majorité du zinc soluble est associée à différents ligands de faible poids moléculaire. Berger *et al.* (1993) suggèrent que, chez les mollusques gastéropodes, les fonctions des métallothionéines diffèrent de celles discutées dans le modèle « vertébré ».

Dallinger *et al.* (1993a) développent ce point de vue en précisant la nature des protéines mises en jeu. En ce qui concerne le cadmium, il y a intervention de deux types de protéines : l'un du groupe des métallothionéines, l'autre relevant de protéines différentes des métallothionéines. Le zinc est, lui, lié à différentes protéines de deux classes de poids moléculaire avec une dominance d'un ligand de nature inconnue et de 3.000 Da. L'autre fraction de zinc est liée à des métallothionéines mais cette fraction est très faible par rapport au cadmium (Cd/Zn = 10/1).

Cette diversité dans les ligands expliquerait, selon les auteurs, l'absence d'interaction entre le zinc et le cadmium chez *Helix pomatia* puisque cette espèce a la capacité d'orienter les deux métaux vers des structures cellulaires différentes. Du point de vue écotoxicologique, cette capacité expliquerait la capacité de résistance de *Helix pomatia* vis-à-vis d'une exposition au cadmium ou à un mélange cadmium-zinc, mélange fréquemment rencontré sur site contaminé. Cette capacité pourrait également exister et même être renforcée chez *Helix aspersa* défini comme macroconcentreur de cadmium et microconcentreur de zinc. Le problème qui reste posé est celui de savoir si cette capacité influence significativement la biodisponibilité ultérieure du cadmium et du zinc dans la chaîne alimentaire. Ce problème sera abordé avec le chapitre sur la biominéralisation.

I.5.10. Développement de la résistance aux métaux chez les populations vivant sur des sites contaminés

Le développement de la résistance aux métaux est, selon Dallinger (1993), différent chez les vertébrés et chez les invertébrés qui, dans des sites très contaminés, sont exposés à des concentrations métalliques suffisantes pour exercer une réelle pression de sélection. L'augmentation de la production de métallothionéines liant le cadmium est comme chez les oligochètes aquatiques. Le gastéropode *Helix pomatia*, mis en présence de concentrations élevées de cadmium, répond rapidement par une augmentation de la synthèse de métallothionéines. Celles-ci exercent une fonction de protection vis-à-vis de la toxicité du cadmium. De plus, cette même espèce présente les capacités supplémentaires vis-à-vis du zinc en possédant des ligands spécifiques de faible poids moléculaire.

Si, chez les vertébrés, les métallothionéines sont concernées prioritairement dans le métabolisme des éléments traces essentiels, elles représentent, chez certains invertébrés des sites contaminés et qui subissent une pression de sélection, une fonction de détoxication. Beeby et Richmond (1987) ont mis en évidence une capacité d'adaptation de *Helix aspersa aspersa* en présence de plomb.

I.6. Possibilité de développer un test basé sur la croissance pondérale des escargots

La mesure de la performance de croissance, établie sur la base de bilans énergétiques, a été reconnue comme un bioessai utile dans l'évaluation écotoxicologique (Leri et Lam, 1994).

Les résultats sur la croissance d'escargots (poids total et plus grand diamètre de la coquille) en laboratoire ont montré que celle-ci était inhibée par des doses croissantes de cadmium dans la nourriture (Gomot, 1997a et b), ce qui constitue un test biologique simple pour la mesure de la toxicité subléthale de ce métal.

Nous avons appliqué cette approche à une contamination par les métaux particulaires en retenant, en plus de la croissance pondérale, l'analyse des teneurs en métaux puis, sur cette base et pendant les deux dernières années, nous avons contribué à un test inter-laboratoire de mise au point de deux tests de laboratoire normalisés AFNOR sous la direction de A. Gomot.

Le choix du paramètre de croissance pondérale est un paramètre global qui peut, par la suite, être affiné. Par exemple, Lam (1996) propose de retenir pour le gastéropode tropical d'eau douce *Radix plicatulas* les modifications des taux de consommation et d'absorption de la nourriture en présence de cadmium.

La CL50 96h est de 2,5 mg/l, les NOEC et LOEC sont de 0,15 et 0,20 mg/l pour le taux de consommation et de 0,10 et 0,15 mg/l pour le taux d'absorption.

Chapitre II : Aspects généraux concernant les métaux

II.1. La classification des métaux

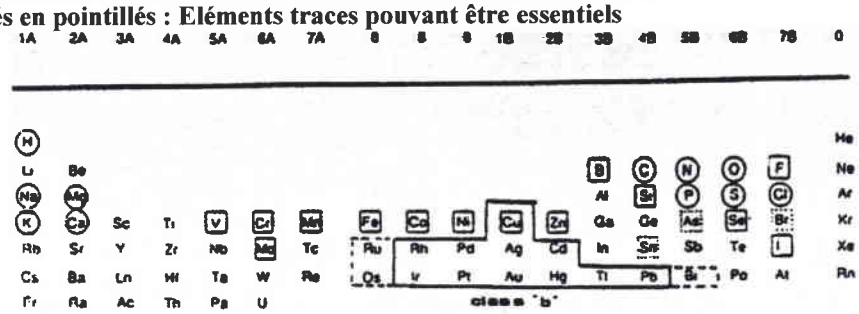
Taylor (1995) fourni dans un tableau périodique des éléments (tableau 9) ceux essentiels pour la vie à savoir les éléments de base (cercle), les éléments traces essentiels pour les plantes et les animaux (carrés en plein) et les éléments susceptibles d'être essentiels chez certaines espèces (carrés en pointillés).

Les cations majeurs Na^+, K^+, Mg^{2+}, Ca^{2+} avec les anions Cl^- et CO_3^{2-} sont impliqués dans la régulation osmotique et ionique des liquides extra et intracellulaires.

Les métaux traces Mn, Fe, Co, Cu, Zn, Mo et les éléments ultra-traces V, Cr, Sn, Ni sont impliqués dans de nombreuses enzymes ou cofacteurs d'enzymes.

Les métaux traces et ultra-traces peuvent avoir une action toxique s'ils sont présents en quantité excessive. D'autres métaux tels que l'argent, le cadmium, l'aluminium, le mercure et le plomb sont déjà toxiques à faible concentration et ne sont pas essentiels.

Tableau 9 : Tableau périodique des éléments montrant ceux nécessaires à la vie (d'après Taylor, 1995)
Cercles : Eléments biologiques majeurs
Carrés : Eléments traces considérés comme essentiels pour les plantes et les animaux
Carrés en pointillés : Eléments traces pouvant être essentiels



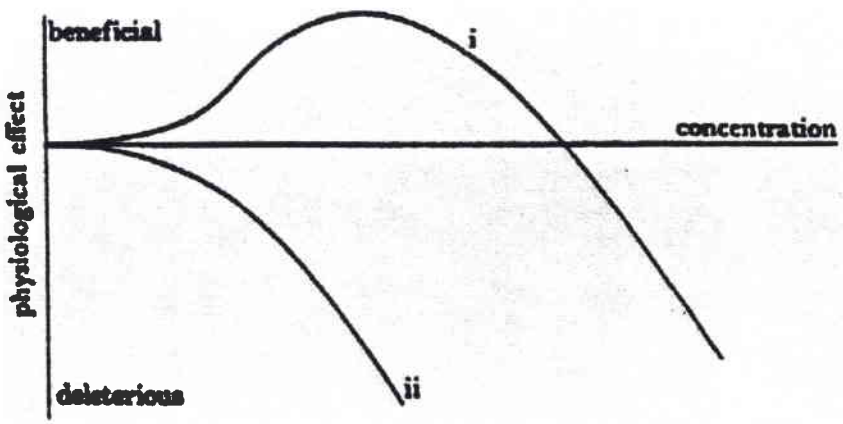


Figure 6 : Relation entre la concentration d'un élément et ses effets (d'après Taylor, 1995).
i : Elément essentiel
ii : Elément défavorable

La figure 6 donne la relation entre la concentration d'un élément et ses effets soit bénéfiques soit défavorables.

Les principes de la chimie inorganique permettent l'interprétation des données toxicologiques et des mécanismes de détoxication. Il est classique de se référer à la classification des métaux de Ahrland *et al.* (1958) avec les classes a, b et de transition. Les métaux de la classe a se trouvent préférentiellement liés aux atomes O, N et S selon la préférence : O>N>S, c'est-à-dire avec les anions carbonates, phosphates, sulfates et carboxylates. Les métaux de la classe b se trouvent sur le tableau périodique dans un triangle comportant au sommet Cu^{+} puis Rh, Ag, Cd et à la base Ir, Pt, Au, Hg, Ti et Pb. Ces métaux de la classe b se lient aux atomes S, N et O selon la préférence S>N>O. Beaucoup de métaux de la classe b sont les plus toxiques. Ils peuvent former des sulfures insolubles ou se lier aux groupements S- et N- des protéines en les dénaturant.

Les métaux de transition comprennent des métaux traces essentiels à la vie : Fe^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+} et Zn^{2+}. L'appartenance d'un métal à l'une ou l'autre de ces trois classes permet de prévoir leur voie probable de métabolisme.

La classification des métaux selon Nieboer et Richardson (1980), visualise bien les trois classes en précisant les degrés d'ionisation (tableau 10).

Tableau 10 : Classification des métaux, selon Nieboer et Richardson (1980), en classes A, B et de transition et selon un degré croissant d'ionisation

Class A Metals	Cs^{+}, K^{+}, Na^{+}, Li^{+} Ba^{2+}, Sr^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Be^{2+} La^{3+}, Gd^{3+}, Y^{3+}, Lu^{3+}, Sc^{3+}, Al^{3+}
Borderline Metals	Cd^{2+}, Sn^{2+}, Pb^{2+}, Ti^{2+}, Mn^{2+}, Fe^{2+}, V^{2+} Cu^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, Ni^{2+} Cr^{3+}, In^{3+}, Fe^{3+}, Ga^{3+} Sb(III), As(III), Sn(IV)
Class B Metals	Au^{+}, Ag^{+}, Tl^{+}, Cu^{+}, Hg^{2+}, Pd^{2+}, Pt^{2+} Bi^{3+}, Tl^{3+} Pb(IV)

II.2. Incorporation des métaux dans la cellule

Dallinger, en 1995, fait le point sur les mécanismes de l'incorporation des métaux dans la cellule et souligne les connaissances encore fragmentaires concernant la physiologie des invertébrés vis-à-vis des mécanismes de prise des éléments traces.

La distinction entre métaux lourds et non lourds n'est pas adaptée du point de vue biologique. La classification de Nieboer et Richardson (1980), décrite ci-dessus, est plus explicative des interactions avec la membrane cellulaire par l'existence de formes ioniques cationiques (classe a) ou de complexes métalliques (classe b). Les métaux de transition peuvent présenter les propriétés des classes a et b. Les conditions du milieu modifient la spéciation du métal et le degré de toxicité vis-à-vis des cellules (pH, potentiel redox, compétition ionique, température, présence de matière organique, solubilisation). Les métaux du groupe b peuvent se lier par covalence à des ligands organiques tels que les groupes alkyle et méthyle en formant des complexes organométalliques non chargés et hautement lipophiles, qui peuvent facilement traverser les membranes cellulaires particulièrement riches en lipides.

Certaines espèces de métaux et les composés organométalliques traversent la membrane cellulaire par transport passif avec simple diffusion ou diffusion facilitée et tunnel protéinique de perméases.

La diffusion simple concerne les espèces chimiques non chargées ; la diffusion facilitée concerne les espèces cationiques des métaux de la classe a. Les éléments minéraux essentiels tels Na^+, K^+, Mg^{2+} et Ca^{2+} traversent ainsi la membrane mais également Cs^+, Rb^+ et Sr^{2+}. Dans certains cas $Fe2^+$ et Zn^{2+} suivent la même voie. Certains métaux traversent par simple diffusion et par diffusion facilitée. Des métaux non essentiels toxiques peuvent pénétrer par la même voie qu'un élément essentiel, c'est le cas de Cd^{2+} compétiteur de Zn^{2+}.

D'autres métaux traversent la paroi par diffusion active nécessitant de l'ATP, c'est le cas des Na^+-K^+ ATPases avec flux sortant surtout de Na^+ et flux entrant de K^+. D'autres ATPases transportent les protons ou Ca^{2+}. Généralement, les transporteurs ATPasiques sont hautement spécifiques d'ions déterminés mais il a été démontré le passage d'éléments traces non essentiels. Par exemple, chez les vertébrés, le cadmium traverse par les Ca^{2+} ATPases ; le thallium traverse par les Na^+-K^+ ATPases en remplaçant K^+ avec une très grande toxicité (rodenticide employé en agriculture). Le cuivre est transporté par une ATPase spécifique chez l'homme.

Enfin, les processus d'endocytose et de phagocytose représentent une contribution importante dans l'incorporation des métaux absorbés sur des particules (nourriture, poussières) ou liés à des macromolécules.

L'endocytose génère des vésicules à « manteau » tapissées de clathrine d'environ 0,1 µm de diamètre. Elle est généralement associée à un phénomène d'exocytose au pôle opposé de la cellule. La phagocytose aboutit à l'englobement et à l'ingestion de grosses particules (1 à 2 µm) ou macromolécules avec pénétration simultanée des métaux qu'ils soient à l'état pur, absorbés sur des particules ou liés à des macromolécules (*cf.* transport du fer). Certaines cellules sanguines sont spécialisées dans la phagocytose et le transport des métaux (macrophages)

II.3. Devenir des métaux dans la cellule

L'incorporation du métal dans le compartiment intracellulaire est suivie d'une régulation soit par élimination du métal au niveau des membranes basolatérales, soit par une transformation intracellulaire faisant intervenir des ligands soit par une compartimentation intracellulaire.

L'élimination au niveau des membranes basolatérales peut se faire vers le sang, vers une cellule voisine, vers une cellule phagocytaire libre. Les processus d'élimination sont les mêmes que ceux de l'incorporation : diffusion simple, diffusion facilitée (par exemple Cd^{2+} emprunte les pompes à Ca^{2+}), transport actif, exocytose.

La biodisponibilité de certains métaux peut être contrecarrée par la liaison à certaines protéines ou glycoprotéines en formant des complexes stables de métalloprotéines (*Cf.* chapitre métalloprotéines) avec détoxication. Les métalloprotéines sont stockées dans la cellule ou libérées dans le sang.

La compartimentation peut représenter un moyen de défense contre les métaux. Par exemple le système lysosomal peut accumuler les éléments traces essentiels et non essentiels. Dans certaines cellules spécialisées des granules intracellulaires ont une fonction de stockage de calcium mais aussi de plusieurs métaux (*Cf.* chapitre cellule à calcium de la glande digestive, du tissu conjonctif et granules du néphrocyte).

Ces granules se forment vraisemblablement avec une contribution du système lysosomal qui par ailleurs est le récepteur final des métalloprotéines et les dégrade. Certaines observations ont mis en évidence, dans la membrane du lysosome, des pompes ATP dépendantes à protons fonctionnant vers la lumière du lysosome. Selon Dallinger (1995), il n'est pas exclu que des cations métalliques puissent suivre cette voie spécifique vers la cavité du lysosome ou un granule en formation.

La majorité des études ayant concerné jusqu'à ce jour le devenir de métaux fournis expérimentalement sous forme de solutions ou présents sur site sous forme dissoute dans les produits de percolation, nous avons orienté nos recherches de terrain vers une contamination métallique de type prépondérant aérosols ou retombées sèches métalliques : ambiance autoroutière, poussières d'aciérie, précipités d'hydroxydes métalliques d'une décharge contrôlée, minerais métallifères (ancienne mine de cuivre). De même, la contamination expérimentale a été réalisée à partir de poudre pure (zinc et plomb) ou de poussières d'électrofiltres (aciérie). Ces types de contamination font appel principalement à des processus d'incorporation cellulaire par phagocytose mais à l'aval, l'action des différentes enzymes des lysosomes peut changer la spéciation des métaux avec une mise en œuvre de certaines des voies métaboliques décrites ci-dessus. Une complémentarité fonctionnelle intercellulaire peut également se développer et nous traiterons des capacités complémentaires dans la glande digestive entre les cellules digestives et les cellules à calcium. La complémentarité entre organes existe également et nous traiterons des capacités des néphrocytes par rapport à la glande digestive.

Chapitre III : Données anatomiques histologiques et physiologiques comparées des gastéropodes ; spécificité parmi les mollusques

Ce chapitre a pour objectif la présentation des connaissances déjà acquises concernant successivement le tractus digestif, le rein, les cellules du conjonctif, du sang et du système nerveux intervenant dans le métabolisme des métaux avec, en conclusion, la présentation du schéma général de la coordination entre les différents types cellulaires intervenant dans le métabolisme des métaux.

III.1. Anatomie, histologie et physiologie du tractus digestif

III.1.1. Nutrition et digestion des Hélicidés. Aliment pour élevage

Une revue sur les données de bases de la nutrition et de la dégradation des fibres chez les Hélicidés a été réalisée par Charrier (2000).

Les Hélicidés sont des phytophages opportunistes et polyphages. Le Petit-gris, *Helix aspersa aspersa*, se nourrit, en milieu naturel, d'ortie, de picris (sorte de chardon) et de graminées (chiendent, brome mou). Le mucus, indispensable à son déplacement, représente en termes budgétaires une dépense moyenne de 20% de l'énergie ingérée. En terrain sec, la distance « profitable » à parcourir influence donc sa stratégie de recherche de nourriture. L'escargot n'a pas de besoins alimentaires journaliers car la durée de son transit digestif est d'environ 32 heures. Cette longue durée est typique des animaux phytophages et s'explique, chez les Hélicidés, par la dégradation du bol alimentaire au niveau de trois sites :

- a :le jabot où la digestion extracellulaire semble être le fait d'enzymes endogènes ;
- b : la glande digestive où la digestion intracellulaire s'opère notamment par des hydrolases cytoplasmiques ;
- c : l'intestin où se produit une fermentation bactérienne.

Les fibres végétales que le Petit-gris semble dégrader le mieux sont les parois cellulosiques pauvres en lignine (ex : les végétaux jeunes), les réserves des légumineuses riches en mannose mais pauvres en galactose (ex : caroube, lupin) et aussi des lichens et des champignons (se développant par exemple sur des végétaux morts). Par contre, les céréales riches en amidon ne paraissent pas nécessaires, sauf si sa flore intestinale (en cours d'identification) se révélait capable de dégrader ce polyoside de réserve.

La flore bactérienne des trois Hélicidés comestibles est fermentaire et certaines souches produisent de l'hydrogène. Chez *Helix aspersa aspersa*, au moins une souche utilise aussi l'hydrogène produit. Par contre, les escargots n'excrètent pas de méthane et en cela se différencient des ruminants et de la plupart des termites.

Les nouveau-nés ont leur appétit stimulé par les excréments parentaux, ce qui peut-être un moyen de colonisation bactérienne de leur tractus digestif. Cependant, ces même excréments se révèlent toxiques pour des individus d'un mois environ et plus, d'où l'importance du nettoyage des enceintes en élevage hors-sol.

L'amélioration de l'aliment fourni en héliciculture est un objectif de nombreux chercheurs. L'alimentation utilisée était, au départ, constituée de végétaux afin de respecter la phytophagie de ces animaux (Mason, 1977) puis, afin de faciliter la conservation et la

distribution, c'est l'emploi d'aliments composés avec des formulations variées en % de participation des différents ingrédients d'origine végétale (tableau 11).

Tableau 11 : Proposition de formulation d'aliments pour escargot

Composition des aliments (%)	Aliment 1	Aliment 2	Aliment 3	Aliment 4	Aliment 5
Salade					44,0
Maïs	10,0	23,0	34,2	34,7	
Gluten de maïs	8,0	6,0			
Amidon de maïs	11,0	15,0			
Tourteau de soja	20,0	20,0	22,0	23,5	23,0
Corn distiller			9,7		
Luzerne déshydratée				8,0	
Sel	0,4	0,4	0,4	0,4	
Vitamines + oligo-éléments	0,6	0,6	0,5	*0,5*	
Ca2PO4	5,0	5,0	2,0	2,0	4,0
Carbonate de calcium	45,0		30,8	30,5	29,0
Propionate de calcium		30,0	0,4	0,4	
Total	***100***	***100***	***100***	***100***	***100***
Matière azotée totale	15,3	15,3	16,9	15,5	
Cellulose brute	1,2	1,2	2,7	4,1	
Calcium	18,4	12,7	12,4	12,4	
Phosphore total	1,1		0,6	0,6	

** vitamine A : 750.000 UI*
vitamine D3 : 225.000 UI
vitamine E : 560 mg
cuivre : 75 mg/kg

Les aliments actuellement sur le marché relèvent soit d'une formulation INRA avec indication du fabricant (Mesny, Genthon, Grésillon), ou commercialisation par UCAAB, Sanders soit ont fait l'objet d'une amélioration des performances par le choix de nouveaux ingrédients comme l'utilisation de lait en poudre (Gomot, 1994 ; tableau 12).

Parmi les éléments indispensables le calcium est un facteur limitant de la croissance des mollusques (Fournié et Chétail, 1984). Il est fourni selon les formulations sous diverses formes : phosphate de calcium, carbonate de calcium, propionate de calcium des fournisseurs de produits chimiques (tableau 11), pierres calcaires broyées, coquilles d'escargots broyées, coquilles d'huîtres broyées, algue marine calcaire broyée (*Lithothamnium calcanum*) (tableau 12). Par ailleurs, il est, dans tous les cas, ajouté un complément de vitamines A, D3, E et, selon la formule INRA, du cuivre à la concentration de 75 mg/kg d'aliment. Certains auteurs ont testé l'action d'un ajout de protéines (Conan, 1993) ou d'un ajout d'acides aminés et de protéines (Gomot, 1994). Cet ajout de cuivre a pour justification le rôle physiologique de l'hémocyanine, métalloprotéine contenant du cuivre et pigment respiratoire des gastéropodes. Parmi les aliments pour bétail, un aliment dit « truie » contient également du cuivre et a été également utilisé pour les escargots.

Tableau 12 : Résumé des différents aliments relevés dans la littérature et utilisés dans l'alimentation des escargots

Incubation à 20°C

Premier âge		*Naissains (% de l'aliment de)*			*Nursery (% de l'aliment de)*								*Appellation*
UCAAB+vit, +oligo, +aa, + ADN	*Minéraux*	*UCAAB*	*Lait**	*Lithothamne*	*UCAAB*	*Lait**	*Coquille d'huitres*	*Lithothamne*	*E3*	*IC*	*S*	*M. GOMOT*	
Alvityl	Coquilles d'escargots broyées	0,0	85,0	15,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	Témoin
					21,5	63,5	0,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2 L
Globogenol	Pierres calcaires broyées	21,5	63,5	15,0	21,5	63,5	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2 H
					87,0	0,0	0,0	13,0	0,0	0,0	0,0	0,0	U + F
Globufer	Algues marines broyées = Calmugal	35,0	50,0	15,0	42,5	42,5	0,0	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	U + L
					42,5	42,5	15,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4 H
Equisthénol		42,5	42,5	15,0	0,0	25,0	0,0	5,0	70,0	0,0	0,0	0,0	N3
					0,0	42,5	0,0	7,5	50,0	0,0	0,0	0,0	E3 + L
Survitacanin		63,5	21,5	15,0	0,0	5,0	0,0	0,0	95,0	0,0	0,0	0,0	E3 L5
						42,5	0,0	7,5	0,0	0,0	50,0	0,0	S + L
		85,0	0,0	15,0		5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	95,0	0,0	S + 5
						42,5	0,0	7,5	0,0	50,0	0,0	0,0	Ic + L
						42,5	0,0	7,5	0,0	0,0	0,0	50	M + L
1.96% dans l'aliment UCAAB Pas d'action positive	16.6% dans l'aliment UCAAB Conclusion Intérêt du Lithothamne	+ 23°C +/- 2°C Photopériode 18/6 Conclusion - intérêt du Lithothamne - 15% de Lithothamne - et de 42.5 à 63.5% d'apport de farine			+ 23°C +/- 2°C Photopériode 18/6 Conclusion - intérêt du Lithothamne - (2 L et U + L) avec lait - bonne performance de N3 à 20°C au lieu de 23°C - et E3 + L - intérêt d'un pourcentage d'un lait allant de 60 à 80% (GOMOT A., 1994 ; p 69) avec 18 à 19% de matières grasses (suif ou coprah)								

T : Aliment truie
Mi : INRA Fabrication Mesny
Ic : INRA Calcium Fabrication Genthon S. A.
S : Aliment Sanders
U : Aliment UCAAB
E3 : Aliment engraissement escargot (Fabrication Guildali S. A.)
E3, E3.1, E3.2., E3.3C et E3.3F selon la date de fabrication
* : lactar 16. Aliment d'allaitement pour veau

Ayant pour objectif la contamination polymétallique des escargots, cette présence de cuivre a toujours été recherchée d'autant que des mortalités ont été constatées par certains héliciculteurs dans le cas de surdosages ou de mauvais mélange des ingrédients. De même, il s'avère que l'ajout de vitamines n'est peut-être pas nécessaire car la flore bactérienne intestinale en est génératrice.

Une amélioration très nette des performances a été constatée en présence de poudre de Lithothamne (Gomot, 1994). Cet auteur note la présence d'une quantité notable de magnésium associé au calcium alors que cet élément est peu présent dans les pierres calcaires broyées ou les coquilles d'escargots broyées (tableau 13).

Tableau 13 : Teneurs en cations dans les différents compléments minéraux de l'aliment (d'après Gomot, 1994)

	Cations dosés en mg/g	
Complément minéral	**Ca^{2+}**	**Mg^{2+}**
Lithothamne	350	30
Pierre calcaire	450	3
Coquille d'escargot	450	0,1

Cette présence de magnésium est proposée comme l'élément favorable à la croissance selon des avis également formulés antérieurement (Crowell, 1973 ; Gomot *et al.*, 1986).

Gomot (1994) émet également l'hypothèse de la présence d'oligo-éléments (I, Cu) pouvant avoir une action favorable sur la croissance et également celle d'oligopeptides isolés à partir de plusieurs rhodophycées (Morse *et al.*, 1984).

Différents auteurs ont établi l'indice de consommation qui est la quantité d'aliment nécessaire pour produire 1 kg d'escargots en poids frais dans des conditions d'élevage par ailleurs définies (température, photopériode, hygrométrie).

Selon Charrier et Daguzan (1980a-1983) et Daguzan (1985a) cet indice est de 4,8 kg pour les animaux nourris avec du chou et jusqu'à 7 pour divers autres végétaux, et entre 0,8 et 1,3 kg selon l'aliment composé utilisé. Cet indice a été amélioré par Gomot (1994) avec une variation de 0,8 à 0,5 selon l'aliment testé et la mise en évidence de l'effet favorable de poudre de lait pendant la Nursery et de poudre de lithothamne en $2^{ème}$ âge.

De nombreuses expériences d'apports de végétaux frais ont été réalisées en parcs d'élevage extérieurs (tunnels). L'héliciculteur sème, soit en ligne soit en mélange, certaines espèces avant de placer le naissain. Le colza se révèle plus attractif que la laitue, le trèfle blanc et le chou. Dans tous les cas, la nourriture en poudre est fournie en plus et *ad libitum* dans les mangeoires.

Gomot (1994) a montré que la composition biochimique (protéines, acides aminés, lipides, glucides, minéraux) des espèces comestibles de gastéropodes pulmonés peut varier en fonction de l'espèce, de l'alimentation et de la provenance (nature ou élevage). Ces différences sont à prendre en compte dans des études écotoxicologiques en fonction de l'affinité de certains micro-polluants vis-à-vis des lipides ou de leur liaison à des protéines spécifiques. Par ailleurs, la biominéralisation, très développée chez les gastéropodes, explique l'existence d'une détoxication par incorporation de métaux dans divers types de concrétions minérales.

Les dosages des macro-éléments P, Ca et Mg dans diverses espèces (Gomot, 1994) donnent le classement suivant en fonction du pied ou des viscères (tableau 14) :

Tableau 14 : Classement des différentes espèces d'escargots selon le dosage des macro-éléments P, Ca et Mg dans le pied et les viscères.
H.p. : *Helix pomatia* (escargot de Bourgogne); H.l.: *Helix lucorum* ; H.a.a. : *Helix aspersa aspersa* (escargot petit gris) ; H.a.m. : *Helix aspersa maxima* (escargot gros gris d'Algérie)

	Pied		Viscères	
	% MS	Classement	% MS	Classement
Ca	1à 4,5 %	H.p.>H.l.>H.a.a.>H.a.m.	1,3 à 1,9 %	Différences moins nettes
P	0,4 à 1 %	H.p>H.a.m.≥H.a.a.>H.l.	1,1 à 1,3 %	Différences moins nettes
Mg	0,3 à 0,5 %	H.a.m.>H.l.-H.a.a.>H.p.	0,3 à 0,7 %	H.a.m.-H.a.a.>Hp-H.l.

III.1.2. Etude anatomique et histologique du tractus digestif de *Helix aspersa aspersa* – physiologie de la digestion chez les gastéropodes

Cette étude concerne tout d'abord une présentation générale du tractus digestif puis une présentation plus approfondie de la glande digestive compte tenu de son rôle prédominant dans les phénomènes de bioaccumulation des métaux.

III.1.2.1. Etude histologique du tractus digestif chez *Helix aspersa aspersa* et physiologie de la digestion

Charrier (1995 ; 2000) propose un schéma récapitulatif des différents sites de la digestion dans le tractus digestif qui superpose l'organisation cellulaire, l'origine et l'action des différentes enzymes ainsi que la flore bactérienne.

Le tube digestif peut être sur le plan fonctionnel divisé en deux segments entre lesquels est greffée la glande digestive :

- Le segment antérieur de l'orifice buccal à l'estomac est le siège d'une digestion extracellulaire par un apport d'enzymes (oxydases) ayant notamment pour origine un flux actif à partir de la glande digestive. Certaines cellules de la glande salivaire sécrètent également des oxydases et des mucines. L'estomac est une aire de tri où les particules prédigérées sont véhiculées soit dans l'intestin, soit dans la glande digestive selon des critères de taille et de densité.
- La glande digestive assure de multiples fonctions avec d'une part les cellules à calcium et d'autre part les cellules digestives à différents stades de leur cycle (cellules sécrétrices, cellules digestives, cellules excrétrices). En phase de sécrétion, les oxydases gagnent l'estomac et l'œsophage. La digestion intracellulaire s'opère par des hydrolases.
- Le segment postérieur s'étend de l'intestin à l'anus avec successivement l'anse intestinale proximale, l'anse intestinale distale et le rectum. La figure 7 représente les différents types cellulaires et les enzymes principales.

Afin de distinguer le rôle respectif de la glande digestive et de l'intestin vis-à-vis de la prise des métaux, c'est l'intestin proximal qui a été retenu pour l'étude histologique avec son épithélium contenant des cellules à mucus et des entérohépatocytes selon Charrier (1995).

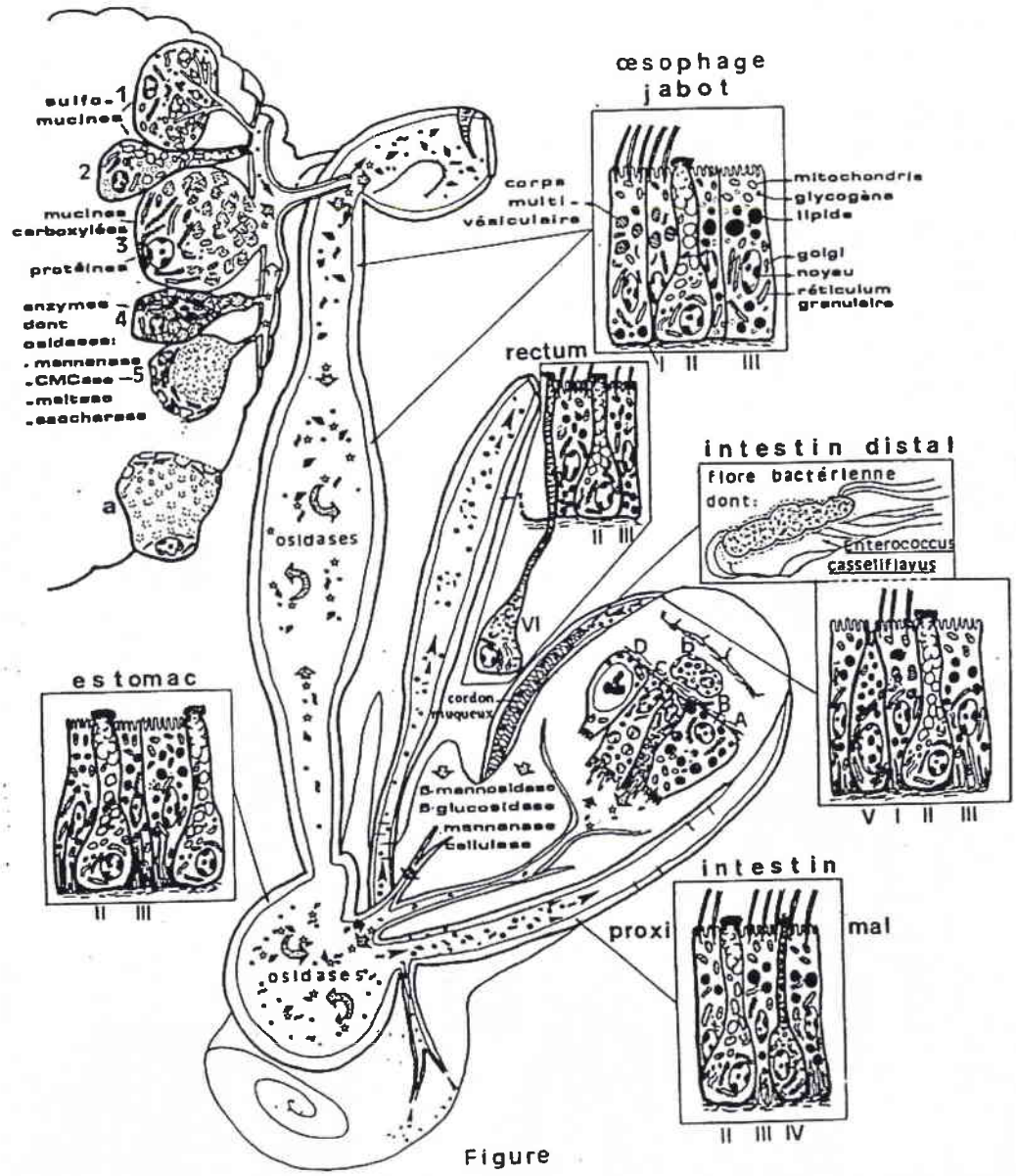


Figure 7 : Diagramme du tractus digestif d'*Helix aspersa aspersa* Müller illustrant les différentes catégories cellulaires épithéliales, sous-épithéliales et glandulaires qui participent au processus extracellulaires et intracellulaires de la digestion (d'après Charrier, 1995).

- **Glandes salivaires : 1 = cellule à calcium ; 2 = mucocyte II ; 3 = cellule alvéolaire ; 4 = cellule granuleuse ; 5 = cellule cystiques ;**
- **Glande digestive : A = cellule à calcium ; B = cellule sécrétrice ; C = cellule digestive ; D = cellule excrétrice ;**
- **Tube digestif : I = cellule absorbante ; II = cellule muqueuse M1 ; III = cellule de stockage entérohépatocyte ; IV = cellule muqueuse M2 du typhlosole ; V = cellule granuleuse de l'intestin distal ; VI = cellule muqueuse sous-épithéliale rectale ;**
- **Tissu conjonctif interstitiel : a = cellule vésiculeuse de Leydig ; b = granulocyte à pores.**

~ = particules alimentaires ; •• = mucines ; ★ = osidases ; ~ = déchets ; ➔ = sécrétion des sulfomucines dirigées vers le bulbe buccal et l'œsophage ; ⇨ = sécrétion et flux d'osidases assurant une digestion extracellulaire des aliments dans le jabot et l'estomac ; ➧ = passage de micromolécules dans les conduits de la glande digestive ; → = absorption des micro-mollécules par les cellules digestives et les cellules à calcium assurant une digestion intracellulaire et une accumulation de substances, respectivement ; ▶ = circulation dans l'intestin et le rectum des déchets provenant de l'estomac et de la glande digestive. Pour la clarté de la représentation, les déchets provenant de la glande digestive sont représentés que sur le lobe postérieur ; ⇀ = absorption de nutriments (par les cellules intestinales et vers le tissu interstitiel).

III.1.2.2. La glande digestive des gastéropodes

De nombreux travaux concernent l'étude de la glande digestive des gastéropodes. En ne retenant que ceux consacrés aux pulmonés, on peut citer Krijgsman (1925), Carriker et Bilstad (1946), Thiele (1953), Billet et McGee-Russell (1955), Morton (1955 et 1956), Abolins-Krogis (1960), Sumner (1965 et 1983), Walker (1970), Franchini et Ottaviani (1993).

Ces travaux portent sur la structure, l'ultrastructure et l'histochimie de la glande digestive des pulmonés terrestres ou aquatiques en liaison avec ses fonctions physiologiques. D'autres travaux concernent les gastéropodes Prosobranches et Opisthobranches. Il en sera fait mention pour certains aspects de la physiologie pouvant enrichir la discussion.

Il est établi que la glande digestive est tout d'abord impliquée dans les processus de digestion extra ou/et intracellulaire (selon les espèces) et secondairement dans les mécanismes de défense (Reade, 1968 ; Bayne, 1974 ; Renwrantz *et al.*, 1981 ; Ottaviani, 1990), dans les processus de détoxication (Marigomez *et al.*, 1986c), dans le stockage du calcium, la régulation ionique et l'équilibre acido-basique (Carriker, 1946 ; Thiele, 1953 ; Sumner, 1965) et du glycogène (Gabe, 1962 ; Kulkarni, 1981).

Les tubules et lobules sont constitués d'un épithélium simple reposant sur une fine membrane basale.

En ce qui concerne le nombre de types cellulaires décrits dans la constitution des tubules de la glande digestive, il en existe principalement de deux catégories (Krijgsman, 1929 ; Carriker, 1946 ; Thiele, 1953) :

- Les cellules digestives avec un cycle cellulaire (absorption et phagocytose ; digestion intracellulaire ; fragmentation et régénération) et un cycle saisonnier (Mukherjee *et al.*, 1995) avec plus de lipides en automne avant l'hibernation ;
- Les cellules basophiles ou cellules sécrétrices sont des cellules à calcium avec ortho- (PO_4^{3-}) et pyrophosphate (P-O-P) associés à Ca, Mg, Mn, Cu, Co et Zn ;
- Accessoirement, il y a quelques mucocytes intercalés entre les deux types cellulaires précédents.

Les tubules communiquent avec l'estomac par un système de canaux. Entre les tubules, existe un tissu conjonctif contenant des lacunes sanguines, des cellules de stockage (glycogène, calcium, lipides) et des cellules à fonction endocrine (Rebecchi *et al.*, 1996 : cellules vésiculaires ; Sminia, 1972 : VCTCs (Vesicular Connection Tissue Cells)).

La présence de cellules immunoréactives antisomatostatine dans le tissu conjonctif de la glande digestive a été mise en évidence par Marchand et Colard (1991) et par Rebecchi *et al.* (1996) (tableau 15).

III.1.2.2.1. Les cellules digestives

La synthèse des différents documents permet d'établir le schéma de la digestion intracellulaire avec une succession des différentes étapes (selon Rebecchi *et al.* (1996) chez *Viviparus ater*) :

- 1er : formation des vésicules d'endocytose à clathrine ;
- 2ème : fusion des vésicules d'endocytose, perte de la clathrine, formation d'endosomes de plus en plus nombreux ;
- 3ème : fusion des endosomes avec des lysosomes apportant les hydrolases acides (origine : Golgi) ;

- 4ème : formation de phagolysosomes avec corps résiduels et exocytose de ceux-ci vers le tube digestif par rupture de la membrane plasmique
- 5ème : fragmentation de la cellule digestive

III.1.2.2.2. Les cellules à calcium (figures 8 et 9)

Nous traiterons également, dans ce paragraphe, des cellules à calcium du tissu conjonctif compte tenu de leur intervention dans le processus de détoxication.

Tableau 15 : Catégories cellulaires de la glande digestive des gastéropodes

					Conjonctif inter-tubulaire ou lobulaire		
		Cellules digestives	Mucocytes	Cellules à calcium	Cellules à calcium du conjonctif sphérocristaux	Grande cellules vésiculaires	Cellules immunoréactives (IR)
Rebecchi *et al.*, 1996	***Viviparus ater* (Prosobranche)**	Un seul type à différents stades de digestion intracellulaire - Lipides ↑↑ en automne avant hibernation	Peu	Absence	+	Glycogène IR anti-insuline	Antistomatostatine Antimétenkephaline Anti-sérotonine (neurotransmetteur)
Biswas et Ghose, 1968 Das *et al.*, 1992	***Viviparus bengalensis* (Prosobranche)**	Digestion extracellulaire Cellules sécrétrices Cellules excrétrices Cellules phagocytaires		+			
Sminia, 1972	***Lymnaea stagnalis* (Pulmoné basommtophore)**					V.C.T.CS (glycogène cellules de stockage)	
Mukherjee *et al.*, 1995	***Laevicaulis alte* (limnée terrestre – Pulmoné)**	Phases fonctionnelles : - Type I : cellules vacuolaires - Type II : Cellules granuleuses prédominantes	Absence	Absence			
	***Pila globosa* (eau douce)**	- Type I : cellules vacuolaires prédominantes - Type II : Cellules granuleuses peu nombreuses	Absence	Absence		Type III Cellules de stockage	
	***Pugilina cochlidium* (estuaire)**	- Type I : cellules granuleuses au niveau apical - Type II : Cellules granuleuses d'une manière uniforme Cycle cellulaire lié à la marée	Absence	Absence			
Krijgsman, 1929	***Helix pomatia* Pulmoné stylommatophore**	+	Absence	+			
Abolins-Krogis, 1960	***Helix pomatia* Pulmoné stylommatophore**	+	Absence	+			
Charrier, 1995	***Helix aspersa***	Cellules sécrétrices Cellules digestives Cellules excrétrices	Absence	+		Cellules vésiculeuses de Leydig	

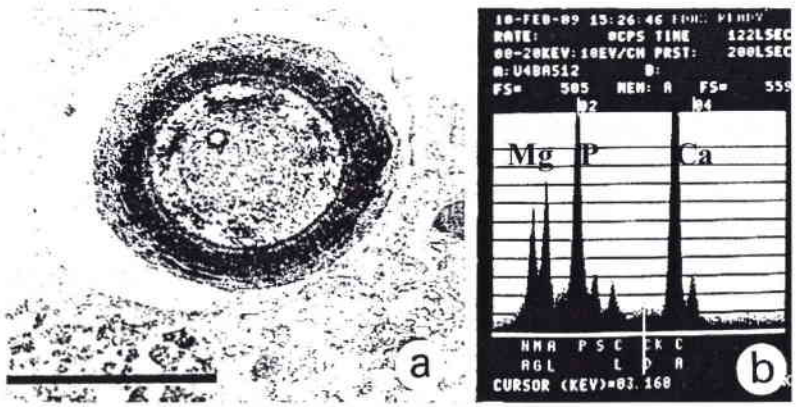


Figure 8 a et b : a : Photographie en MET d'une concrétion de calcium dans une cellule de la glande digestive de *Arion ater* (échelle : 0,25 µm) (dans Cajaraville, 1995).
b Analyse élémentaire à la microsonde XD d'un granule minéralisé de la cellule basophile ou cellule à calcium de *Littorina littorea* (Cajaraville, 1995) Association P/Ca/Mg.

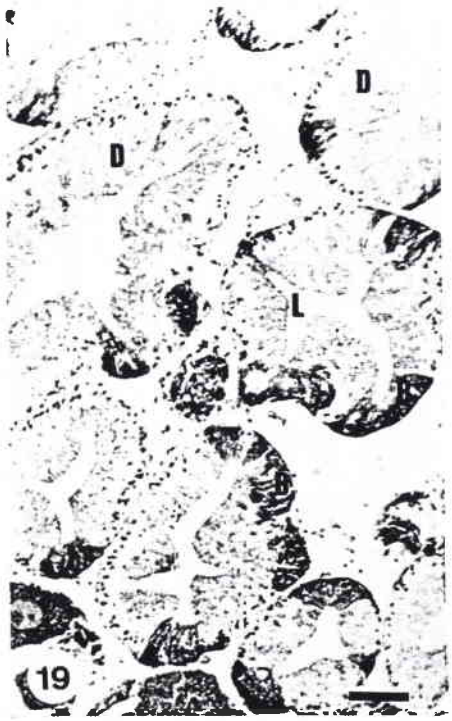


Figure 9 : Photographie en microscopie optique de la glande digestive de *Littorina littorea* avec cellules digestives (D), cellules basophiles à calcium (B) et lumière du tubule (L) (échelle 50 µm) (Cajaraville, 1995).

Fournié et Chétail (1982) fournissent une revue exhaustive de la distribution systématique des cellules à calcium de la glande digestive des mollusques gastéropodes (tableau 16).

Tableau 16 : Distribution des cellules à calcium épithéliales au niveau de la glande digestive des Mollusques (d'après Fournié et Chétail, 1982)

Stylommatophores	Prosobranches	Opisthobranches
Helix (1) (2) (3) (4) (5) (9) (10) (12) (13) (15) (17) (19) (21)	Haliotis (7)	Aeolidia (11)
Cepaea (3) (4) (11) (21)	Buccinum (11)	Facelina (11)
Oxychilus (16)	Nassa (11)	
Vaginulus (14)	Paludina (11)	
Bensonia (22)		
Achatina (8)	Pomatias (23)	
Succinea (3) (18)		
Testacella (18)		
Limax (1) (3) (4) (21)		
Agriolimax (2) (3) (10) (20)		
Arion (1) (2) (3) (10) (15)		

(1) Barfurth, 1883; (2) Frenzel, 1885; (3) Cuenot, 1892; (4) Mac Munn, 1900; (5) Krijgsman, 1925; (6) Simroth et Hoffman, 1928; (7) Manigault, 1939; (8) Van Weel, 1950; (9) Wagge, 1951; (10) Fretter, 1952; (11) Thiele, 1953; (12) Billet et Mac Gee-Russell, 1955; (13) Abolins-Krogis, 1960; (14) Bani, 1962; (15) David et Götze, 1963; (16) Rigby, 1963; (17) Sumner, 1965; (18) Sumner, 1966; (19) Timmermans, 1969; (20) Walker, 1970; (21) Burton, 1972; (22) Sen Gupta, 1977; (23) observation personnelle.

Elles existent chez de nombreux Stylommatophores, chez quelques Prosobranches et chez deux Opisthobranches mais non chez les Basommatophores.

Les cellules à calcium de l'épithélium acineux de la glande digestive, désignées aussi cellules basophiles, sont, selon Marigomez *et al.* (1995) de forme pyramidale avec un réticulum endoplasmique granuleux très développé, un complexe de Golgi, des granules de sécrétion électrondenses et, très nettement visibles, des granules insolubles de phosphate de calcium entourés d'une membrane, donc formés par minéralisation interne. Selon Fournié et Chétail (1982), la membrane apicale présente quelques petites microvillosités. Les granules lient principalement des métaux de la classe A (Mason *et al.*, 1984 ; Marigomez *et al.*, 1990).

L'analyse élémentaire de ces granules, en dehors de la présence en quantité variable de P/Ca/Mg, indique qu'ils sont les sites principaux de l'accumulation des métaux essentiels ou toxiques. Selon les Mollusques étudiés, il s'agit de mélange en proportions variées de Ca, de Mg et P et d'éléments traces (Pynnönen *et al.*, 1987 ; Simkiss, 1981). La présence d'anhydrase carbonique a été mise en évidence par Ireland (1986). Les métaux toxiques liés à des protéines sont intégrés dans les lysosomes puis libérés dans les vacuoles contenant les concrétions. Les concrétions calciques jouent principalement un rôle dans la régulation calcique.

D'une manière générale, les cellules spécialisées dans la minéralisation intracellulaire (cellules à calcium) différent de celles impliquées dans la digestion intracellulaire (cellules digestives). Les cellules à calcium de certains gastéropodes jouent un rôle identique à celui des cellules R de la glande digestive des Crustacés qui diffèrent des cellules de type S.

III.1.2.2.3. La glande digestive et les métaux

III.1.2.2.3.1. Le système lysosomal des cellules digestives

Comme indiqué précédemment, les cellules digestives sont hautement spécialisées dans la digestion intracellulaire avec un système lysosomal spécialement développé (Cajaraville *et al.*, 1995). Les métaux toxiques, provenant soit du milieu intérieur (sang, hémocytes) soit du milieu extérieur (particules alimentaires), peuvent être ingérés par endocytose ou phagocytose. Ces cellules digestives peuvent, en effet, présenter une endocytose de complexes de protéines associées à des métaux au niveau des membranes plasmiques basales ou apicales (Marigomez *et al.*, 1995). Par ailleurs, les cellules digestives effectuent la synthèse de trois métallothionéines liant certains métaux (Dallinger, 1995 ; Dallinger *et al.*, 1997-1999). Le devenir des métaux liés aux protéines est une incorporation ultérieure dans le système lysosomal avec une accumulation.

Les lysosomes jouent ainsi un rôle important de séquestration et de détoxication. En cas d'excédent métallique, par exemple de cadmium chez *Littorina*, les lysosomes sont moins nombreux mais plus volumineux, la stabilité de leur membrane est altérée et entraîne une augmentation de la fusion de ceux-ci (Marigomez *et al.*, 1989). La même observation a été faite chez les mollusques bivalves en présence de zinc, de cuivre et de cadmium (Etxeberria *et al.*, 1994).

Les dépôts de classe b selon Taylor (1995), de forme irrégulière, contrairement aux granules de classe a sphériques (*Cf.* chapitre cellules à calcium), se forment dans les lysosomes ou leurs dérivés (corps résiduels). Ces dépôts sont de taille plus petite que les granules de type a (0,5 à 2 µm). Les métaux identifiés sont le cuivre, le cadmium et le mercure mais aussi le zinc. Ces granules sont le résultat d'une activité physiologique normale soit de la dégradation de métalloprotéines soufrées soit de celle des métallothionéines.

III.1.2.2.3.2. Les métalloprotéines et les métallothionéines chez les gastéropodes

Les Mollusques gastéropodes ont donné lieu, depuis une dizaine d'années, à la recherche et à la découverte de protéines soufrées ou métallothionéines (MT) qui fixent certains ions métalliques de la classe b ou de transition.

a. Le cadmium

Les cellules digestives possèdent deux MT identifiées et séquencées. Dallinger (1995) a publié une revue exhaustive des métalloprotéines des gastéropodes terrestres. Les escargots terrestres se comportent comme des macroconcentreurs du cadmium, métal non essentiel et toxique. Ils s'avèrent tolérants contre des concentrations élevées de cadmium dans leur alimentation, jusqu'à 100 µg/g de poids sec dans la nourriture (Berger *et al.*, 1993) en ce qui concerne *Helix pomatia*.

Le cadmium montre un organotropisme presque exclusif pour la glande digestive qui est l'organe de stockage à long terme de ce métal.

Tableau 17 : Séquence primaire des acides aminés d'une métalloprotéine d'*Helix pomatia*. La protéine a été purifiée par des techniques chromatographiques, incluant une HPLC en phase inverse. La protéine purifiée est S-méthylée et clivée par différentes enzymes comme la trypsine, l'endoprotéinase Glu-C, l'endoprotéinase Asp-N et l'endoprotéinase Arg-C. Les produits de clivage ont été fractionnés par HPLC et séquencés. Le fragment de peptide (BI*-) contient sept acides aminés mais pas de cystéine (d'après Dallinger, 1995)

				11				15					20				25
BI*-	Lys	Cys	Thr	Ser	Ala	Cys	Arg	Ser	Glu	Pro	Cys	Gln	Cys	Gly	Ser	Lys	Cys	Gln
				26				30					35				40
				Cys	Gly	Glu	Gly	Cys	Thr	Cys	Ala	Ala	Cys	Lys	Thr	Cys	Asn	Cys
				41				45					50				55
				Thr	Ser	Asp	Gly	Cys	Lys	Cys	Gly	Lys	Gly	Cys	Thr	Gly	Pro	Asp
				56				60					65				
				Ser	Cys	Lys	Cys	Gly	Ser	Ser	Cys	Ser	Cys	Lys				

Le métal est localisé dans la fraction cytosolique des cellules basophiles ou cellules à calcium.

La métallothionéine a été isolée par chromatographie sur gel et par HPLC (figure 10). Le séquençage a été réalisé chez *Helix pomatia* (tableau 17).

La structure primaire permet de classer cet isoforme de métallothionéine dans la classe I, c'est-à-dire les métallothionéines dont les cystéines sont situées en même position que celles de la métallothionéine de rein de cheval. Les caractéristiques sont les suivantes : 66 acides aminés ; 18 cystéines ; poids moléculaire : 6.620 Da ; nombre d'atomes de cadmium liés par molécule : 6 (en deux domaines de 3 cadmium) (tableau 18).

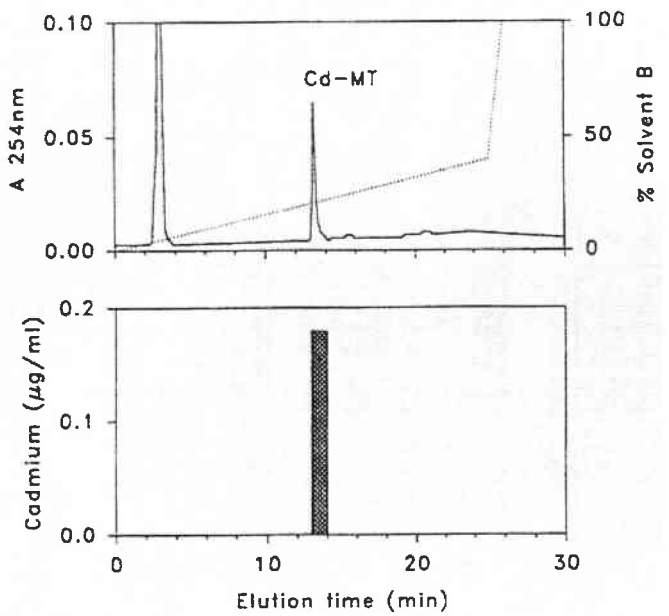


Figure 10 : Modèle de fractionnement de la métallothionéine liée au cadmium de la glande digestive d'*Helix pomatia* exposé au métal après une HPLC en phase inverse. Graphique supérieur : absorption à 254 nm après élution dans un gradient de Solvant B (25 mM Tris-HCL dans 60 % d'acétonitrile, pH 7,5). Graphique inférieur : concentration en cadmium dans le pic élution de métallothionéine (d'après Dallinger, 1995)

Tableau 18 : Structure primaire d'une métallothionéine d'*Helix pomatia*. Encadré : position des résidus de cystéine (d'après Dallinger, 1995)

	1									10										20
Ac	S	G	K	G	K	G	E	K	C	T	S	A	C	R	S	E	P	C	Q	C
	21									30										40
	G	S	K	C	Q	C	G	E	G	C	T	C	A	A	C	K	T	C	N	C
	41									50										60
	T	S	D	G	C	K	C	G	K	E	C	T	G	P	D	S	C	K	C	G
	61									66										
	S	S	C	S	C	K														

Les métallothionéines sont induites rapidement à la suite d'une exposition au cadmium et après cessation de l'exposition, la concentration en métallothionéines et la saturation en cadmium de cette protéine demeurent à un taux élevé sur une longue période de temps (figure 11).

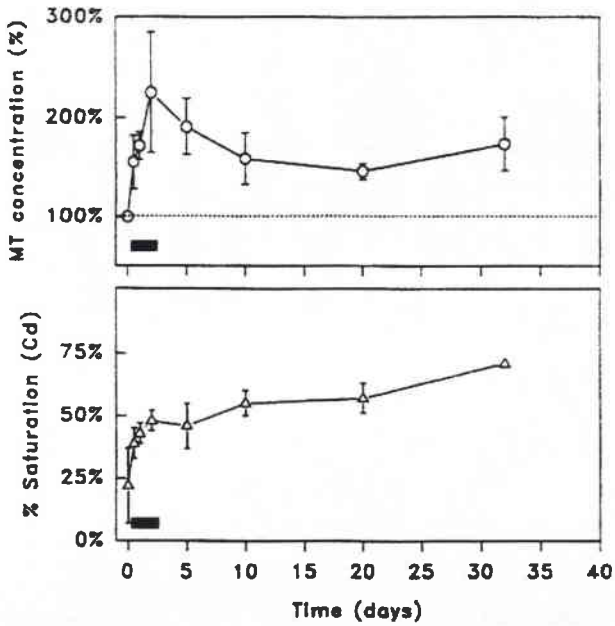


Figure 11 : Expérience à court terme montrant l'inductibilité et la saturation en cadmium de la Cd-métallothionéine d'*Helix pomatia*. Les animaux ont été nourris avec un régime riche en cadmium pendant trois jours (axe des abscisses, barre noire). Après ce temps, les escargots ont été nourris avec une alimentation non contaminée jusqu'à la fin de l'expérience. Graphique supérieur : concentration en métallothionéine (en % des animaux témoins). Graphique inférieur : teneur en cadmium de la protéine (exprimée en % de saturation, en référence à la métallothionéine entièrement saturé)

Contrairement aux métallothionéines de vertébrés qui simultanément se lient à plusieurs métaux Cd, Cu et Zn, les escargots possèdent un isoforme de métallothionéine spécifique du cadmium et qui agit en le détoxifiant.

Bebianno et Langston (1995-1998) ont mis en évidence l'induction et la durée de demi-vie des métallothionéines chez *Littorina littorea* en présence de cadmium. Le turn-over dépend de l'organe : 69 jours pour les branchies ; 160 jours pour le rein ; sans doute un temps beaucoup plus long pour la glande digestive. L'élimination du cadmium par les branchies et le rein est beaucoup plus lente avec un turn-over supérieur à 300 jours. Pendant la phase de détoxication, la concentration en cadmium de la glande digestive continue à croître, ce qui démontre une

remobilisation à partir des autres tissus. En comparaison avec les Mollusques bivalves et les mammifères, le complexe cadmium-métallothionéines apparaît comme beaucoup plus stable et même si une partie des métallothionéines est dégradée, une nouvelle synthèse a lieu en présence du cadmium libéré. Le dosage des métallothionéines chez les gastéropodes représente ainsi un marqueur spécifique de la pollution métallique et il est de plus en plus utilisé dans la biosurveillance.

b. Le zinc et le cuivre (MT-Cu)

Le zinc et le cuivre sont des métaux essentiels pour les gastéropodes.

L'hémocyanine est une protéine cuprique responsable du transport de l'oxygène dans l'hémolymphe et par exemple, l'enzyme anhydrase carbonique, enzyme clé du métabolisme du carbonate de calcium, nécessaire à la construction de la coquille, contient du zinc.

Selon la revue de Miller (1994), l'hémocyanine est une protéine respiratoire contenant du cuivre (figure 12). En ce qui concerne les Mollusques, elle est présente chez les chitons, les gastéropodes et les céphalopodes, occasionnellement chez certains bivalves. En microscopie électronique, la molécule se présente comme un cylindre creux avec, en vue latérale, une structure tri-lamellaire et, en vue axiale, une symétrie d'ordre 10 du fait de la présence de 10 sous-unités et la hauteur est de 30 nm. Le poids moléculaire est de 9 x 10^6 g/mol. Chaque site de fixation de l'oxygène comporte deux atomes de cuivre liés par covalence. Un atome de cuivre (site B) est lié à trois histidines, le deuxième est lié à deux histidines. Toutes les hémocyanines de Mollusques présentent 60 domaines de liaison pour l'oxygène. Les sous-unités ont été particulièrement bien étudiées chez *Helix pomatia* (Van Breemen *et al.*, 1975). Des séquences complètes de certains domaines ont été publiées (Drexel *et al.*, 1987 ; Xin *et al.*, 1990).

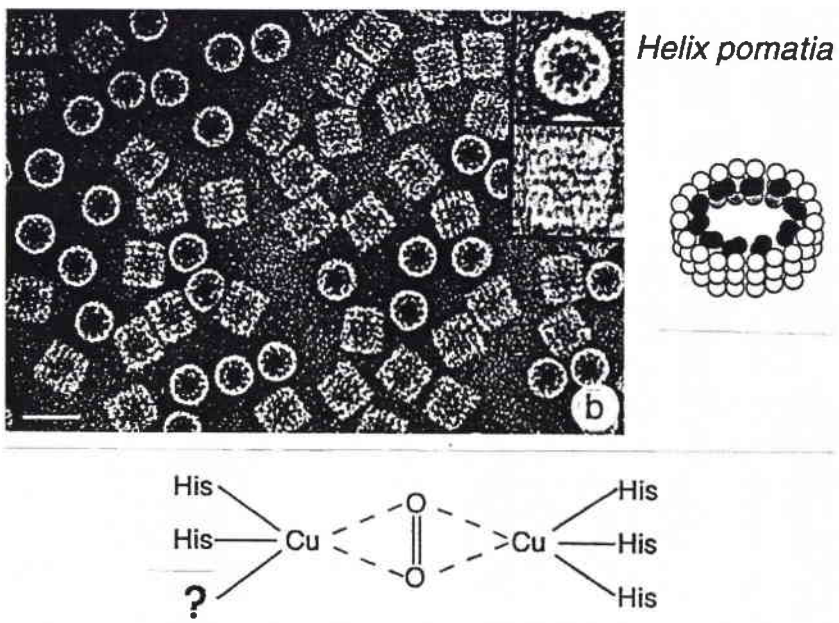


Figure 12 : Hémocyanine de coefficient de sédimentation 100 S d'*Helix pomatia* (*in* Miller, 1994) et interprétation de la structure décamérique. Les études cristallographiques montrent l'existence de deux sites actifs (A et B) de fixation de Cu avec l'oxygène positionné entre les deux sites d'une manière symétrique. Chez les Mollusques, sur le site A, le cuivre est lié à deux résidus histidine, le troisième résidu est inconnu. Sur le site B le cuivre est lié à trois résidus histidine

Les gastéropodes présentent des voies métaboliques du cadmium différentes de celles du zinc et du cuivre. La majorité du zinc soluble de la glande digestive n'est pas liée à des métallothionéines mais à des ligands de poids moléculaire inférieur (Dallinger *et al.*, 1993b).

Le cuivre est lié à deux métallothionéines (Dallinger *et al.*, 1997-1999). Une première métallothionéine située au niveau du pied et du manteau, n'a pas de rôle de détoxication mais un rôle biologique essentiel en stockant du cuivre, utilisé dans la synthèse de l'hémocyanine (*Cf.* chapitre pore cell). Une seconde métallothionéine, en cours d'identification, est située dans la glande digestive avec un rôle de détoxication du cuivre.

Avec la présence de trois métallothionéines dont deux dans la glande digestive, actuellement identifiées (1 MT-Cd, 1 MT-Cu), les gastéropodes peuvent, en présence de cadmium, maintenir, sans interférence, le métabolisme des éléments traces essentiels comme le zinc et le cuivre en permettant ainsi leur régulation. Cette spécificité explique, sans doute, la grande résistance des escargots terrestres vis-à-vis de concentrations environnementales élevées en cadmium.

c. *Le fer et la ferrotransferrine*

Taylor (1995) choisi comme exemple du transport de métal dans la cellule le cas du fer. Celui-ci est transporté dans le sang par la ferrotransferrine, une glycoprotéine de poids moléculaire 80 KD qui présente deux sites de fixation pour le fer. En absence de fer, cette protéine est capable de lier Al, Cr, Co, Cu, Mn et Va. La transferrine se fixe sur les récepteurs spécifiques de la membrane puis, par endocytose, se retrouve dans des vésicules à clathrine. La fusion avec d'autres vésicules forme un endosome qui libère le fer dans le cytoplasme et recycle la transferrine vers la surface de la cellule. La régulation est opérée soit par celle des récepteurs à la transferrine soit par une modification de la synthèse de ferritine. La ferritine peut-être dégradée dans les lysosomes et le résidu est désigné hémosidérine. Les cellules réceptrices du fer sont les cellules en croissance, les cellules du foie et les cellules de l'intestin (Dallinger, 1995).

III.1.2.2.3.3. Les cellules à calcium et leur capacité d'incorporation de métaux dans les concrétions

Selon Mason et Simkiss (1982), les cellules à calcium sont le lieu de stockage de nombreux métaux au niveau des concrétions formées de couches concentriques. Taylor *et al.* (1988) ont montré que chez *Helix aspersa* leur morphologie peut être modifiée par une incorporation de manganèse s'il est présent à un niveau considéré comme excessif. Les concrétions de la glande digestive des escargots, formées de di-phosphate de calcium et de magnésium, appartiennent à la classe a des concrétions (Taylor, 1995) décrites comme associant le métal à l'oxygène des carbonates, oxalates, phosphates ou sulfates avec une affinité O>N>S alors que la classe b des métaux (*Cf.* cellule digestive) présente une association du métal avec des ligands soufrés ou azotés selon une affinité S>N>O. Cette classification correspond aux classes a et b des métaux (*Cf.* chapitre classification des métaux). Les métaux dits intermédiaires ou de transition entre les classes a et b peuvent se trouver dans l'un ou l'autre type de granule a ou b. Par exemple, les concrétions de la cellule à calcium peuvent stocker Sr^{2+} (classe a) mais aussi Mn^{2+}, Fe^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} (métaux de transition).

Les caractéristiques des concrétions de classe a sont leur état amorphe et hydraté (jusqu'à 20% d'eau) ainsi que la présence de composés organiques. Selon Taylor (1995) et d'après les travaux de Greaves *et al.* (1984), Simkiss *et al.* (1990) et de Simkiss (1991), la présence de cette matière organique agirait comme inhibiteur de cristallisation et la persistance de l'état amorphe permettrait de conserver la potentialité de fixer des cations extérieurs, dont des métaux, d'autant qu'un réseau de canaux est suggéré au sein de la substance amorphe, ce qui rendrait possible leur incorporation.

Dans la cellule à calcium, les auteurs, cités dans la revue de Taylor (1995), considèrent que les concrétions jouent des rôles multiples tels que :

- Une contribution à l'équilibre acido-basique ;
- Une réserve ionique utilisée selon les besoins physiologiques ;
- Une contribution au processus de détoxication intracellulaire ;
- Une possible réserve d'énergie en régulant les phosphates pour les fonctions nécessitant de l'ATP.

Les concrétions des cellules à calcium jouent un rôle dans la détoxication des métaux.

Après pénétration dans l'organisme, la liaison des métaux avec des complexes insolubles décroît la quantité de métal circulant pouvant agir sur l'activité enzymatique. Cette liaison est possible selon les métaux soit avec des protéines soit avec des concrétions minérales amorphes.

Les protéines de la classe des métallothionéines fixent les cations divalents tels que Cd, Cu, Hg, Ag et Zn. Ces protéines sont parfois concentrées dans des organes particuliers avec formation de granules contenant des métaux. Ces granules sont interprétés, dans le rein des Mollusques lamellibranches, comme des produits d'oxydation, polymérisés, des lysosomes (George *et al.*, 1979, 1982 et George, 1983).

Les métaux toxiques divalents, sans site de fixation sur les groupements SH, peuvent se lier à des concrétions intracellulaires minérales amorphes se formant sur des matrices organiques comme cela a été mis en évidence par Howard *et al.* (1981) chez *Helix aspersa*. De nombreux invertébrés produisent de telles concrétions de nature calcique (George, 1982). Certains auteurs ont émis l'hypothèse que cette incorporation, dans les concrétions, représente une fonction de détoxication (Simkiss, 1981). Il en est ainsi des concrétions des cellules à calcium de la glande digestive des Mollusques gastéropodes et des Crustacés (Simkiss, 1981 ; Becker *et al.*, 1974) lorsqu'elles sont libérées dans le tractus digestif puis éliminées avec les fécès.

Pour d'autres invertébrés, tels que les Mollusques unionidés qui présentent de telles concrétions de phosphate de calcium, dans les branchies, avec solubilisation lors de la reproduction et utilisation du calcium dans la confection de la coquille des glochidies, la libération simultanée de métaux toxiques représente, au contraire, un risque de toxicité pour l'animal et ses larves (Silverman *et al.*, 1996). L'utilisation de ^{65}Zn et ^{45}Ca, « *in vitro* », a permis à ces auteurs de montrer qu'en fait, et par rapport aux concentrations dans le sang, les concrétions branchiales hyper-accumulent le calcium mais pas le zinc présent à de faibles concentrations qui restent inchangées si on augmente la concentration en ^{65}Zn dans le milieu. La partie organique des concrétions contient des protéines spécifiques liant le calcium et pouvant également fixer des cations divalents (Mn, Fe, Mg, Zn) avec P comme anion. L'analyse X montre que les concrétions des témoins contiennent Ca, Mn et Fe avec peu de Mg et Zn mais jamais de Cd, Pb ou Hg. La comparaison entre les concentrations en zinc dans les concrétions et les concentrations dans les tissus montre que ces dernières sont supérieures.

Les concrétions branchiales des unionidés ne présentent pas d'activité spécifique élevée de fixation du zinc, par contre elle est très importante vis-à-vis du calcium. De même, la concentration en manganèse n'augmente pas après ajout de manganèse dans le milieu alors que sa concentration dans le sang augmente. Par contre, si la concentration en calcium augmente dans le sang, elle augmente aussi dans la concrétion.

La fonction de détoxication qui existe pour certaines concrétions calcifiées ne peut donc être généralisée. De même que les concrétions représentent des fonctions différentes, stockage de calcium lors de la mue et de la métamorphose (Grodowitz et Broce, 1983 ; Sparkes et Greenaway, 1984), régulation des excédents de calcium intracellulaire (Becker *et al.*, 1974), réserve de calcium pour la reproduction (Silverman *et al.*, 1987 ; Fournié et Chétail, 1984), fonction de détoxication (Simkiss, 1981 ; Mason et Simkiss, 1982), leur nature est également différente : phosphate et pyrophosphate de calcium ou carbonate de calcium (*Cf.* paragraphe sur les cellules à calcium du conjonctif des escargots).

La connaissance de la partie organique des concrétions est également encore incomplète. Dans le cas des concrétions branchiales des unionidés, une protéine, fixatrice de calcium et proche de la calmoduline par son poids moléculaire et ses propriétés antigéniques, a été mise en évidence (Silverman *et al.*, 1985).

Les concrétions de phosphate de calcium des branchies ne se lient pas indifféremment à tous les cations bivalents, il y a un choix spécifique.

III.1.2.2.3.4. Discrimination des métaux par les cellules accumulatrices de métaux

L'expérience la plus démonstrative est celle réalisée par Simkiss (1981a) par injection de radioéléments dans le sang de *Helix aspersa*.

Dans deux protocoles expérimentaux « *in vivo* », les radioéléments injectés sont $^{57}Mn^{2+}$, $^{59}Fe^{3+}$, $^{60}Co^{2+}$, $^{65}Zn^{2+}$, $^{85}Sr^{2+}$, $^{109}Cd^{2+}$ et $^{203}Hg^{2+}$. Le sang est prélevé 6 heures après l'injection et au niveau de la glande digestive deux comptages sont réalisés :

- Les granules des cellules à calcium sont isolés et les doses accumulées de chaque isotope permettent d'établir le rapport d'activité qui se classe dans l'ordre suivant :
  Série I : $Mn^{2+}>Fe^{3+}>Zn^{2+}>Co^{2+}>Cd^{2+}>Hg^{2+}>Sr^{2+}$;
- Une portion totale de la glande digestive est analysée et le rapport d'activité se classe alors dans l'ordre suivant :
  Série II : $Mn^{2+}>Fe^{3+}>Cd^{2+}>Hg^{2+}>Zn^{2+}>Co^{2+}>Sr^{2+}$

Un troisième protocole est réalisé *in vitro*. L'hémolymphe est enrichie avec les radio-isotopes, équilibré avec 5% de CO_2 et 95% de O_2 et agité pendant 6 heures avec un lot de granules préalablement isolé. Après lavage, les granules sont séparés du sang et la radioactivité des deux constituants est évaluée. Le rapport d'activité se classe dans l'ordre suivant :

Série III : $Mn^{2+}>Fe^{3+}>Sr^{2+}>Hg^{2+}>Cd^{2+}>Zn^{2+}>Co^{2+}$

La série I, qui concerne les granules isolés *in vivo*, montre la discrimination des trois groupes de métaux :

- Mn, Fe, Zn et Co, métaux de la classe a, sont incorporés préférentiellement dans les granules de pyrophosphates de calcium

Planche I : Résultats des études de détoxication des métaux par incorporations, dans les concrétions, de phosphate de calcium selon Nott et Nicolaidou (1990)

A. Chaîne alimentaire :

L'incorporation des métaux est réalisée chez les proies *Chlamys* (rein), *Littorina* (glande digestive), *Balanus* (cellules du conjonctif). Les carnivores *Nassarius* et *Nucella* se nourrissent des proies et leurs boulettes fécales contiennent les granules de phosphate de calcium de la proie avec conservation des métaux.

B. Microanalyse X :

B.A : Granule de *Littorina*.
B.B : Granule dans les fécès de *Nassarius*.

Seuls K et Cl ne sont plus détectés.

C. Microanalyse X :

A : Granule de *Littorina* exposée au zinc.
B : Granule dans les fécès de *Nassarius*.

Le zinc est conservé.

D. Microanalyse X :

A : Granule du rein de *Chlamys* exposé au zinc et au manganèse.
B : Granule dans les fécès de *Nassarius*.

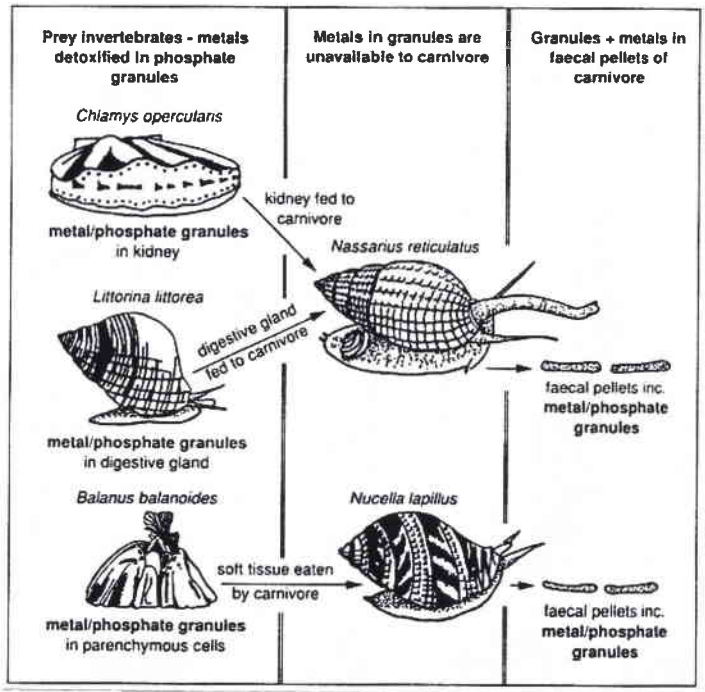
Il y a rétention de Ca, Mn et Zn.

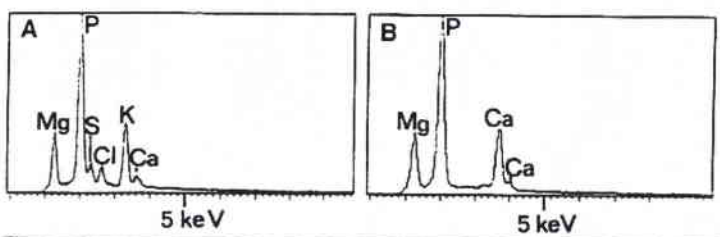
E. Microanalyse X :

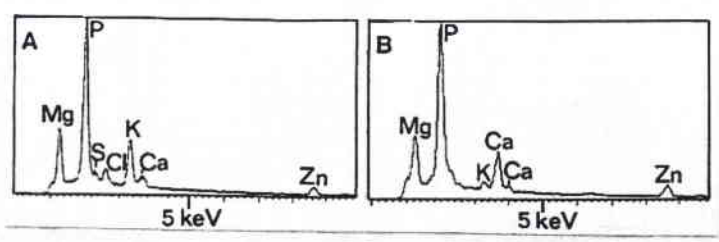
A : Granule du tissu conjonctif de *Balanus* ayant incorporé du zinc.
B : Granule dans les fécès de *Nucella*.

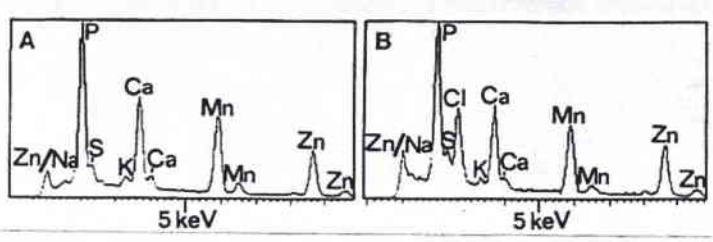
Il y a rétention du zinc.

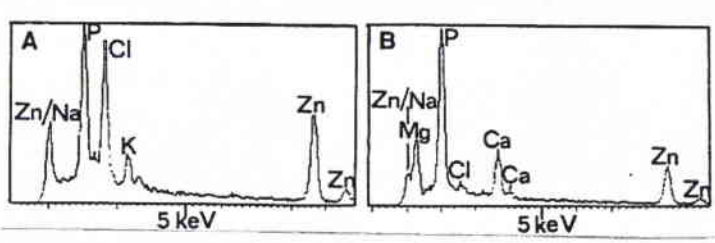
Planche I


Prey invertebrates - metals detoxified in phosphate granules
Metals in granules are unavailable to carnivore
Granules + metals in faecal pellets of carnivore
Chlamys opercularis
kidney fed to carnivore
metal/phosphate granules in kidney
Nassarius reticulatus
Littorina littorea
digestive gland fed to carnivore
faecal pellets inc. metal/phosphate granules
metal/phosphate granules in digestive gland
Balanus balanoides
Nucella lapillus
soft tissue eaten by carnivore
metal/phosphate granules in parenchymous cells
faecal pellets inc. metal/phosphate granules
A


A
P
Mg
S
K
Cl
Ca
5 keV
B
P
Mg
Ca
Ca
5 keV
B


A
P
Mg
K
S
Cl
Ca
Zn
5 keV
B
P
Mg
Ca
K
Ca
Zn
5 keV
C


A
P
Ca
Mn
Zn
Zn/Na
S
K
Ca
Mn
Zn
5 keV
B
P
Cl
Ca
Mn
Zn
Zn/Na
S
K
Ca
Mn
Zn
5 keV
D


A
P
Cl
Zn
Zn/Na
K
Zn
5 keV
B
P
Zn/Na
Mg
Ca
Cl
Ca
Zn
Zn
5 keV
E

Cd et Hg, métaux de la classe b, sont liés à des protéines intracellulaires et se trouvent à un niveau inférieur dans la fraction « granules »

- Sr, métal de la classe a, fait l'objet d'une discrimination spécifique.

La série II qui concerne la glande digestive, c'est-à-dire les granules et les autres constituants cellulaires, se caractérise par un mélange de différents processus, à savoir l'incorporation à des granules et la liaison avec des protéines. Leur présence en quantité dans le cytoplasme, hors granule, intercale Cd et Hg entre Mn, Fe et Zn, Co, Sr se distingue toujours par une discrimination.

La série III réalisée, *in vitro*, montre l'annulation de la discrimination vis-à-vis de Sr. Par ailleurs, il est proposé qu'en fonction de la teneur en O_2, Co^{2+} soit oxydé en Co^{3+} et stabilisé par liaison avec des groupes amines de protéines.

Le schéma explicatif global fournit par Simkiss (1981b) et repris par Taylor (1995), est donné en figure 13 :

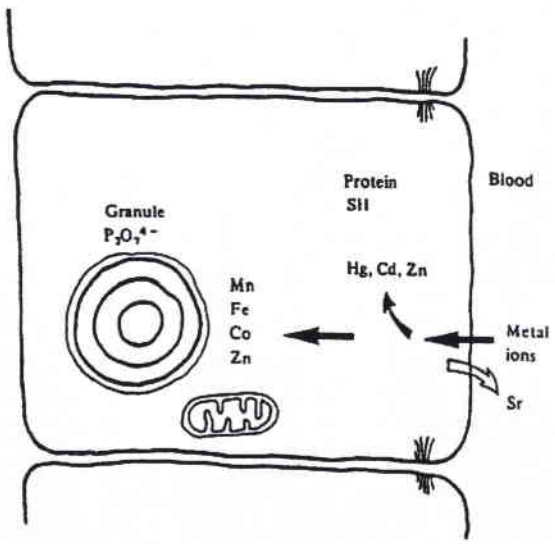


Figure 13 : Interprétation cellulaire des expériences isotopiques utilisant des métaux. Un groupe de métaux s'accumule dans le cytoplasme, mais pas dans les granules. Ceux-ci sont interprétés comme liés aux protéines de type métallothionéines. Un deuxième groupe s'accumule dans des granules de pyrophosphates tandis que quelques-uns (ex : Sr) sont rejetés par la cellule (d'après Taylor, 1995).

L'influence de l'incorporation de manganèse et de zinc sur les concentrations en calcium et magnésium des granules a fait l'objet d'un protocole expérimental et d'une approche théorique par Simkiss et Taylor (1994).

Il s'avère que l'incorporation rapide de manganèse se fait aux dépens de celle du calcium alors que le zinc, qui s'incorpore moins vite, diminue les concentrations des deux cations calcium et magnésium. Les calculs théoriques sur les substitutions ioniques, selon les principes de la chimie, corroborent ces observations.

Toutes ces observations, vis-à-vis des cellules à calcium, concernent, comme indiqué sur la figure ci-dessus, une fonction épuratrice et détoxifiante de ce type cellulaire de la glande digestive vis-à-vis d'une possible contamination métallique du sang, compartiment dans lequel il faut tenir compte du rôle important des hémocytes transportant les métaux.

III.1.2.3.5. Biominéralisation et capacité de détoxication des métaux dans la chaîne alimentaire (planche I_1)

Nott et Nicolaidou (1989a, 1989b et 1990) ont montré, en milieu marin, que les métaux, contenus dans les concrétions de phosphates de calcium et de magnésium des invertébrés planctophages ou détritivores qui sont la proie de gastéropodes carnivores, ne sont pas biodisponibles pour ceux-ci car il n'y a pas de dissolution ou une très faible dissolution (la membrane qui entoure les concrétions est elle-même conservée après passage dans le tube digestif prédateur) et se retrouvent dans les concrétions des boulettes fécales. De ce fait, lors de la progression dans la chaîne alimentaire, il y a réduction de la biodisponibilité des métaux. La biominéralisation peut être, dans ce sens, considérée comme un processus efficace de détoxication s'opposant à la bioamplification le long de la chaîne alimentaire.

Les auteurs citent ce processus entre les espèces suivantes :

Tableau 19 : Biominéralisation le long de la chaîne alimentaire chez des Mollusques marins (d'après Nott et Nicolaidou (1990))

	Proie	Prédateur	Fécès du prédateur (boulettes fécales)
Gastéropodes	***Cerithium vulgatum*** Concrétion de phosphate de calcium dans la glande digestive + métaux + P, Ca, Ni	*Murex trunculus*	Concrétions de phosphate de calcium + métaux + P, Ca, Ni
	Littorina littorea Concrétion de phosphate de calcium dans la glande digestive (taille : 1 à 2 µm) + métaux + P, Mg, Ca, K, S, Cl, Zn	*Nassarius reticulatus*	Concrétion dans les fécès provenant de *Littorina littorea* + P, Ca, Mg, Zn, (K)
Lamellibranche	***Chlamys opercularis*** Concrétion de phosphate de calcium dans le rein + métaux + P, Ca, Na, K, S, Mn, Zn	*Nassarius reticulatus*	P, Ca, Na, K, Cl, S, Mn, Zn
Crustacé	***Balanus balanoides*** Concrétion de phosphate de calcium dans les cellules du parenchyme entourant l'intestin + métaux + P, Cl, Na, K, Zn	*Nucella lapillus*	P, Ca, Na, Mg, (Cl), Zn

La composition élémentaire des concrétions est réalisée par microanalyse X en microscopie électronique à balayage (SEM) ou par microanalyse X en microscopie électronique à transmission (MET). Seuls les éléments les plus solubles (K et Cl) sont libérés, totalement ou partiellement, des concrétions de phosphate de calcium et de magnésium. Par contre, les concrétions de carbonate de calcium et de magnésium du tissu conjonctif de *Littorina littorea* sont attaquées dans le tube digestif du prédateur. Elles ne contiennent que Ca et Mg et pas d'autres métaux.

Le pH du liquide digestif est assez bas pour dissoudre les concrétions de carbonates mais pas assez pour dissoudre les phosphates. Walker *et al.* (1996) ont pu, grâce à des micro-électrodes, mesurer le pH de l'estomac (pH = 6,0), de la glande digestive (pH = 6,52) et de la glande salivaire (pH = 6,82) chez la limace *Deroceras*.

En fin de compte, les métaux incorporés aux concrétions de phosphate de calcium et de magnésium se retrouvent inchangés dans les boulettes fécales du prédateur et s'incorporent, sous cette forme, au sédiment. Une stratégie de moindre biodisponibilité des métaux lourds est ainsi réalisée et efficace, réduisant la concentration de la chaîne alimentaire.

Dallinger (1993) propose d'appliquer cette notion aux chaînes alimentaires terrestres lorsque les processus de détoxication aboutissent à la formation de concrétions ne libérant pas les métaux chez le prédateur ou le détritiphage. Par contre, la fraction de cadmium liée aux métallothionéines peut être plus facilement biodisponible pour les prédateurs car le métal est libéré de la protéine en milieu acide tel qu'il existe dans le tractus digestif des consommateurs.

III.2. Anatomie, histologie et physiologie du rein des gastéropodes

Compte tenu du nombre de travaux traitant de l'excrétion chez les invertébrés, il est utile de se référer à la revue de Bouillon (1960) comportant 101 références (depuis 1897), parmi lesquelles 28 concernent plus spécialement les mollusques, mais peu de références concernent les gastéropodes pulmonés.

La nature de l'excrétion azotée, chez les gastéropodes, est variable et semble dépendre en grande partie du milieu dans lequel ils vivent.

- Les gastéropodes marins sont ammonotéliques. Le produit final de l'excrétion azotée est l'ammoniaque ;
- Les gastéropodes d'eau saumâtre sont intermédiaires entre l'ammonotélie et l'uricotélie ;
- Les gastéropodes terrestres sont uricotéliques. Le produit final de l'excrétion azotée est l'acide urique ;
- Les gastéropodes d'eau douce présentent une grande diversité, par exemple, le rein de la Paludine est riche en acide urique, mais *Hydrobia jenkensi* en contient peu. Cette dernière espèce n'aurait envahi que récemment les eaux douces (1900).

III.2.1. Le rein de *Helix pomatia* (Bouillon, 1960) (figure 14)

Nous retiendrons de ce travail concernant la première étude ultrastructurale des cellules rénales de mollusques (*Helix pomatia*, gastéropode pulmoné terrestre) les données essentielles suivantes illustrées par certains clichés de l'auteur.

L'appareil excréteur est formé de deux parties :

- Le rein, à parois fortement plissées, désigné « rein d'élaboration »,
- Le canal excréteur qui longe d'abord le rein du côté externe du péricarde (uretère primaire ou vessie), puis longe le rectum (uretère secondaire) pour déboucher au côté de l'anus, au niveau du pneumostome.

Le rein est constitué d'un sac dont la paroi interne est fortement plissée, avec la formation de lamelles laissant, au centre de l'organe, une lumière rénale. Une lamelle rénale est formée par l'accolement de deux feuillets de cellules excrétrices, entre lesquelles, on distingue des sinus sanguins, des muscles lisses, du tissu conjonctif. Dans le sinus sanguin, des cellules contiennent des inclusions riches en lipides. Les auteurs les considèrent comme étant des hémocytes chargés des produits d'excrétion. Les déchets arrivent au rein, uniquement par voie sanguine, et sont éliminés sous forme d'inclusions puriques.

Chez les pulmonés terrestres, le péricarde n'intervient pas dans la fonction rénale. La communication réno-péricardique est petite.

L'épithélium rénal est formé de cellules prismatiques avec une bordure en brosse peu développée, avec, dans la région apicale, une volumineuse vacuole contenant une ou plusieurs concrétions cristallines. Le noyau, riche en chromatine, est refoulé vers la base. Le cytoplasme apical est peu épais et contient des mitochondries, des granules P.A.S. positifs (mucopolysaccharides) ainsi que des granules contenant des phosphatases. Le cytoplasme basal contient des mitochondries ovalaires, des inclusions mucopolysaccharidiques et des granulations volumineuses, très osmiophiles, désignées « granules jaunes », constituées de lipofuscines qui sont en fait un produit d'oxydation des phospholipides à différents stades d'oxydation. Selon Turchini *in* Bouillon (1960), certains produits terminaux formeraient, dans la vacuole apicale, le substratum des concrétions cristallines. Selon Bouillon (1960), ces granules proviennent d'une évolution de certaines mitochondries, sont expulsés de la cellule et ne participent pas à la constitution des concrétions.

Les concrétions ont fait l'objet d'une description depuis 1924. Des anneaux concentriques (de 3 à 7) entourent un ou plusieurs noyaux. Le nombre d'anneaux augmente avec la croissance de la concrétion. Dans certain cas, la vacuole apicale peut contenir plusieurs inclusions qui pourraient résulter du fractionnement d'une concrétion en fin de constitution.

En vie active, les concrétions sont de toutes tailles. Pendant l'hibernation, la taille s'uniformise.

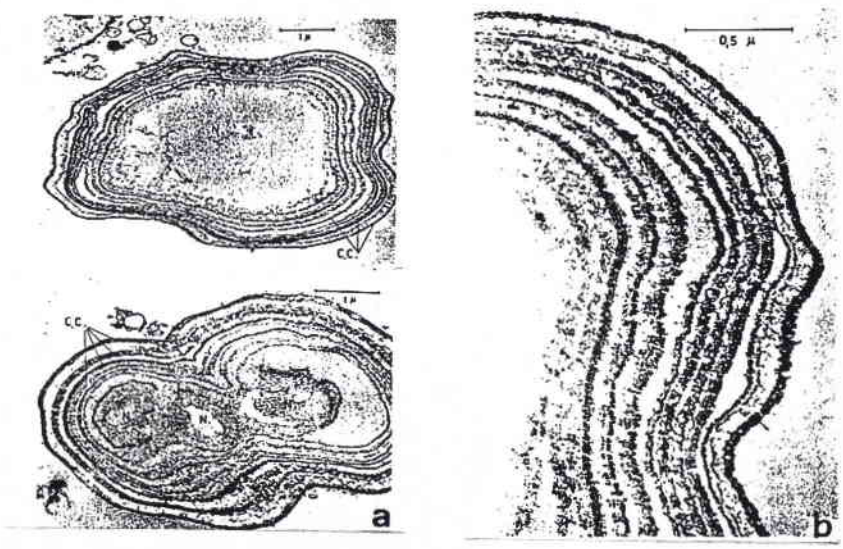


Figure 14 : Concrétions rénales de *Helix pomatia* selon Bouillon (1960)
a : Faible grossissement montrant le noyau central (N) et les couches concentriques (c.c.) ;
b : Grossissement supérieur montrant l'électrondensité des couches concentriques.

L'expulsion se fait par déchirure de la membrane apicale. Le devenir ultérieur de la cellule fait l'objet d'hypothèses, à savoir une destruction ou une reconstitution. L'observation de cellules à grande vacuole vide oriente Bouillon (1960) vers la deuxième hypothèse. Par ailleurs, lors de l'hibernation, les cellules rénales se résorbent en un syncytium bourré d'inclusions excrétrices, de débris cellulaires et de mitochondries.

Les concrétions sont d'un blanc brillant en lumière réfléchie, biréfringentes en lumière polarisée. Les recherches antérieures à Bouillon (1960) les considèrent comme constituées, soit seulement d'acide urique, soit d'acide urique et de guanine. Après la réalisation de tests histochimiques à la murexide, Bouillon (1960) souligne la nature complexe de ces concrétions. Les anneaux résulteraient de dépôts successifs de composés puriques avec probablement de la guanine. Selon Peschen (1939), il y aurait 20% de guanine dans les reins d'*Helix pomatia*, le reste étant de l'acide urique. D'autres auteurs (Delaunay, 1931) signale la présence d'urée chez *Helix pomatia* et l'excrétion de *Arion ater* s'effectuerait presque exclusivement sous cette forme. Le noyau des concrétions serait riche en sels de calcium. La nature exacte du noyau central demeure encore inconnue mais selon Bouillon (1960), il est peu probable que les pulmonés terrestres excrètent massivement des sels de calcium normalement retenus et mobilisés pour l'édification de la coquille. Les concrétions de *Helix pomatia* présenteraient une analogie avec les concrétions d'urate des tubes de Malpighi de l'insecte *Gryllus domesticus* dont les granules sont formés de couches concentriques alternées d'urate de calcium et d'acide urique avec des traces d'un mucopolysaccharide (Berkaloff, 1959). Des couches concentriques, enrichies en lipides soudanophiles et très osmiophiles (couches sombres) alternent avec des couches d'acide urique à faible contraste en observation par microscopie électronique à transmission. La nature des lipides est encore inconnue. Enfin, un mucopolysaccharide acide se localise dans la couche la plus périphérique et autour du noyau central.

L'origine et la nature de l'ébauche du noyau central sont discutées par Bouillon (1960). Chez *Gryllus domesticus*, Berkaloff (1958) montre une formation dans une vacuole centrale avec un dépôt de couches successives d'acide urique et d'urate.

Enfin, la membrane basale présente de nombreuses invaginations, augmentant la surface d'échange, caractéristiques des cellules filtrant le milieu intérieur.

Le canal excréteur du rein est formé par l'uretère primaire appelé également poche néphridienne ou vessie. Ce canal excréteur n'est pas un simple canal mais un rein de résorption et de sécrétion ; il joue un rôle primordial dans les transferts d'eau et de divers électrolytes de l'urine vers le sang. En effet, les lamelles de la poche néphridienne sont constituées de deux types de cellules :

- Des cellules pyramidales ciliées, basophiles, entraînant vers l'extérieur les produits d'excrétion
- Des cellules à bâtonnets qui ont une fonction d'absorption et qui possèdent des microvillosités apicales très développées (bordure en brosse) ainsi que des invaginations de la membrane basale, créant des espaces extracellulaires pénétrant sur presque toute la hauteur de la cellule. Il y a de nombreuses mitochondries qui se placent entre les invaginations. Le noyau est localisé vers le pôle apical. Le cytoplasme ne présente ni ergastoplasme ni appareil de Golgi chez les cellules âgées car il semble y avoir un cycle cellulaire.

Selon Bouillon (1960), ces cellules jouent un rôle dans la résorption et le transfert d'eau et d'électrolytes entre les substances excrétées et le liquide sanguin. L'activité phosphatasique alcaline est importante. L'étude en microscopie électronique à transmission montre que les bâtonnets proviennent de l'association des mitochondries et des invaginations de la membrane basale. L'uricotélisme et l'efficacité des cellules de résorption de la poche néphridienne constituent des adaptations à la vie terrestre pour des animaux qui ont la possibilité de perdre, par évaporation et en une heure, jusqu'à 16% du poids initial (*Limax variegatus*). Les sinus sanguins sont riches en hémocytes et très riches en inclusions lipidiques.

L'uretère secondaire présente les mêmes types cellulaires plus des mucocytes élaborant des produits d'excrétion de type mucopolysaccharides acides.

La lumière de la poche néphridienne contient, outre les concrétions, des granules et des déchets cellulaires provenant de la destruction de la région apicale des cellules rénales lors de la libération des concrétions.

A partir de cette base anatomique et histologique réalisée chez *Helix pomatia*, nous citerons des compléments ou des différences signalées par d'autres auteurs pour d'autres espèces, à savoir Banga et Boer (1969) pour *Lymnaea stagnalis*, Skelding (1973) pour *Achatina achatina*, Martoja (1975) pour *Pomatias* (*Cyclostoma*) *elegans*, Diaz Cosin (1977) pour *Theba pisana*, Sanchez *et al.* (1980) pour *Helix aspersa* et Angulo et Moya (1989) pour *Arion ater*.

III.2.2. Le rein d'*Achatina achatina* (figure 15)

Selon Skelding (1973), les néphrocytes de l'Achatine ne ressemblent pas aux podocytes des glomérules rénaux de vertébrés. La cellule excrétrice est en contact, du côté basal, avec un ultra-filtrat de sang et, du côté apical, avec l'urine primaire. La lame basale (*Lamina*) est perméable à la ferritine (100 A°)et imperméable à l'or colloïdal (80 à 240 A°) ou à l'hémocyanine. Les liquides passent du conjonctif à la lumière rénale en circulant entre les néphrocytes et peut-être au travers de pores des jonctions cloisonnées (Septate junctions ou desmosomes septés). L'auteur explique les passages d'eau et de solutés par les différences de pression osmotique. La capsule du tissu conjonctif qui emballe le rein est épaissie dans la partie ventrale. Elle contient des vaisseaux sanguins, des fibres musculaires, des fibrilles de collagène, des amoebocytes, des fibres nerveuses, des « pore cells » et des fibroblastes. Les néphrocytes, d'une hauteur de 10 à 15 µm, présentent une vacuole avec une seule concrétion formée de couches concentriques se colorant au vert lumière. En microscopie électronique à transmission, le noyau central est amorphe et les anneaux sont osmiophiles. La membrane apicale présente des microvillosités et des vésicules de pinocytose en formation. Le cytoplasme apical, peu épais, présente des mitochondries, du réticulum endoplasmique lisse avec des vésicules et des tubules, des vacuoles. L'appareil de Golgi, proche du noyau, produit des lysosomes primaires fusionnant ensuite avec des hétérophagosomes pour former des hétérolysosomes. Des corps résiduels contenant des figures myéliniques sont nombreux dans le cytoplasme basal. Ils sont probablement libérés dans l'urine en même temps que les concrétions. Chez l'Achatine, le contact entre la concrétion et la membrane vacuolaire existe et le cytoplasme contient de nombreuses vésicules qui semblent contribuer au grossissement de la concrétion. Le cytoplasme basal contient du glycogène en rosettes (∅ 800 A°), des gouttelettes lipidiques (∅ 1 µm), des mitochondries parfois branchues, un réticulum très vésiculeux et des péroxysomes (∅ 0,8 à 1,2 µm). Ceux-ci sont sphériques avec une membrane unique. Ils contiennent un floculum granuleux et un corps dense ou nucléoïde central. Ils sont associés avec le réticulum endoplasmique qui forme une enveloppe en croissant.

Selon l'auteur, des péroxysomes de même aspect existent chez *Helix pomatia* et *Helix aspersa*. La membrane plasmique basale présente des invaginations dans le cytoplasme avec la création d'espaces extracellulaires. Les néphrocytes adjacents sont reliés vers la lumière rénale par des « septates desmosomes » ou desmosomes cloisonnés entourant totalement la cellule. Les membranes latérales présentent des « *maculae* ». De l'eau, des ions et des molécules, de faible poids moléculaire (16.000 à 19.000 Da), de l'espace inter-néphrocytaire, passent dans l'urine primaire à travers des pores des desmosomes cloisonnés. La *lamina* basale forme une couche sous-épithéliale continue d'une épaisseur de 600 à 900 A. C'est le lieu d'une ultrafiltration. La *lamina* des parois des capillaires, fenestrés ou non, jouent déjà un rôle dans l'ultrafiltration en retenant les protéines sanguines (hémocyanine). Les vésicules de pinocytose, à l'apex du néphrocyte, prouvent qu'il y a une fonction de réabsorption (eau, ions, acides aminés). L'uretère primaire est un lieu de réabsorption. Les cellules présentent un Golgi important produisant des lysosomes évoluant en autophagosomes et hétérophagosomes. L'activité des cellules urétérales établit un gradient osmotique entre l'urine et le sang.

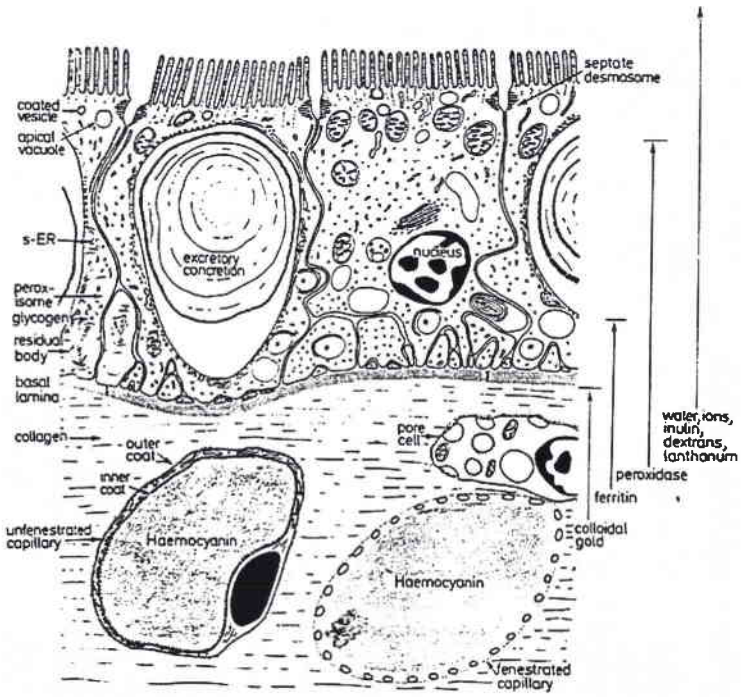


Figure 15 : Synthèse explicative de la filtration par le rein chez les pulmonés terrestres (traduit de Skelding, 1973).

Le sang est contenu dans les capillaires imperméables à l'hémocyanine. L'ultrafiltration du sang passe dans le tissu conjonctif. Les enveloppes extracellulaires des capillaires sanguins sont responsables de la rétention des grosses particules dans leur lumière. L'ultrafiltration contient de grosses particules qui sont retardées dans leur passage vers le néphrocyte par les fibres de collagène. La *lamina* des néphrocytes est imperméable à l'or colloïdal, mais perméable à la ferritine, à la peroxydase et au lanthane. La ferritine ne dépasse pas l'espace intercellulaire au 1/3 inférieur de la hauteur de la cellule. La peroxydase est bloquée par les desmosomes septés. Il est proposé que l'eau, des ions, l'inuline et des molécules de poids moléculaire faible (PM : 16.000 à 19.000) passent dans l'urine primaire par l'intermédiaire de pores de la jonction septée.

Les apports majeurs de Skelding (1973) concernent la fonction des péroxysomes dans l'excrétion azotée. L'auteur, constatant que ces organites sont absents du cœur, de l'épithélium péricardial et urétéral, des amoebocytes et des « pores cells », émet l'hypothèse qu'ils interviennent dans la synthèses des urates constituant ultérieurement les concrétions. Le métabolisme des purines donne chez les gastéropodes et, en bout de chaîne, de l'acide urique avec comme intermédiaire l'oxydation de la xanthine en hypoxanthine puis de l'hypoxanthine en acide urique chez *Helix pomatia* (Brioteux et Florkin, 1962 et 1964), et chez *Otala lactea* (Lee et Campbell, 1965). Skelding (1973) émet l'hypothèse que la xanthine oxydase est présente avec des catalases dans le péroxysome. L'acide urique serait synthétisé dans l'environnement alcalin du péroxysome, dans lequel il est soluble, puis serait transporté par le réticulum endoplasmique lisse (chaque péroxysome est emballé dans une capsule du réticulum endoplasmique lisse) vers la vacuole apicale du néphrocyte où il précipiterait, en présence soit d'une acidification du milieu, soit de cations, probablement le calcium. Selon Florkin et Duchâteau (1943), les tissus de *Helix pomatia* ne contiennent pas d'uricase, d'allantoïnase et d'allantoïcase nécessaires à la dégradation de l'acide urique. Cependant, Skelding (1973) rappelle que selon de Duve et Baudhuin (1966), la présence du nucléoïde ou corps dense central du péroxysome est toujours associée avec une activité urate-oxydase. De ce fait, il serait possible que les escargots puissent poursuivre la dégradation de l'acide urique.

III.2.3. Le rein de *Pomatias elegans* (Martoja, 1975) (figure 16)

Les études de Martoja (1975) sur le rein du prosobranche *Pomatias elegans* enrichissent la discussion sur l'uricotélisme chez cette espèce dont l'anatomie est particulière car il existe en plus du rein normal, sans toutefois d'uretère (pas de cellules spécialisées dans la réabsorption) un rein d'accumulation désigné comme la « glande à concrétions » située dans le tissu conjonctif. Les néphrocytes du rein normal sont de grandes cellules de 35 µm de haut et de 15 à 20 µm de large avec une grande vacuole apicale contenant une inclusion. L'auteur préfère le terme d'inclusion à celui de concrétion car on ne discerne pas de strates comme dans les concrétions de la glande à concrétions. L'analyse spectrographique met en évidence la présence de phosphate de calcium avec d'autres éléments traces (P, Ca, Mn, Mg, K, S, Zn, Fe et Cu). Il n'y a ni acide urique, ni xanthine. Des corps résiduels variés, des débris membranaires, se trouvent dans la vacuole mais pas d'acide urique, d'ailleurs l'étude en microscopie électronique à transmission ne met pas en évidence la présence de péroxysomes dans le cytoplasme. La présence des inclusions est variable au cours des saisons. En avril, après le réveil vernal, les inclusions sont rares ; en août, tous les néphrocytes contiennent une inclusion ; en octobre, il y a une libération des inclusions avec une dégénérescence de l'épithélium. Un jeûne pendant l'activité entraîne des modifications des inclusions (moins de calcium, plus de soufre présent dans des molécules protéiques).

Les autres caractéristiques du néphrocyte sont la grande quantité de pédicelles basaux non associés à des mitochondries, un important réseau de réticulum endoplasmique lisse, des figures myéliniques provenant de l'involution de mitochondries avec la formation d'autophagolysosomes, des dictyosomes proches de la vacuole.



Figure 16 : Ultrastructure du rein de *Pomatias elegans* selon Martoja (1975).
La vacuole (v contient une inclusion (i) qui, contrairement à la concrétion des pulmonés, ne présente pas de couches concentriques.

Selon Martoja (1975), l'acide urique détecté à partir d'animaux entiers provient de la glande à concrétion et non du rein. La forme d'accumulation dans la glande à concrétions est l'urate de potassium. Dans le néphrocyte et selon Martoja (1975), les échanges sont importants au niveau des pédicelles puis, sans apport d'énergie le réticulum endoplasmique lisse assure le transport à travers la cellule. Il existe un renouvellement fréquent des organites mitochondriaux. Par contre, le manque de bordure en brosse montre que la réabsorption d'éléments déjà parvenus dans la cavité rénale est, au contraire, très faible. L'absence d'uretère, lieu de réabsorption d'eau, est sans doute compensée par la glande à concrétions avec des mécanismes différents. Les concrétions de cette glande sont de nature complexe avec la présence du précurseur de l'acide urique, la xanthine, et du carbonate de calcium.

III.2.4. Le rein de *Theba pisana* (figure 17)

Les études de Diaz Cosin (1977) sur la structure rénale de *Theba pisana* fournissent une revue exhaustive des travaux antérieurs. La vacuole excrétrice de chaque néphrocyte contient une concrétion avec un centre et des couches concentriques. Des purines sont mises en évidence de manière dispersée dans le liquide vacuolaire et dans la concrétion qui contient des sels de calcium. Le néphrocyte présente des microvillosités apicales avec des figures de pinocytose d'un diamètre de 0,15 à 0,2 µm. Le cytoplasme apical contient des corps multi-vésiculaires et des hétérophagolysosomes en dérivant. Les dictyosomes sont formés de 4 à 5 citernes générant des vésicules golgiennes. Le réticulum est principalement lisse et concentré dans la partie inférieure. Le glycogène, abondant dans la zone moyenne, apporte l'énergie probablement exigée pour la formation des concrétions. Du réticulum endoplasmique rugueux est localisé dans la partie moyenne. Les péroxysomes, avec un nucléoïde central rhomboïde, sont nombreux et associés à du réticulum endoplasmique lisse ; ils sont de forme arrondie ou ovalaire (∅ 0,5 à 0,8 µm), limités par une membrane. Selon l'auteur, les péroxysomes interviennent dans le métabolisme des purines avec une synthèse d'urates formant la concrétion.

De nombreux granules fibreux cytoplasmiques proviennent d'une accumulation, dans le réticulum endoplasmique lisse, sans relation avec des mitochondries, de produits n'intervenant pas dans la formation des concrétions. La concrétion se forme à partir de vésicules de corps membranaires et de substance amorphe. Le néphrocyte réabsorbe des métabolites de l'urine primaire et produit du glycogène, réserve énergétique de l'organe.

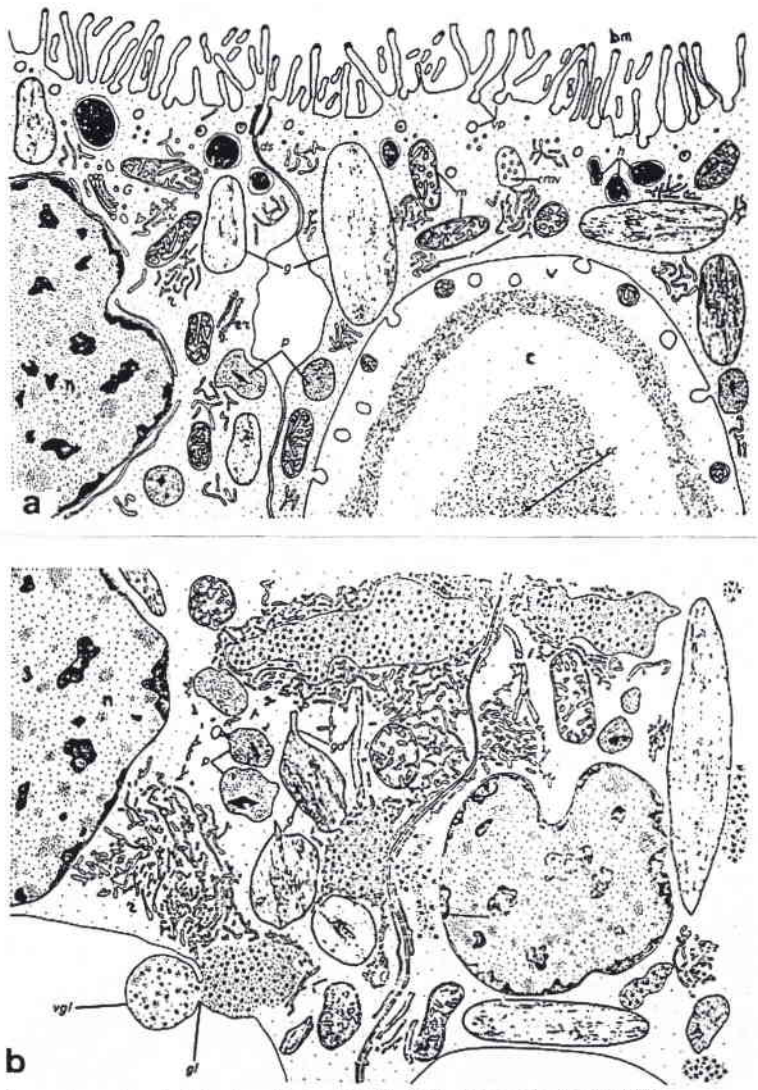


Figure 17 : Ultrastructure du rein de *Theba pisana* traduit de Diaz Cosin (1977).
a : Partie apicale de la cellule rénale ;
b : Partie médio-basale de la cellule rénale.
Légende : bm : microvillosités apicales ; c : concrétion ; c.c. : centre de la concrétion ; cmv : corps multi-vésiculaire ; ds : desmosome septé ; g : granule cytoplasmique ; G : golgi ; gl : glycogène ; h : hétérophagolysosome ; m : mitochondrie ; n : noyau ; p : péroxysome ; r : REL ; rr : REG ; v : vacuole excrétrice ; vgl : déversement de glycogène dans la vacuole ; vp : vésicule de pinocytose

III.2.5. Le rein d'*Helix aspersa aspersa* (figure 18)

Sanchez *et al.* (1980) ont décrit l'ultrastructure du rein de *Helix aspersa* et discuté des mécanismes physiologiques de l'excrétion rénale. Par rapport aux études ultrastructurales déjà citées pour d'autres espèces de gastéropodes, deux caractéristiques sont soulignées :

- Le néphrocyte de *Helix aspersa* montre des figures d'endocytose du côté des invaginations de la membrane cytoplasmique basale,
- L'existence d'un système vacuolaire périnucléaire spécifique à l'espèce avec des liaisons de la membrane nucléaire avec le réticulum endoplasmique lisse.

Comme chez les autres gastéropodes, le néphrocyte repose sur une basale très fine qui le sépare d'un tissu conjonctif comportant des fibres musculaires. Les néphrocytes de la base des lamelles sont des cellules rénales jeunes avec des figures de mitoses dans les cellules indifférenciées de remplacement. Cette observation est la première confirmant l'hypothèse de Diaz Cosin (1977) chez *Theba pisana*. Les néphrocytes de la partie moyennes de la lamelle sont des cellules à noyau plus ou moins central avec une bordure en brosse bien développée. La pointe des lamelles présente de grandes vacuoles avec des concrétions (figure 18a) et des villosités altérées en voie de disparition de type holocrine. Des noyaux se trouvent dans la lumière rénale. Au cours du vieillissement, des citernes concentriques du réticulum endoplasmique évoluent (figures 18b et 18c) avec une formation de figures myéliniques autour d'un centre plus électrondense et amorphe inclus dans une substance fibrillaire. La présence d'urate de sodium est rapportée.

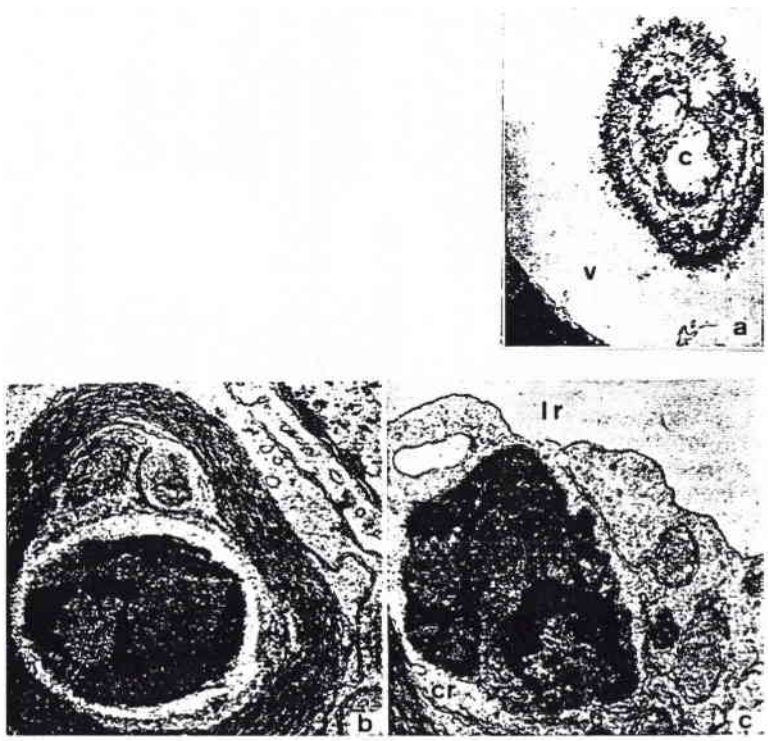


Figure 18 : Ultrastructure d'*Helix aspersa aspersa* interprété selon Sanchez *et al.* (1980).
a : Concrétion (c) dans la vacuole (v) ;
b : Stade intermédiaire du processus de maturation du matériel d'excrétion. La zone centrale est constituée de matériel électrondense au sein d'une matrice fibrillaire (G x 43.500) caractéristique des corps résiduels (figure myélinique) ;
c : Stade final de libération d'un corps résiduel (cr) vers la lumière rénale (lr) (G x 43.500)

Ces corps résiduels se dirigent vers le pôle apical du néphrocyte, se libèrent des structures myéliniques et sont évacuées dans la lumière rénale avec quelques autres organites cytoplasmiques. D'autres vacuoles se dirigent vers le pôle apical et par coalescence, forment la grande vacuole en même temps qu'il y a diminution des microvillosités. De nombreux péroxysomes à nucléoïde rhomboïde sont proches des figures concentriques des citernes du réticulum endoplasmique lisse. Le réticulum endoplasmique granuleux est moins abondant que le réticulum endoplasmique lisse. Du glycogène en rosette est abondant. Des mitochondries en dégénérescence donnent également lieu à des figures myéliniques (autophagolysosomes) avec la formation de lipofuscines. Les jonctions inter-néphrocytaires sont de type « zonula adherens ».

Au niveau fonctionnel, les auteurs rappellent que chez les gastéropodes aquatiques, la paroi du cœur est le lieu d'ultrafiltration de l'urine primaire gagnant le sac rénal par le canal réno-péricardique cilié et fonctionnel alors que chez les gastéropodes terrestres, ce canal est fortement rétréci et peu fonctionnel. Dans ce cas, l'ultrafiltration est assurée par l'épithélium rénal lui-même. L'association des invaginations basales avec des vésicules de pinocytose et une grande quantité de lysosomes militent pour l'existence de phénomènes d'endocytose. Comme les auteurs précédemment cités, Sanchez *et al.* (1980) considèrent que l'élément prépondérant excrété est l'acide urique, ceci conformément à l'adaptation à la vie terrestre des gastéropodes. Par ailleurs, une discussion existe sur la possibilité de synthétiser de l'urée lors du métabolisme de l'ornithine et comme voie alternative non toxique, de l'ammoniaque. L'acide urique est excrété sous forme de petits granules ou de cristaux par le pôle apical du néphrocyte. La fonction des lamelles rénales est comparable à celle de la portion tubulaire du tube urinaire des vertébrés supérieurs. La présence d'éléments musculaires dans les lamelles favorise les mécanismes d'excrétion lors de leur contraction. Le réseau de vésicules péri-nucléaires qui est un prolongement de la membrane nucléaire externe et communique avec le réticulum endoplasmique lisse doit être un lieu de métabolisme actif. Sanchez *et al.* (1980) pensent que c'est le lieu d'une synthèse importante des structures éliminant l'acide urique. Par ailleurs, l'existence de vacuoles sans concrétions laisse à penser qu'il existe un mécanisme d'élimination de l'eau et de solutés (électrolytes).

Helix aspersa aspersa (Clark et Rudolph, 1979) de même que *Limax flavus* (Horne et Beck, 1979) excrètent des purines (xanthine, hypoxanthine et guanine) ce qui traduit, chez les pulmonés terrestres, une caractéristique différente des autres animaux uricotéliques avec comme conséquence l'impossibilité de réutiliser ces bases pour le métabolisme des nucléotides.

Selon Charrier et Daguzan (1980b) *Helix aspersa aspersa* est un organisme uricotélique qui ne possède pas tous les enzymes nécessaires à la dégradation de l'acide urique en urée. Lors du catabolisme des bases puriques, allantoïne et allantoïcase sont absentes.

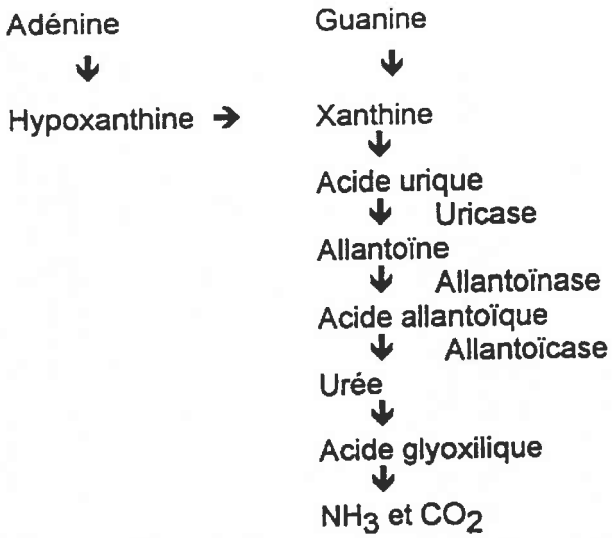


Figure 19 : Schéma du catabolisme nucléique des bases puriques (selon Gomot, 1994)

De même chez *Helix pomatia* et *Euparypha pisana*, l'urée proviendrait en partie de la dégradation de l'arginine d'origine exogène (arginine → urée + ornithine).

Selon Bishop *et al.* (1983), chez *Helix aspersa aspersa*, *Helix pomatia* et *Otala* 90 à 100% de l'azote des excrétas du rein sont représentés par l'acide urique, la guanine et la xanthine ; l'acide urique représentant 80% de la perte journalière d'azote chez les animaux en activité.

Selon Daguzan (1985b), l'acide urique favoriserait la conservation de l'eau car ses teneurs augmentent dans les escargots en estivation. L'acide urique peut représenter 2,5% de la matière sèche du corps entier.

Gomot (1994) discute, lors de l'établissement du bilan azoté de *Helix aspersa maxima*, de la part prise par l'azote non protéique concentré dans le rein et dont l'acide urique représente seulement l'un des constituants. Cet auteur émet l'hypothèse de la présence de composés de nature encore inconnue méritant des recherches complémentaires orientées vers la quantification des bases puriques et pyrimidiques, celle des réserves énergétiques.

III.2.6. Le rein d'*Arion ater* selon Angulo et Moya (1984-1989) (figure 20a)

Nous terminerons cette revue par l'étude ultrastructurale réalisée par Angulo et Moya (1984 et 1989) chez la limace *Arion ater*. Le rein présente des néphrocytes à cellules prismatiques de 15 à 30 µm de hauteur, à vacuoles supra-nucléaires et à bordure en brosse. Ils accumulent certains métabolites et des métaux lourds dans des concrétions éliminées vers la lumière rénale. Chez *Arion ater*, les concrétions sont similaires à celles d'autres pulmonés, constituées d'urates, de protéines et de mucopolysaccharides. La vacuole peut être vide ou contenir une ou plusieurs concrétions d'un diamètre de 3 à 7 µm avec une alternance de couches granulaires et de couches fibrillaires. La couche externe est toujours de faible densité. Des corps résiduels avec des systèmes membranaires, des granules denses, des lipides et des substances amorphes se trouvent au contact de la vacuole et s'y déchargent contribuant ainsi à la formation de la concrétion. Les corps résiduels dérivent des lysosomes. Ces granules, désignés du 1er type, contiennent des glyco-aminoglycanes, des lipides neutres, des phospholipides, des lipofuscines, des phosphatases acides et des protéines. Des globules lipidiques jouxtent la membrane vacuolaire et peuvent pénétrer dans la vacuole. Des citernes de réticulum endoplasmique lisse existent à la périphérie de la vacuole à concrétion. Elles sont rarement en connexion avec la vacuole, avec éventuellement la formation d'un réseau de

membranes à l'intérieur de la vacuole. La membrane vacuolaire forme des invaginations en forme de bulle dont le matériel participe aussi à la constitution des concrétions. Une relation entre les vésicules d'endocytose du cytoplasme apical (coated vésicules avec Ca^{2+}) et les bulles de la membrane vacuolaire est établie. Des phosphatases alcalines se trouvent à la périphérie de la vacuole. Des corps membranaires, formés dans l'espace intercellulaire, proviennent de la sécrétion de vésicules et peuvent se décharger dans la vacuole à concrétion. Chez *Viviparus viviparus*, l'achèvement des concrétions à lieu dans la lumière rénale (Andrews, 1979) et chez *Marisa cornuarietis*, il y aurait pinocytose de purines dans la zone basale du néphrocyte (Andrews, 1976).

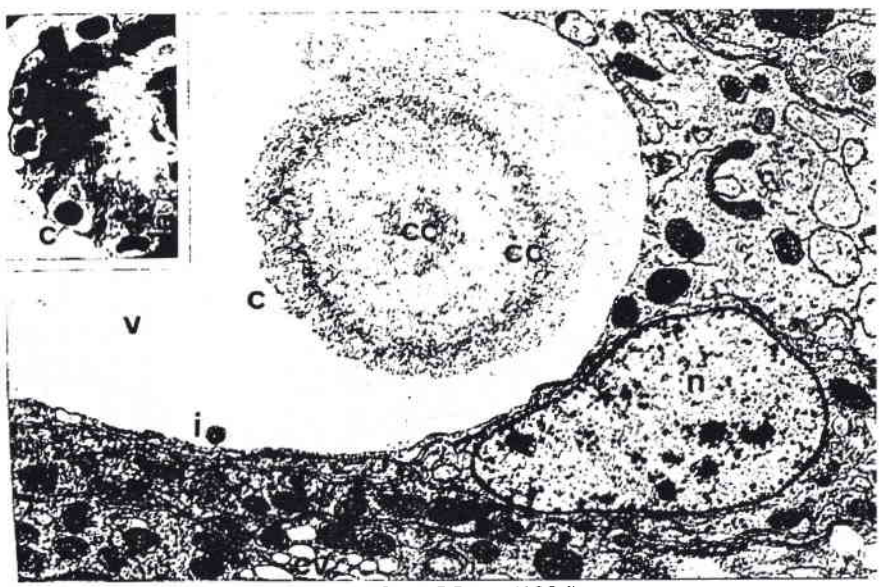


Figure 20a : Néphrocyte de *Arion ater* selon Angulo et Moya (1984)
Légendes : c : concrétion (3 à 7 µm) ; cc : couches concentriques : cv : citerne périnucléaire ; i : invagination en bulle de la membrane vacuolaire ; n : noyau ; v : vacuole excrétrice.

Le tableau 20 (a à c) résume les données essentielles des connaissances sur le rein des gastéropodes.

III.2.7. Existence d'un cycle de sécrétion des néphrocytes

Selon Bouillon (1960), les pulmonés terrestres éliminent leurs produits d'excrétion sous forme solide à des intervalles de 15 jours à trois semaines.

Pendant l'hibernation, il y a de grandes modifications anatomiques et pendant cette période, le rein d'*Helix pomatia* peut accumuler jusqu'à 810 mg d'acide urique, soit les ¾ de son poids. L'estivation peut être de très longue durée (5 ans ; Comfort, 1957). Selon Banga et Boer (1969) chez *Lymnaea stagnalis* et Skelding (1973) chez l'Achatine, les néphrocytes évoluent d'un stade jeune à la base des lamelles, vers un stade mature à l'apex de celles-ci, avec un grossissement des concrétions. Les jeunes néphrocytes présentent un gros noyau central, pas de concrétion et pas de dérivés des lysosomes. Leur membrane plasmique montre des microvillosités dispersées. Les néphrocytes jeunes remplacent les néphrocytes âgés en fin de vie.

Diaz Cosin (1977) décrit l'évolution cyclique des néphrocytes de *Theba pisana* (*Cf* figure 20b, 1 à 6) à partir du stade de repos jusqu'au stade de vie active. Contrairement à d'autres auteurs, Diaz Cosin (1977) n'observe pas de syncytium pendant la phase de dégénérescence.

Certaines cellules libèrent seulement leur concrétion (type aprocrine), d'autres sont détruites entièrement (type holocrine) libérant, dans la lumière rénale, les concrétions et des débris cellulaires.

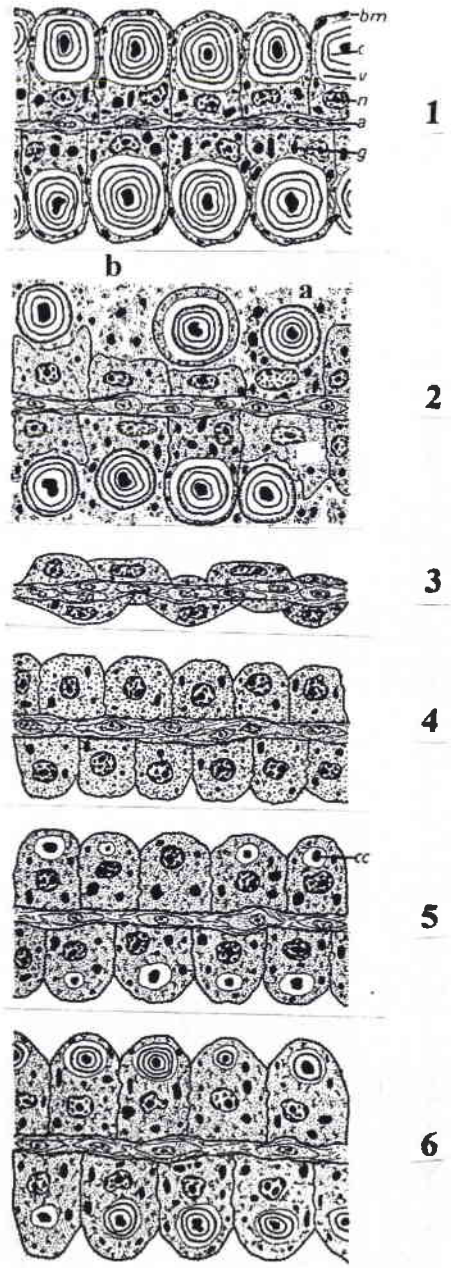


Figure 20b : Evolution cyclique des néphrocytes de *Theba pisana* (traduit de Diaz Cosin, 1977). Légendes: a : amœbocyte ; bm : microvillosité apicales ; c : concrétion ; cc : centre de la concrétion ; v : vacuole excrétrice ; n : noyau ; g : granule cytoplasmique.
1 : Cellules rénales au repos avec des de grandes concrétions et de nombreux granules cytoplasmiques ; 2 : Libération des concrétions et des granules cytoplasmiques lors de la fourniture d'eau. Cellules de type holocrine (a) ou apocrine (b) ; 3 : Cellules rénales résiduelles avec cytoplasme peu abondant ; 4 : Croissance des cellules rénales avec noyau apical et absence de vacuoles excrétrices ; 5 : Apparition des vacuoles excrétrices et formation des centres des concrétions ; 6 : Augmentation du volume des vacuoles excrétrices et formation des couches concentriques des concrétions autour de leur partie centrale.

Tableaux 20a, b et c : Résumé des données essentielles des connaissances sur le rein des gastéropodes

t20a

	Espèces	Auteur	Capillaires sanguins	Lame basale « *Lamina* »	Fibres musculaires	Hémocytes	Pore Cells	Conjonctif et sinus sanguin	Néphrocytes des lamelles rénales	Espace internéphrocytaire	Noyau	Membrane plasmique basale	Membrane cytoplasmique latérale
Gastéropodes pulmonés	*Helix pomatia*	Bouillon, 1960			+			Hémocytes ++	F		Basal	Invaginations +++	
	Achatina achatina	Skelding, 1973	Partie ventrale ++ du rein (⇲), capillaires sanguins, collagène, ultrafiltration, fibres nerveuses	Ultrafiltration	+	+	+		F (10 à 15 µm)	Passage d'un ultrafiltrat qui peut traverser les « septate junctions »		Invaginations +++	« Septate junction » « maculae »
	Theba pisana	Diaz Cosin, 1977							F		Evolution avec vieillissement		
	Helix aspersa aspersa	Sanchez *et al.*, 1980		Très fine, ultrafiltration	+			Fibres musculaires favorisant l'excrétion	M et F		Mitoses dans stade jeune (J). Central type M et basal type F	Invagination +++ endocytose puis association à des lysosomes	« Zonula adherens »
	Arion ater	Angulo et Moya, 1984 et 1989							F (15 à 30 µm)	Corps membranaires pouvant se décharger dans la vacuole apicale			
	Lymnaea stagnalis	*Banga et Boer, 1969*							Evolution des néphrocytes J→M→F				
	Paludine	*In* Bouillon, 1960											
	Hydrobia jenkensi	*In* Bouillon, 1960											
G. Pr.	*Pomatias elegans*	Martoja, 1975							F (35 µm)			Invaginations +++	

t20b

	Espèces	Auteur	Membrane cytoplasmique apicale	Mitochondries	Golgi, lysosomes	Peroxysomes	REL	REG	Glycogène
Gastéropodes pulmonés	*Helix pomatia*	Bouillon, 1960	Bordure en brosse	Apicales et périnucléiares	Granules jaunes, lipofuscines (origine : mitochondrie)	++ *in* Skelding, 1973			
	Achatina achatina	Skelding, 1973	Microvillosités, pinocytoses ++, réabsorption	Apicales ++ et dégénérescence en grains lipidiques	Périnucléaire, lysosomes + hétérolysosomes, figure myélinique. Expulsion dans la lumière rénale	0,8 à 1,2 µm ++ avec nucléoïdes, association avec REL, synthèse des urates à partir des purines (pH basique)	Apical et dispersé, vésicules péri-vacuolaires et au pôle basal		++ cytoplasme basal
	Theba pisana	Diaz Cosin, 1977	Pinocytose (0,15 à 0,2 µm)		Corps multivésiculaires au pôle apical, dictyosomes	++ associés au REL (0,5 à 0,8 µm), synthèse des urates à partir des purines	+++ dans la partie basale, granules fibreux cytoplasmiques	+ partie moyenne de la cellule	+++ réserve énergétique
	Helix aspersa aspersa	Sanchez *et al.*, 1980	Bordure en brosse très développée des cellules de type M. Bordure en brosse peu développée des cellules de type A	++ Formes en dégénérescence → lipofuscines		++ Associés au REL (nucléoïdes rhomboïdes)	Système vacuolaire péri-nucléaire, système de lamelles concentriques, centre électrondense et substance fibrillaire, urate de Na (corps résiduels)	Moins abondant que REL	
	Arion ater	Angulo et Moya, 1984 et 1989	Bordure en brosse, endocytose et transfert vers vacuole apicale		Corps résiduels dans zone péri-vacuolaire, globules lipidiques péri-vacuolaires		Citernes péri-vacuolaires avec formation de réseaux membranaires dans la vacuole d'excrétion		
	Lymnaea stagnalis	*Banga et Boer, 1969*							
	Paludine	*In* Bouillon, 1960							
	Hydrobia jenkensi	*In* Bouillon, 1960							
G. Pr	*Pomatias elegans*	Martoja, 1975	Bordure en brosse peu développée	+ Evolution en figure myélinique	Dictyosomes péri-vacuolaires	Non présents	+++		

t20c	Espèces	Auteur	Vacuole (v)				Uretère		
			Liquide vacuolaire	Inclusions, concrétions	Lumière rénale	Canal Rein péricardique	Uretère primaire Cellule ciliées (1), cellule à bâtonnets (2)	Uretère secondaire	Formes excrétées
Gastéropodes pulmonés	*Helix pomatia*	Bouillon, 1960		Cycle de 15 jours Concrétions ++ Lamelles concentriques, acide urique et guanine, calcium, lipides, mucopolysaccharides	Urine primaire - Granules - Concrétions - Débris cellulaires	-	(1) Cellules ciliées (2) réabsorption Sécrétion, bordure en brosse → sinus sanguin, eau, électrolytes (mitochondries et invagination basales) (+++)	Cellules de type (1) et (2) et mucocyte (3)	Uricotélie, acide urique, guanine, urée (Delaunay, 1931)
	Achatina achatina	Skelding, 1973	Origine REL	Concrétions ++ Acide urique + cations (Ca) → urates (pH acide)	Urine primaire, concrétions, corps myéliniques	(+ à -) cellules ciliées	(1) et (2) réabsorption, pinocytose, Golgi, lysosomes, auto et hétérolysosomes, corps multivésiculaires, glycogène	Urine secondaire	Uricotélie, urates
	Theba pisana	Diaz Cosin, 1977	Purines	++ concrétions avec purines sels de calcium, urates	Urine primaire, concrétions				Uricotélie, urates
	Helix aspersa aspersa	Sanchez *et al.*, 1980	Eau Electrolytes	Concrétions acide urique ou sans concrétion	Débris cellulaires (holocrine) Noyau Corps résiduels Granules acide urique	-			-Acide urique, adaptation à la vie terrestre (urée ?)
	Arion ater	Angulo et Moya, 1984 et 1989	Invagination en « bulles » de la membrane vacuolaire	Métabolites et métaux lourds Concrétions (3 à 7 µm), Urates, protéines, mucopolysaccharides, couches concentriques. Corps résiduels contribuant à la formation des concrétions		-			Uricotélie, urates
	Lymnaea stagnalis	*Banga et Boer, 1969*			Concrétions, débris cellulaires				
	Paludine	*In* Bouillon, 1960			Maturation des concrétions Andrews (1979)				Acide urique
	Hydrobia jenkensi	*In* Bouillon, 1960							Ammonotélie, pas d'acide urique
G. Pr.	*Pomatias elegans*	Martoja, 1975	Corps résiduels variés	Cycle annuel (phosphate de calcium) (P, Ca, Mn, Mg, K, S, Zn, Fe, Cu		Filtration péricardiale +	Carbonate de calcium et urate de potassium dans rein d'accumulation. Pas d'uretère		- Pas d'acide urique dans le rein - Acide urique dans le rein d'accumulation

III.3. Les cellules du conjonctif, du sang et du système nerveux intervenant dans le métabolisme des métaux

III.3.1. Les cellules à calcium du tissu conjonctif (figures 21 et 22)

Le tissu conjonctif des gastéropodes et principalement celui du pied contient des cellules spécialisées désignées, cellules à calcium du tissu conjonctif, classées par Marigomez *et al.* (1995) dans la catégorie des cellules à minéralisation externe décrites par Masson (1983) chez la littorine. Les granules de carbonate de calcium extracellulaires sont englobés dans des chambres formées par l'invagination de la membrane plasmique qui présente des fenêtres en « pores » caractéristiques permettant une relation entre la concrétion de calcium et le milieu intercellulaire.

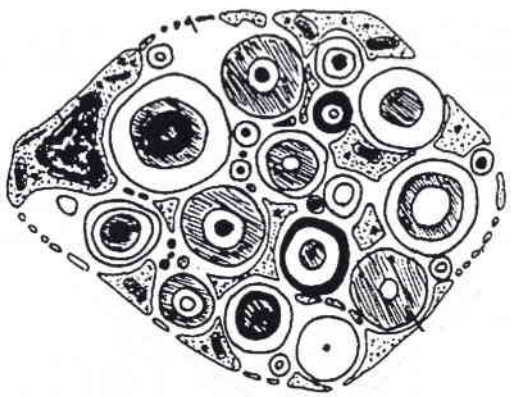


Figure 21 : Schéma de la cellule à calcium du tissu conjonctif des gastéropodes (*in* Cajaraville (1995) modifié de Mason (1983)). Classement dans les cellules à minéralisation externe.

Le classement en cellule à minéralisation externe tranche entre les différentes hypothèses émises en 1982 par Fournié et Chétail qui, dans une revue exhaustive de l'accumulation calcique au niveau cellulaire chez les mollusques (73 références), se rallient aux auteurs pour lesquels les sphérulites organo-calciques sont élaborées à l'intérieur d'une structure vacuolaire limitée par une membrane.

L'origine de ces vacuoles étant d'origine variée, voir mixte selon les auteurs :

- dispositif particulier d'endocytose
- vésicules du réticulum endoplasmique
- vésicules golgiennes
- association variable des trois premières origines

Le classement ne permet pas de retenir, pour origine de ce type cellulaire, une voie de différentiation à partir de la cellule à pores ou cellules à sillon qui serait un stade pluripotent pouvant se différencier vers des orientations structurales et fonctionnelles très diverses (Richardot, 1976).

La nature chimique complexe des concrétions nécessite un apport de matériaux extracellulaires traversant la membrane basale puis les pores mais aussi la synthèse et le conditionnement des composés organiques constitutifs, en partie, des concrétions ainsi que l'apport d'enzymes de la calcification avec une intervention du réticulum endoplasmique et du Golgi.

Nous retiendrons du tableau 21a *in* Fournié et Chétail (1982) que le genre *Helix* présente ce type de cellule libre à calcium du tissu conjonctif dans le conjonctif sous-palléal, conjonctif tégumentaire, le conjonctif péri-vasculaire et le conjonctif inter-acineux de la glande digestive, le conjonctif de la sole pédieuse.

Tableau 21a : Distribution anatomique et systématique des cellules à calcium dans le tissu conjonctif des Mollusques (d'après Fournié et Chétail, 1982). (1) Barfurt, 1881 ; (2) Cuenot, 1892 ; (4) Nold, 1924 ; (5) Prenant, 1924 ; (6) Mac Gee-Russell, 1957 ; (7) Campion, 1961 ; (8) Fretter et Graham, 1962 ; (9) Abolins-Krogis, 1963 ; (10) Kapur et Gibson, 1967 ; (11) Timmermans, 1969 ; (12) Chétail et Fournié, 1970 ; (13) Runham et Hunter, 1970 ; (14) Greenaway, 1971 ; (15) Richardot et Wauthier, 1972 ; (16) Catania, 1975 ; (17) Tompa et Watabe, 1976 ; (18) Watabe *et al.*, 1976 ; (19) Sen Gupta, 1977 ; (20) Sminia *et al.*, 1977 ; (21) Vovelle et Grasset, 1979 ; (22) observations Fournié et Chétail (1982)

Tissu	Stylommatophores	Basommatophores	Prosobranches
Conjonctif sous palléal	Helix (5) (9) (11) Achatina (22)	Lymnaea (2) (11) (20) Planorbis (2) (5) Ferrissia (15) Pomacea (11) (18) Helisoma (10)	Paludina (5) Pomatias (2) (5)
Conjonctif tégumentaire	Helix (7) (22) Achatina (22) Limax (22) Agriolimax (22) Arion (22)	Lymnaea (2) (20) Ferrissia (15) Pomacea (18) Helisoma (10)	Thais (12) Pomatias (21)
Conjonctif périnerveux	Agriolimax (13)	Lymnaea (20) Ferrissia (15)	Crepidula (16)
Conjonctif périvasculaire	Helix (3) (4) Bensonia (19) Anguispira (17) Arion (1) (2) (13) Agriolimax (13)	Lymnaea (4) (14)	Littorina (5) (8)
Conjonctif interacineux glande digestive	Helix (11) Agriolimax (22) Achatina (22)	Lymnaea (11)	
Conjonctif péridigestif	Agriolimax (22)	Lymnaea (20)	

La nature des concrétions est mixte, organique et minérale. La fraction minérale est principalement constituée de carbonate de calcium. Un peu de phosphate est présent et dans ce cas il serait lié à la fraction organique. Le magnésium est souvent associé au calcium et dans certains cas peut-être prédominant.

La nature minéralogique serait essentiellement amorphe évoluant au fur et à mesure que la précipitation se poursuit en aragonite et dans certains cas en calcite.

La fraction organique est complexe (Fournié et Chétail, 1982) riche en sucres (glucosamines, mucopolysaccharides acides), protéines (rapport entre acides aminés acides et basiques différent et supérieur à celui de la coquille) et lipides.

Charrier (1995) désigne ces cellules « granulocytes à pores ». Les granules de carbonates de calcium sont considérés comme des réserves d'ions qui peuvent être mobilisés pour la réparation de la coquille (Watabe *et al.*, 1976), la calcification de la coquille et de l'œuf (Tompa et Wilbur, 1977) et l'équilibre acido-basique (Mason et Nott, 1981). La fonction de détoxication de métaux n'a pas été mise en évidence.

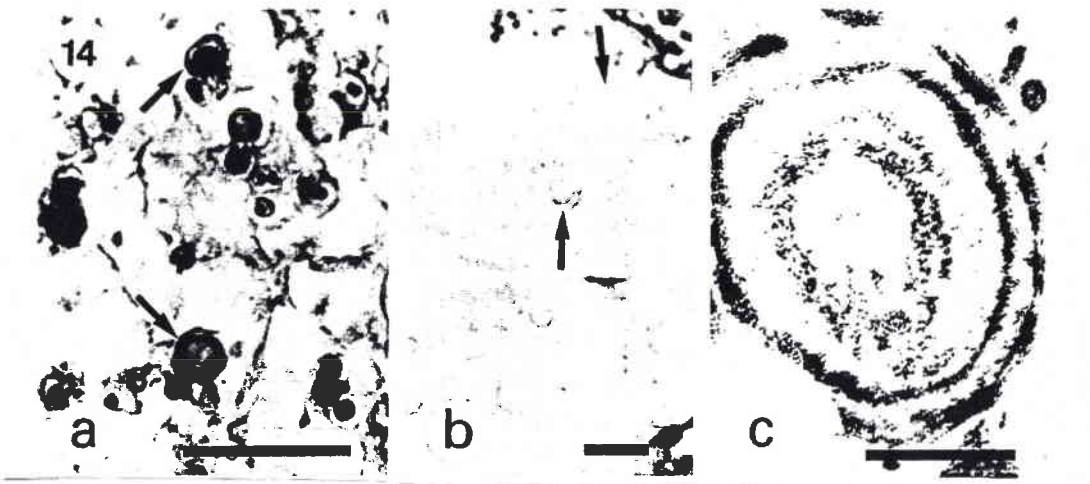


Figure 22 : Illustrations de la cellule à calcium du tissu conjonctif de *Littorina* (*in* Cajaraville, 1995).
a : photographie en microscopie optique (échelle : 50µm) ; coloration histochimique du calcium selon la technique de Stoeltzner (flèches)
b : photographie en microscopie optique sur une coupe semi-fine (bleu de toluidine) flèches : concrétions de $CaCO_3$ (échelle : 20 µm)
c : photographie en microscopie électronique à transmission d'une concrétion faite de couches concentriques diversement électrondenses (échelle : 1µm)

III.3.2. Les « Pore Cells » ou cellules à pores (figure 23 à 25)

Il ne faut pas confondre les cellules à calcium du tissu conjonctif, à fenêtres de la membrane plasmique avec les «pore cells » qui existent également chez les gastéropodes, classées par Marigomez *et al.* (1995) dans les cellules phagocytaires par percolation se différenciant des cellules phagocytaires par des pseudopodes. Les « Pore Cells », décrites par Mason (1983) dans le cas de la littorine, sont enveloppées par la lame basale et la membrane plasmique qui se replie de la même manière que chez les podocytes.

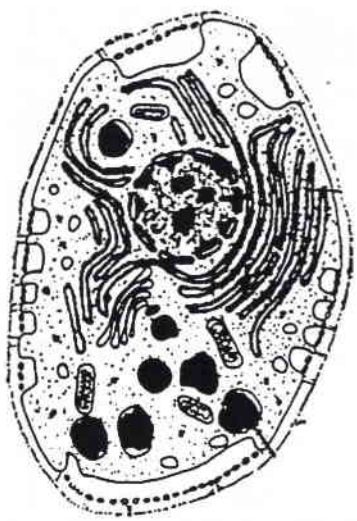


Figure 23 : Schéma d'une « pore cell » de gastéropode *in* Cajaraville, 1995 modifié de Mason en 1983 chez *Littorina littorea*.
Cellule phagocytaire par percolation

Ces repliements donnent une apparence, en coupe, de fenêtre ou pore de percolation. Du matériel fibrillaire et électrondense recouvrent la membrane périphérique des pores. Ce matériel est riche en soufre et en cuivre. Les caractéristiques ultrastructurales des cellules à pores sont le développement important du réticulum endoplasmique granuleux et la présence de granules, non concrétionnaires, d'électrondensités différentes contenant les éléments soufre et cuivre. Cette activité peut permettre la détoxication d'autres métaux tels que l'argent et le cadmium. Elles peuvent s'accumuler dans certaines régions du tissu conjonctif, augmentant ainsi la charge métallique de l'organisme ou être éliminées par diapédèse. Rappelons que Dallinger a identifié une métallothionéine au niveau du pied et du manteau d'*Helix* qui n'a pas de rôle de détoxication mais un rôle biologique de stockage du cuivre pour la synthèse d'hémocyanine (Brown, 1967 ; Mason, 1983 ; Dallinger *et al.*, 1993b).

Sminia *in* Bubel (1989) a mis en évidence, chez la limnée, la présence d'hémocyanine sous sa forme cristalline dans des citernes du réticulum endoplasmique granuleux.

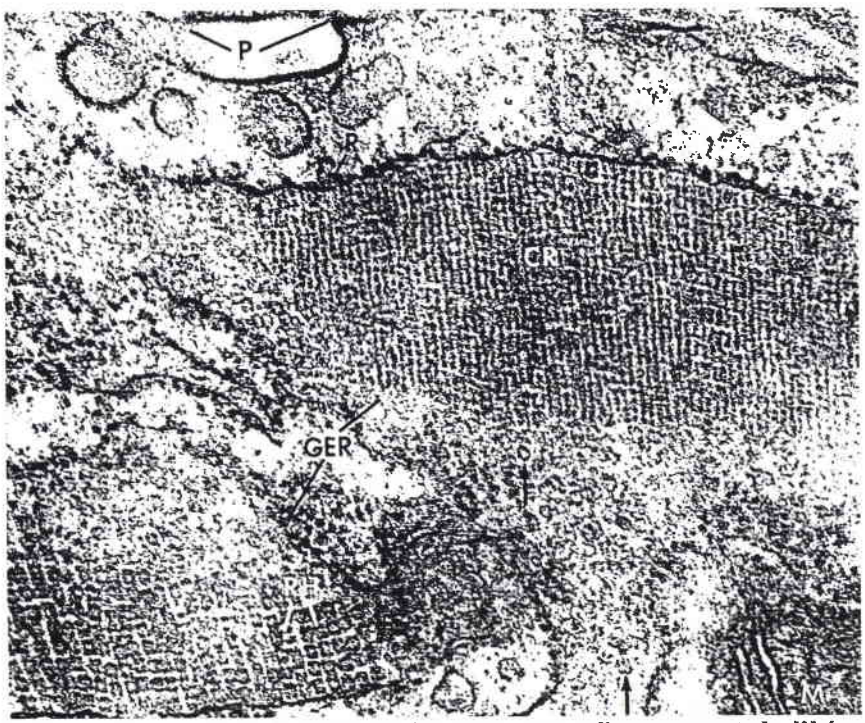


Figure 24a : Cytoplasme d'une cellule à pores de *Lymnaea stagnalis* contenant de l'hémocyanine sous forme cristalline (CR) dans le réticulum endoplasmique granuleux dilaté (GER). Les molécules d'hémocyanine sont arrangées dans des rangées fortement ordonnées (RH). x 58.000 (Prof Dr. T. Sminia)

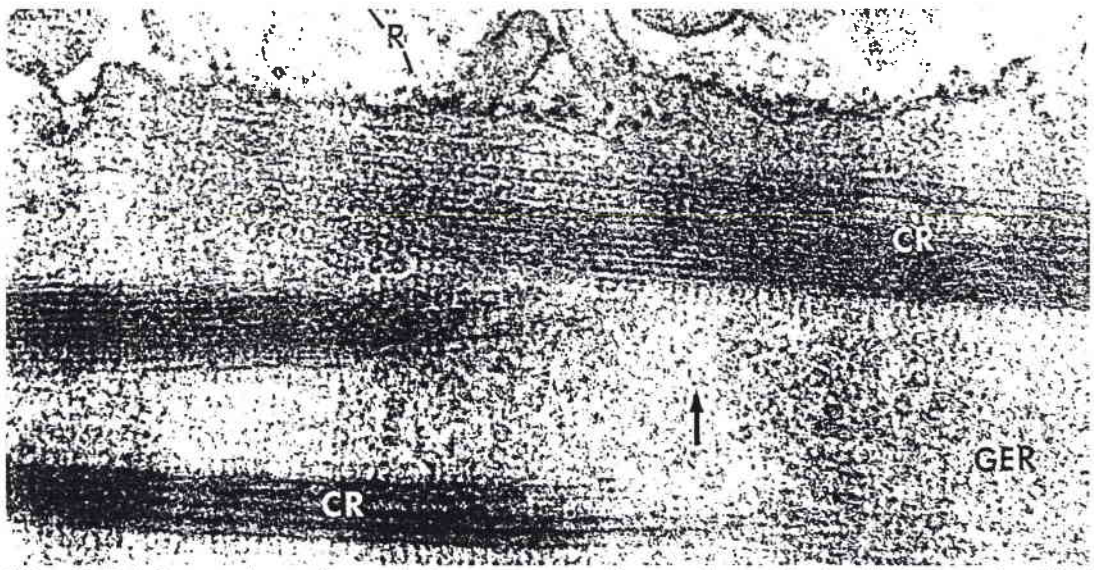


Figure 24b : Cellule à pore du gastéropode *Lymnaea stagnalis* avec des molécules d'hémocyanine (flèches) sous forme cristalline (Cr) dans les citernes du réticulum endoplasmique granuleux dilaté (GER). x 25.000 (Prof Dr. T. Sminia, Amsterdam)

Il était également intéressant de rechercher la présence de métaux dans les cellules à mucus abondantes dans l'épithélium pédieux.

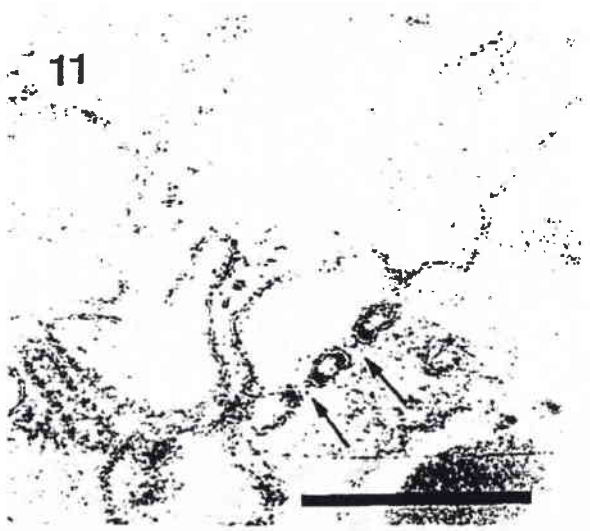


Figure 25 : Photographie en microscopie électronique à transmission (échelle : 0,25µm) d'une structure de percolation avec pore chez *Littorina littorea* (*in* Cajaraville, 1995)

III.3.3. Les cellules à calcium tégumentaires

Selon Fournié et Chétail (1982), les pulmonés stylommatophores présentent des cellules à calcium tégumentaires sécrétrices au niveau du bourrelet palléal et du tégument latéral du pied. Ces cellules sont vraisemblablement d'origine conjonctive et leur pôle apical s'insinue entre les cellules épithéliales épidermiques pour venir s'aboucher à l'extérieur. Certains auteurs les ont désignées glande unicellulaire à calcium. Elles ont été décrites chez *Helix pomatia* par Prenant (1924) et chez *Helix aspersa* par Campion (1961). Les cellules du bourrelet palléal jouent un rôle dans la formation de l'épiphragme. Les cellules du tégument latéral du pied déversent leurs concrétions organo-minérales dans le mucus avec une sécrétion de type holocrine. Ces cellules ont été mises en évidence chez tous les stylommatophores.

III.3.4. Les cellules sanguines

Parmi les hémocytes des gastéropodes prosobranches, Mason (1983) distingue des hyalinocytes et des granulocytes. Les granulocytes sont circulaires en profil avec un réticulum endoplasmique lisse organisé en petites vésicules. Les hyalinocytes présentent de nombreux pseudopodes et d'abondants lysosomes. Marigomez *et al.* (1995) les classent dans les cellules phagocytaires à pseudopodes. Elles peuvent phagocyter les métaux particulaires et les métaux liés aux protéines. Elles sont aussi impliquées dans la régulation des métaux en absorbant, par pinocytose, les métaux en solution. Elles jouent un rôle important dans la compartimentation et le devenir de Ca, Pb, Cd, Cu, Zn et Fe. Les métaux de classe A et B sont respectivement accumulés en association avec le soufre ou le phosphore dans les lysosomes. Les métaux sont évacués du corps de l'animal par diapédèse des cellules désignées aussi amœbocytes.

Fournié et Chétail (1982) ont réalisé la synthèse des travaux signalant l'accumulation du calcium dans les amœbocytes des Mollusques (tableau 21b).

Tableau 21b : Distribution anatomique et systématique des amœbocytes accumulant le calcium chez les Mollusques (d'après Fournié et Chétail, 1982)

		Stylommatophores	Lamellibranches
Coquille	Régénération	Helix aspersa (11) Helix pomatia (2) (4) (5) Euplecta indica (8)	
	Morphogenèse normale	Helisoma duryi eudiscus (7) Agriolimax reticulatus (6)	
Tissu conjonctif glande digestive		Helix aspersa (11) Helix pomatia (1) (3)	
Tissu conjonctif sous-palléal		Helix pomatia (2) (10)	Mercenaria mercenaria (9)

(1) à (6) Abolins-Krogis: (1) 1960; (2) 1963; (3) 1972; (4) 1973; (5) 1976; (6) Fournie, 1979a et b; (7) Kapur et Gibson, 1967; (8) Kapur et Sen Gupta, 1970; (9) Neff, 1972; (10) Saleuddin, 1970; (11) Wagge,1951.

III.3.5. Les cellules à pompes à calcium

Selon Marigomez *et al.* (1995), les canaux à calcium (Ca^{2+}) de la membrane plasmique des neurocytes peuvent être une voie de pénétration d'ions toxiques et le tissu nerveux est un organe cible de la toxicité métallique (le terme de neurocytes englobe les neurones et les astrocytes associés). Il en est ainsi pour Hg, Pb, Al, As, Mn, Th, Li et Sn qui entraînent une neurotoxicité. Les ions Ca^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Sr^{2+} et Ba^{2+} peuvent pénétrer par les mêmes canaux. Les canaux à calcium sont nombreux au niveau de la région synaptique qui est pauvre en système lysosomal, mais riche en réticulum endoplasmique granuleux (Corps de Nissl), mitochondries et microtubules. Une fois à l'intérieur de la cellule, les métaux sont stockés dans les mitochondries qui sont le réservoir normal de calcium pour ces cellules. Des accumulations intranucléaires ont été également décrites. Le mercure peut se lier aux macromères de tubuline présentant des groupements SH et constituant les microtubules, support du transport des neurotransmetteurs. Le schéma général fourni par Marigomez *et al.* (1995) concernant l'organotropisme du cadmium chez *Littorina littorea* retient les neurocytes comme site d'accumulation (figure 26)

III.4. Schéma général de la coordination entre les différents types cellulaires intervenant dans le métabolisme des métaux

Divers types cellulaires collaborent dans le métabolisme des métaux à différents stades de celui-ci : prise du métal, transport, accumulation et élimination.

L'exemple le plus complet est donné par la synthèse réalisé par Marigomez *et al.* (1995) sur les différentes recherches effectuées sur *Littorina littorea*, gastéropode prosobranche marin, en présence de cadmium. Cette espèce est différente de *Helix* par son milieu de vie et son anatomie. Nous fournirons, comme deuxième exemple, une approche réalisée par Charrier (2000) pour les escargots terrestres du genre *Helix*.

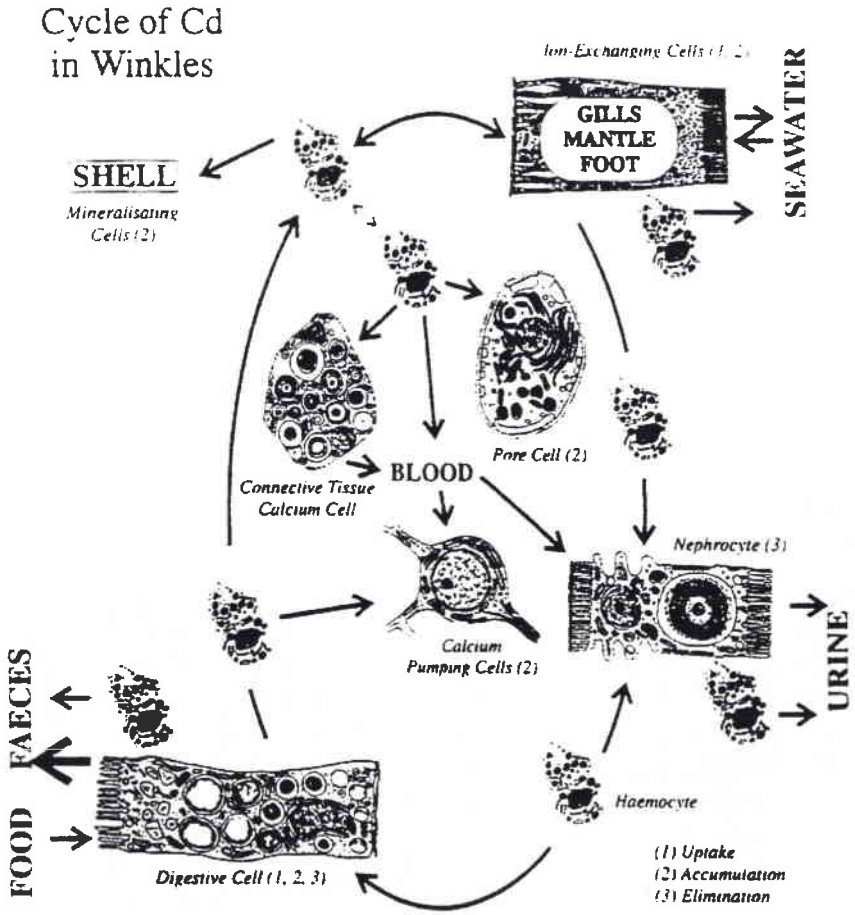


Figure 26 : Schéma illustrant la voie de mobilisation du cadmium dans l'ensemble des tissus de *Littorina littorea* avec l'indication des types de cellule impliqués dans l'élimination du métal (modifié de Marigomez *et al.*, 1990 et Nott *et al.*, 1993).

1. Les voies de pénétration

Le cadmium pénètre l'organisme par l'épithélium branchial, l'épithélium de la paroi du manteau ou celui du pied ainsi que le tractus digestif (estomac et épithélium des tubules digestifs).

Dans le tractus digestif, il y a endocytose de cadmium particulaire suivi de digestion intracellulaire. Pour les autres épithéliums, il y a des échanges ioniques avec un transfert d'ions Cd^{+} par des canaux ioniques.

2. Les sites d'accumulation

Les cellules qui prélèvent le cadmium peuvent l'accumuler par la synthèse de métallothionéines liant ce métal, suivie d'une séquestration dans le système lysosomale, mais d'autres cellules internes interviennent également comme les cellules à pores et les cellules pompant le calcium. L'accumulation s'effectue aussi dans le rein avant élimination mais surtout par le fait que les cellules à pores s'accumulent au voisinage de l'épithélium rénal après une exposition au cadmium. Par ailleurs, la coquille accumule aussi le cadmium apporté par les cellules de minéralisation.

3. Le transport

L'énumération des cellules concernées dans l'accumulation implique une voie de transport entre les cellules qui prélèvent le cadmium au contact du milieu extérieur et certaines cellules en contact seulement avec le milieu intérieur.

Le sang et ses éléments figurés assurent cette liaison. La quantité de cadmium dans l'hémolymphe serait d'environ 60% et les 40% restant sont transportés par les hémocytes.

4. L'élimination

L'élimination est limitée en ce qui concerne le cadmium qui reste dans sa majorité immobilisé dans les cellules à pores et, pour une part seulement, soit excrété en même temps que les concrétions minérales produites par les néphrocytes, soit enfin transféré dans le milieu extérieur par diapédèse des hémocytes à travers les épithéliums de la branchie, du rein et de l'épithélium digestif. Les cellules de la paroi du manteau contribuent également à l'élimination par exocytose du cadmium en même temps que les matériaux constitutifs de la coquille.

Marigomez *et al.* (1990) situent aussi, sur le schéma, les cellules à calcium du tissu conjonctif par le fait qu'elles sont affectées par des niveaux toxiques en cadmium. Des niveaux toxiques en métaux de classe B peuvent modifier le métabolisme des métaux essentiels de classe A tels que ceux qui sont concentrés dans ce type cellulaire (K, Mg, Ca, Mn et Zn).

5. Synthèse des connaissances chez les Hélicidés

Le schéma établi pour *Littorina littorea* en présence de cadmium peut être transposé, en le modifiant et en le complétant, aux gastéropodes hélicidés et en tenant compte des métaux traces de classe A ou B. Dans ce cas, il faut retenir d'autres types cellulaires tels que les cellules à calcium de la glande digestive et les cellules à calcium tégumentaires sécrétrices du bourrelet palléal et du tégument latéral du pied. Le schéma général met en œuvre, pour certains métaux, différents types cellulaires d'accumulation calcique. Fournié et Chétail (1982) ont réalisé une étude exhaustive précédemment citée et utilisée pour la description de certains types cellulaires des pulmonés Stylommatophores intervenant dans les échanges calciques (figure 27) (cellules à calcium libres du tissu conjonctif, cellules à calcium tégumentaires sécrétrices, amœbocytes accumulant le calcium, cellules à calcium de la glande digestive).

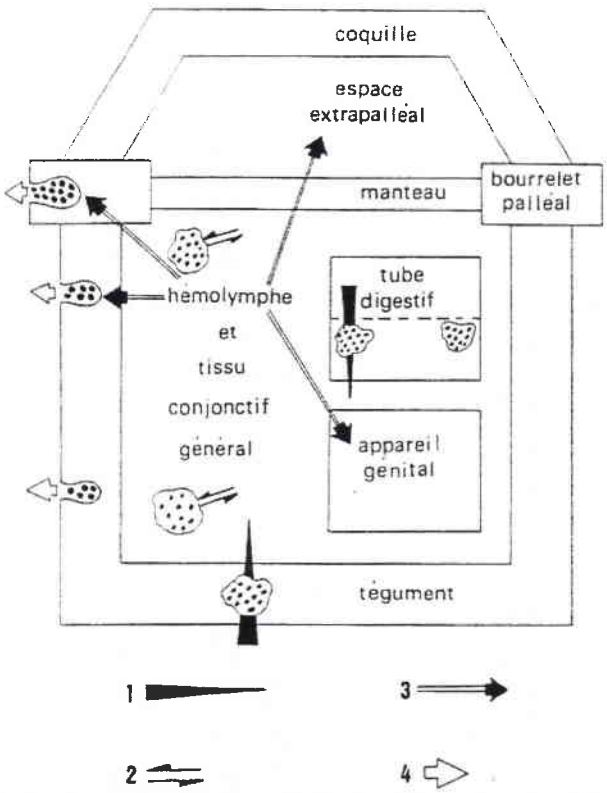


Figure 27 : Interprétation schématique du rôle des cellules à calcium dans les échanges calciques à travers les différents compartiments concernés chez les Pulmonés Stylommatophores. On peut distinguer : 1 : Des niveaux de captures calciques : sole pédieuse et glande digestive ; 2 : Des niveaux d'échanges bidirectionnels entre les cellules à calcium conjonctives et l'hémolymphe ; 3 : Des niveaux d'utilisation interne (coquille et appareil génital) ; 4 : Des niveaux d'utilisation externe (cellules sécrétrices du tégument latéral et du bourrelet palléal). D'après Fournié et Chétail (1982)

Charrier (2000) illustre la voie de mobilisation des métaux de classe A ou B dans l'ensemble des tissus des gastéropodes hélicidés (figure 28). L'intervention des cellules accumulant le calcium dans l'accumulation, le transport, la détoxication des métaux est importante par rapport à d'autres voies métaboliques déjà décrites dans les chapitres précédents.

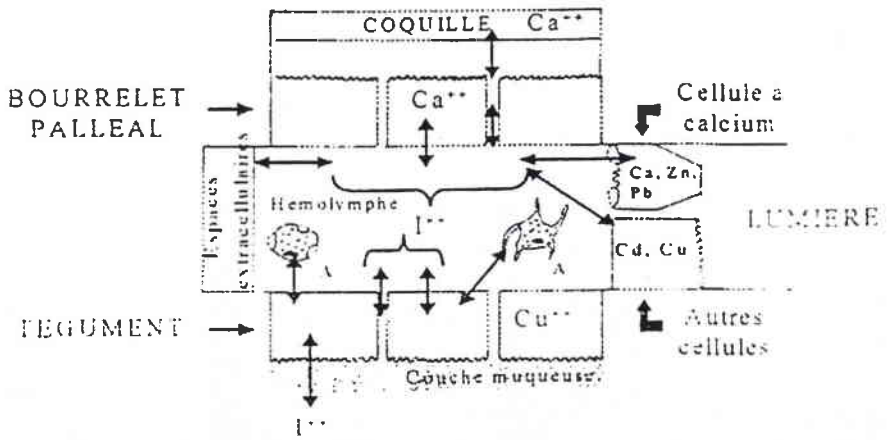


Figure 28 : Schéma illustrant la voie de mobilisation des métaux traces de classe A ou B dans l'ensemble des tissus de gastéropodes hélicidés (Charrier, 2000). Relation entre environnement, végétaux et tissus du Mollusque. A : amœbocytes transportant les divers ions

Le calcium, élément majeur, est accumulé sous forme de carbonate de calcium dans les cellules libres de type amœboïde qui circulent dans l'hémolymphe et apportent le carbonate de calcium au bourrelet palléal pour la construction de la coquille et à l'oviducte pour les œufs. Ces cellules peuvent prendre en charge un certain nombre de métaux.

Il en est de même de certaines cellules fixes dont le calcium est associé à des carbonates (cellules à pores ; cellules à calcium du conjonctif) ou à des phosphates. Les cellules à calcium de la glande digestive (pyrophosphates) détoxifient l'organisme en accumulant, par exemple, Zn, Pb et Ag.

- Des cellules fixent certains métaux sur des métallothionéines (MT). Une MT-Cu, localisée dans le cytosol des cellules basophiles de la glande digestive, aurait un rôle de détoxication du cuivre (Dallinger, 1995).
- Une deuxième MT-Cu, située au niveau du pied et du manteau, aurait un rôle biologique essentiel en stockant le cuivre nécessaire à la synthèse de l'hémocyanine que nous avons signalée dans les « pore cells ».
- Une MT-Cd, située dans les cellules basophiles de la glande digestive, fixe le cadmium.

L'hémolymphe est un compartiment d'échange et de transport entre les différents types cellulaires.

DEUXIEME PARTIE :
Matériel et Méthodes

Chapitre I : Les différentes espèces de gastéropodes utilisés

Dans les diverses études réalisées, plusieurs espèces ont été utilisées. Dans la majeure partie des cas, seulement deux espèces du genre *Helix* ont fait à la fois l'objet du monitoring actif et passif. Ces espèces sont les suivantes :

- *Helix aspersa* : la sous-espèce utilisée est *aspersa*, forme *normalis* (poids adulte de 6 à 14 g) (Chevallier, 1992). Ces escargots sont aussi communément appelés Petit Gris. La souche originale provient de la région de Cavaillon et a été dans un premier temps élevée en conditions contrôlées à l'Université de Besançon puis à l'Université de Metz.
- *Helix pomatia*, communément appelé escargot de Bourgogne. Ces escargots proviennent de la région Lorraine. Leur poids adulte varie de 20 à 40 g.

Les autres espèces, énumérées dans le tableau 22, ont seulement fait l'objet d'un monitoring passif.

Tableau 22 : Tableau récapitulatif de l'ensemble des espèces utilisées (F. : famille ; S.F. : sous-famille ; X : animaux autochtones ; (X) : animaux transférés) ; + : élevage

Genres	Espèces	Elevage	Augny	Bouxières (A31)	Maizières (A31)	Aciérie	CEDILOR	Références méridionales	La Manon (A7)	Vaugrenier (N7)	Léouvé
Gastéropodes pulmonés											
F. Helicidae S.F. Helicinae	*Cepaea nemoralis*		X		X	X					X
	Helix pomatia	+	X				(X)X				X
	Helix hortensis		X								
	Helix aspersa aspersa	+	X	(X)	(X)	(X)X	(X)	X	X	X	
	Helix aspersa maxima	+									
	Eobania vermiculata							X	X	X	
	Theba pisana							X	X	X	
	Pseudotachea splendida								X		
S.F. Helicellinae	*Trochoidea scitula*								X		
	Helicopsis striata								X		
	Cernuella neglecta							X	X		
F. Subulinidae	*Rumina decollata*							X			
F. Zonitidae	*Oxychilus draparnaudi*							X		X	
F. Chondrinidae	*Chondrina sp.*									X	
Gastéropodes prosobranches											
Stylommatophores	*Cyclostoma elegans*							X		X	

Planche II_1 : Coquilles des gastéropodes utilisés en biosurveillance active ou passive (d'après Kerney et Cameron, 1987)

1- *Cepaea nemoralis*

2- *Pseudotachea splendida*

3- *Helix pomatia*

4- *Helix hortensis*

5- *Helix aspersa aspersa*

6- *Eobania vermiculata*

7- *Theba pisana*

8- *Trochoidea scitula*

9- *Helicopsis striata*

10- *Cernuella neglecta*

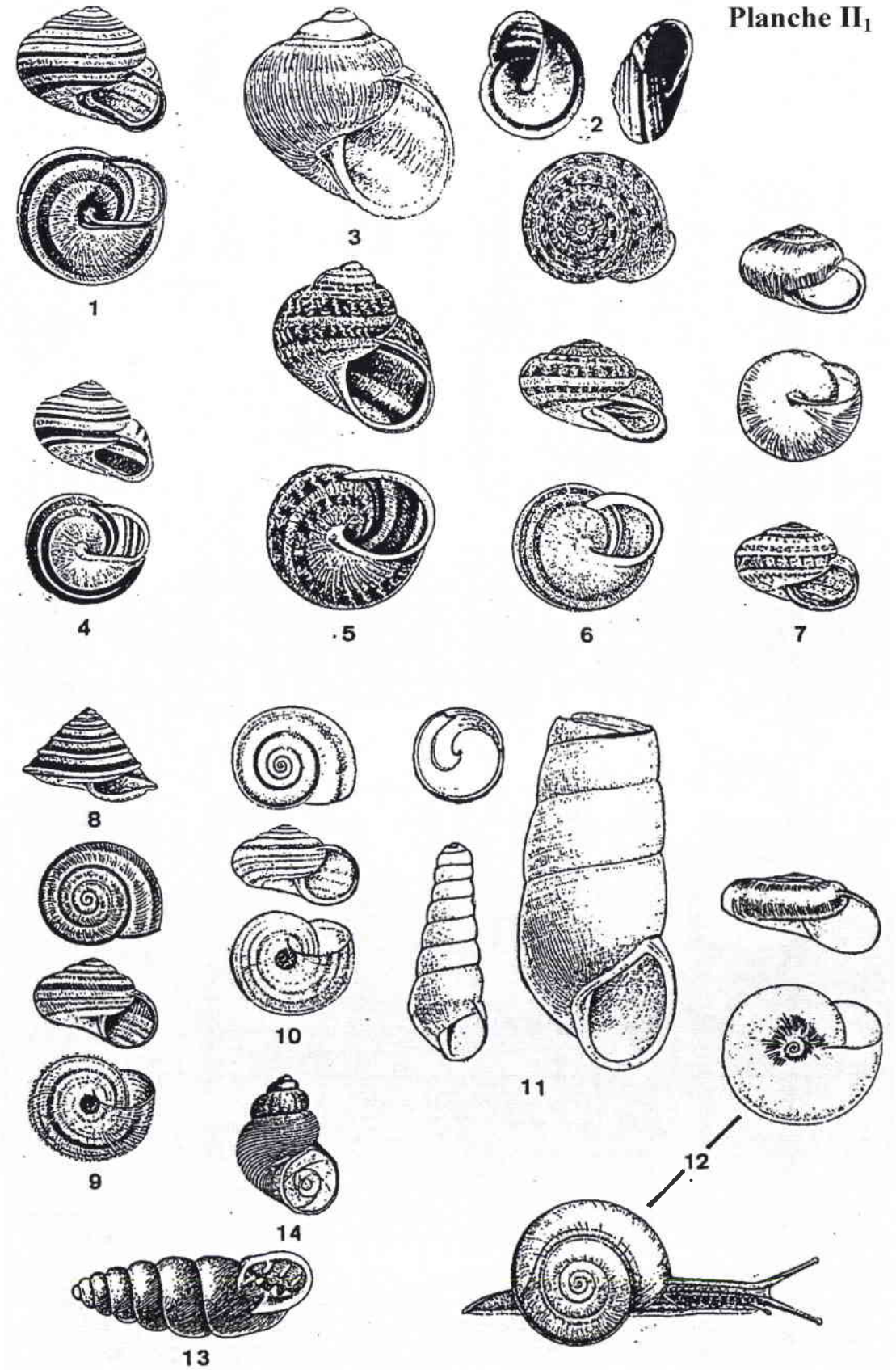
11- *Rumina decollata*

12- *Oxychilus draparnaudi*

13- *Chondrina sp.*

14- *Cyclostoma elegans*

Planche II_1



Classification et description sommaires

- Les gastéropodes pulmonés
  - ✓ Helicidae
    - Helicinae

- *Cepaea nemoralis* (Linné) (planche II_1, figure 1) (« hélice soyeuse »)

Longueur 12 à 22 mm, ∅ = 18 à 25 mm ; coquille globuleuse sans ombilic, bordure du péristome sombre ; habitat varié, bois, prairies, dunes, haies, broussailles, jardins, jusqu'à 1.200 m dans les Alpes, jusqu'à 1.800 m dans les Pyrénées (Europe de l'ouest).

- *Helix pomatia* (Linné) « escargot de bourgogne ou des vignes» (planche II_1, figure 3)

Longueur 30 à 50 mm, ∅ = 32 à 50 mm ; coquille globuleuse, ombilic petit en fente oblique ; sur formations calcaires, bois, haies, jardins, champs, vignes ; communs ou très communs, jusqu'à 1.600 m dans les Alpes (France septentrionale).

- *Helix aspersa* (Müller) (planche II_1, figure 5)
  - *Helix aspersa aspersa* « escargot petit gris ou des jardins »

Longueur 25 à 35 mm, ∅ = 25 à 40 mm ; coquille globuleuse sans ombilic ; jardins, buissons, haies, cultures, bois, vieux murs, stations humides à terre meuble, jusqu'à 1.500 m dans les Alpes et jusqu'à 1.200 m dans les Pyrénées (toute la France).

  - *Helix aspersa maxima* (escargots gros gris d'Algérie »

- *Eobania vermiculata* (Müller) (planche II_1, figure 6)

Longueur 16 à 27 mm, ∅ = 22 à 30 mm ; coquille globuleuse sans ombilic ; escargot méditerranéen, commun, comestible ; champs, jardins, terres cultivées, vignes, montagne jusqu'à 800 m.

- *Theba pisana* (Müller), *Helix pisana*, *Euparypha pisana* (Müller) (planche II_1, figure 7)

Longueur 9 à 20 mm, ∅ = 12 à 25 mm ; coquille globuleuse avec un ombilic étroit, caché par un repli de la lèvre columellaire, test mince ; escargot méditerranéen commun ; espèce xérophile, sites secs, jardins, champs, talus sur tiges sèches, jusqu'à 720 m dans les Alpes Maritimes.

- *Pseudotachea splendida* (*Otala* – Draparnaud) (planche II_1, figure 2)

Longueur 8 à 13 mm, ∅ = 15 à 24 mm ; coquille sub-globuleuse, déprimée, sans ombilic, solide, luisante ou opaque, unicolore ou avec cinq bandes étroites brunes ; collines, pierres, buissons, plantes sèches, vieux murs, rochers, endroits secs (garrigues, vignes) jusqu'à 500 m, commun en méditerranée (Bouches du Rhône, Vaucluse).

- *Trochoidea scitula* (Crist et Jan) ou *Helix scitula* (planche II_1, figure 8) (« hélice mignonne)

Longueur 4 à 6 mm, ∅ = 6 à 10 mm ; coquille pyramidale, dessous peu bombé, ombilic étroit, une carène ; espèce méditerranéenne (littoral de la Provence), très xérothermique, stations sèches, champs, jardins, talus, coteaux, landes, dunes, sur tiges des plantes basses, jusqu'à 730 m dans les Alpes.

- *Helicopsis striata* (Müller) ou *Helicella striata* (planche II_1, figure 9)

Longueur 6,5 mm, ∅ = 6 à 9 mm ; coquille sub-globuleuse, ombilic profond, hélice striée ; espèce commune en Europe, xérothermique, endroits secs et rocailleux.

- *Cernuella neglecta* (Draparnaud) *Helicella neglecta* (Draparnaud) (planche II_1, figure 10)

Longueur 6 à 10 mm, ∅ = 9 à 18 mm ; coquille globuleuse sub-conique à bandes brunes variables, ombilic large ; espèce méditerranéenne du sud de la France (vallée du Rhône et de la Garonne), sites secs, éboulis, bords de routes, rocailles.

✓ Zonitidae

- *Oxychilus draparnaudi* (Draparnaud) *Oxychilus laucidus* (Draparnaud) (planche II_1, figure 12)

Longueur 6 à 10 mm, ∅ = 12 à 18 mm ; coquille discoïde de couleur brun-jaune pâle, ombilic profond, corps bleu cobalt foncé ; espèce méditerranéenne (Europe de l'ouest), très carnivore, bosquets, buissons, terrains cultivés, jardins, végétation abondante, sous les pierres, décombres, murailles, restanques, bords des fossés.

✓ Chondrinidae

- *Chondrina sp.* (planche II_1, figure 13)

Longueur 8 à 14 mm, ∅ = 2 à 4 mm ; coquille cylindro-conique brun-gris foncé avec des reflets violacés, coquilles à 7 ou 8 tours avec des dents, bordure mince et émoussée ; terrains calcaires, rocailleux, murs.

- *Rumina decollata* (Linné) (planche II_1, figure 11)

Longueur 24 à 35 mm, ∅ = 9 à 15 mm ; coquille sub-cylindrique allongée non ventrue avec un ombilic en fente oblique étroite ; espèce méditerranéenne, lieux incultes, bords des fossés, talus, sous arbustes et gazon, s'enterre lors de sécheresse, sols calcaires.

- Ariantinae

- *Arianta arbustorum* (Linné) : référence dans la grille de Dallinger

Longueur 10 à 22 mm, ∅ = 14 à 28 mm ; Coquille opaque brune ou jaune avec une bande spiralée brune ou noire, un ombilic recouvert par une lèvre columellaire, un péristome à bordure blanche ; prairies, bois, haies, zones humides, très peu présents dans les zones à climat sec et sols bien drainés.

➢ Les gastéropodes prosobranches

Cyclostomidés : *Cyclostoma elegans* (Müller) ou *Pomatias elegans* (planche II_1, figure 14)

Longueur 10 à 18 mm, ∅ = 8 à 13 mm ; coquille ovoïde, ombilic en fente médiocre ; xérophiles, calcicoles ; coteaux secs, bords des chemins, talus, plantes basses, lisière des bois.

Magnin et Tatoni (1995) ont étudié l'évolution des communautés de gastéropodes sur les terrasses calcaires de la Provence (restanques), abandonnées par les agriculteurs. Il y a une corrélation entre la composition des peuplements malacologiques et celles des communautés floristiques. Les communautés de gastéropodes peuvent servir comme bioindicatrices de l'état de l'environnement. Le caractère méditerranéen des communautés s'atténue dans les stades les plus avancés de la succession floristique amenant au stade forestier.

Le développement d'une strate de broussailles ou arborée, favorise les espèces mésophiles (*Helix aspersa*), par rapport aux espèces xérophiles et anthropophiles des terres cultivées ou en jachères telles que *Theba pisana*, *Helicopsis sp.*, *Trochoidea sp.* et *Eobania vermiculata.* Par ailleurs, l'accumulation de litière joue un rôle d'abri (*Cepaea nemoralis*) ou d'abri et de nourriture (*Pomatias elegans* = *Cyclostoma elegans*), cette dernière espèce jouant un rôle important dans la dégradation de la litière, des feuilles et recherchant les sols meubles dans lesquels, elle peut s'enfoncer pendant les périodes chaudes et sèches. *Oxychilus draparnaudi*, espèce recherchant l'ombre, est également une espèce de biotope boisé. La présence de roches permet le développement d'espèces caractéristiques de la garrigue méditerranéenne dont certaines nettement saxicoles (*Chondrina sp.*, *Cernuella sp.* et *Pseudotachea sp.*).

Chapitre II : Elevage – Nourriture – Croissance de référence

Les jeunes escargots utilisés pour les tests 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.

Il faut 3 mois à partir du début du stade « nursery » pour obtenir des escargots bordés c'est-à-dire adultes. Pour que ceux-ci soient capables de se reproduire, il faut encore attendre 1 mois (maturation de l'appareil génital). La reproduction est suivie pendant 10 semaines en raison du fait que tous les animaux ne sont pas prêts à pondre de façon synchrone et cette durée permet d'obtenir de 70 à 120% de reproduction (le taux de reproduction est défini comme étant le rapport entre le nombre total de pontes obtenues et le nombre de reproducteurs au départ de la mise en reproduction).

A chaque phase 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 (1 à 3mois) pour les jeunes, à 1 an pour les adultes en chambre climatisée (6-7°C). Pour des périodes courtes, on peut laisser les animaux au sec à température ambiante (15 à 20°C) en estivation ; pour des périodes plus longues (supérieures à 3 mois), l'hibernation à 6-7°C est recommandée.

II.1. Paramètres environnementaux

a. Local

Le local spécifique dans lequel se déroule l'élevage et les expérimentations possède une surface de 12,5 m^2 (2,75 x 4,55 m).

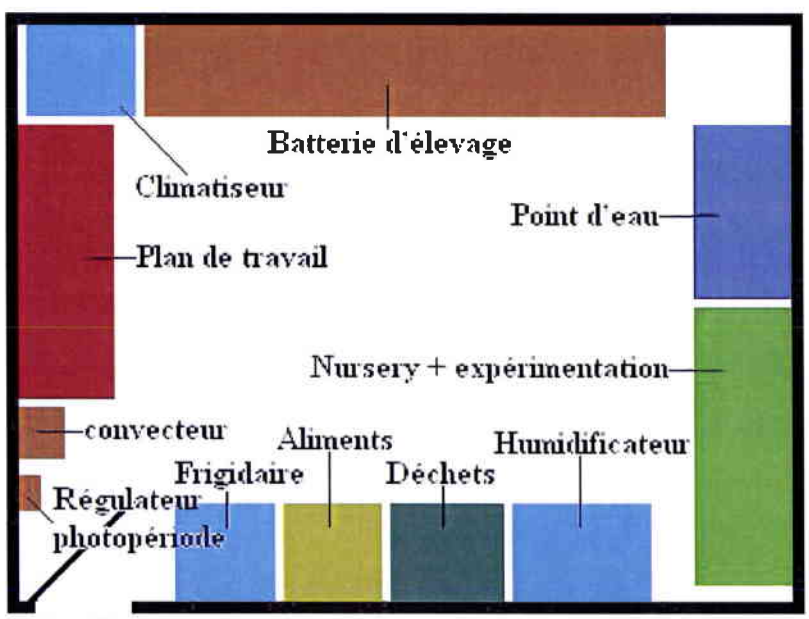


Figure 29 : Schéma de la salle d'élevage.

b. Eclairement

Concernant l'éclairement, la reproduction, l'incubation, la nursery ainsi que la croissance se déroulent à une photopériode de 12 heures d'éclairement. L'éclairage est fourni par des tubes fluorescents du type lumière du jour (IRC : 85 et efficacité lumineuse : 90). Il faut impérativement respecter une puissance de 10 à 15 watts par m^2. L'intensité lumineuse est de 50 à 100 lux (selon qu'on utilise des bacs en plastiques transparents ou des cages spécifiques escargots en PVC gris). La photopériode est réglée par une horloge électrique.

c. Température

Pour ce qui est de la température, toutes les étapes de l'élevage se déroulent à 20 ± 2°C. La température baisse au moment du nettoyage de façon plus ou moins marquée selon la saison (la température de l'eau varie de 6 à 14°C entre l'hiver et l'été). Le local est thermostaté avec, selon la température extérieure, soit la mise en marche d'un climatiseur de marque Luxaire monobloc LPM 07 avec un bac de condensation qu'il faut vider fréquemment compte tenu de l'hygrométrie du local, soit la mise en marche d'un convecteur électrique. Les thermostats réglant le climatiseur et le convecteur sont programmables (ERERCE INSTAT 2 – Type 52532)

d. Hygrométrie

Le degré d'hygrométrie est de 80 à 95%. Si on utilise des bacs en plastique jetables, l'humidité est assurée par du papier absorbant humide déposé sur le fond des bacs. Si on travaille avec les cages d'élevage pour escargots, un humidificateur assure le maintien du degré hygrométrique du local. L'appareil utilisé est de marque Astoria avec usage d'eau déminéralisée. Une surveillance du niveau de remplissage du bac de condensation du climatiseur est plus fréquente si l'humidificateur est mis en marche.

e. Alimentation (tableau 23)

Pendant la période de nursery (4 premières semaines d'élevage) : l'aliment utilisé est l'Helixal 1er âge. Pendant les phases de croissances et de reproduction, l'Helixal® 2ème âge est utilisé. Ces aliments (tableau 2) ont été conçus spécifiquement pour les escargots et sont fabriqués par les entreprises Lépine SA, 39130 Clairvaux-lès-Lacs, France.

Tableau 23 : Composition de l'aliment Helixal®

	g/100g					*Vitamines en U.I./kg*			*Métaux en mg/kg*					
Aliment	**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

f. Groupement des individus

Pendant la phase de reproduction en cage les escargots sont groupés par 5. Pendant la phase de nursery, les jeunes éclos sont placés au nombre de 80 par bac, soit 888/m^2. Deux à trois tris sont effectués après 3,5 – 4 et 4,5 semaines. Pour ce qui est de la croissance, approximativement 50 juvéniles post-nursery sont mis dans des bacs à souris jetables (100/m^2) puis leur nombre est régulièrement dédoublé au fur et à mesure des semaines afin de leur permettre une croissance optimale. Un trop grand nombre d'individus par bac aurait pour conséquence de freiner leur croissance en raison d'un effet de groupe négatif.

II.2. Matériel d'élevage (planche II_2, figure 1 à 4 ; planche II_3, figures 1 à 4)

Les cages d'élevage sont en PVC alimentaire gris comportant une porte en polycarbonate transparente. Ces cages, mises au point par l'Université de Besançon, ont été utilisées pour la reproduction. Une cage a une surface de collage d'environ 0,5 m^2 et un volume de 0,02 m^3. Ces cages sont équipées d'un axe rotatif qui traverse le rang de 6 cages, entraîné par un moteur électrique (AIRPAX 13V ; Hollande Réf. 9904/120/55606/0396) alimenté par un transformateur 220/12 V. Il est muni de buses d'arrosage. Les cages sont dites semi-autonettoyantes car on effectue un complément de nettoyage au jet après avoir fait fonctionner l'arrosage par les buses. Pour permettre la reproduction un pondoir est placé dans chacune des cages. Ces pondoirs ne sont autres que des pots de yaourt en verre (volume 140 à 180 cm^3) remplis de terreau horticole. Pour récupérer les pontes, il suffit de retourner le pot en verre et de ramasser les œufs à l'aide d'une petite cuillère. Pour l'incubation des pontes, des bacs à souris sont utilisés. Sur leur fond est placé du papier absorbant humide sur lequel sont espacés les œufs afin d'éviter une contamination éventuelle d'œufs sains au contact d'œuf contaminés.

II.3. Maintenance de l'élevage

Pour les bacs à souris comme pour les cages, le nettoyage est effectué 3 fois par semaine (lundi, mercredi et vendredi). Il est important de soigner les escargots à heures fixes et de façon régulière afin qu'ils s'habituent à un rythme d'activité et de nourriture. Le non-respect de cette règle peut compromettre la réussite de l'élevage.

Concernant les cages semi-nettoyantes, l'arrosage automatique est maintenu pendant une période approximative de 10 minutes par jour. Le complément de nettoyage s'effectue à la main. On laisse égoutter les cages 15 à 30 minutes, puis on dispose la nourriture dans une boite de Pétri (Ø : 50 mm). La fourniture d'eau dans une deuxième boite de Pétri a également été réalisée en période estivale.

Pour les bacs à souris, le nettoyage se fait manuellement. Du papier absorbant humide est placé au fond de ces bacs. La nourriture est alors mise dans une boite de Pétri et placée sur le papier.

En période de reproduction, un pondoir est placé du vendredi au jeudi de la semaine suivante. Les pontes sont alors récoltées et déposées dans le bac d'incubation. Pendant les périodes d'incubation et d'éclosion, il est nécessaire de surveiller l'humidité dans les bacs et de veiller à ce que le papier ne sèche pas, auquel cas les œufs pourraient se déshydrater, ou ne soit trop humide auquel cas les œufs éclateraient ou seraient attaqués par la moisissure.

Les éclosions commencent 12 à 14 jours après la ponte (planche II_3, figure 1). Les jeunes éclos restent tout d'abord en grappe sur le fond du bac, puis après quelques jours, ils commencent à migrer vers le couvercle. Pendant cette période, ils mangent le papier qui sert de substrat d'incubation. Quelques jours après cette migration (6 à 15 jours), les escargots nouveau-nés sont plus pigmentés et peuvent être « démarrés » pour la première phase d'élevage ou « nursery ». A ce stade, leur poids moyen est de 25 à 40 mg. La nursery se déroule dans les bacs à souris (planche II_3, figure 2).

A la fin de la phase de nursery, le tri des animaux de poids moyen égal 0,8 – 1,2 g est effectué afin d'obtenir une population la plus homogène possible soit pour effectuer des tests de toxicité sur des escargots âgés de 1 mois environ (un 1er tri est en général effectué après 3,5 semaines d'élevage ; ensuite, des tris successifs sont faits après 4 et 4,5 semaines), soit pour poursuivre la croissance sans traitement particulier (planche II_3, figures 3 et 4). 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.

Cette hétérogénéité a été expliquée par un comportement de cannibalisme des individus les premiers éclos sur les œufs (oophagie intra-spécifique) (Desbuquois, 1998). Selon l'auteur 70% des nouveau-nés ingèrent un œuf, voir deux, au cours des trois premiers jours. Ce cannibalisme n'est pas toujours constaté puisqu'il est possible d'obtenir 100% d'éclosion de jeunes après 4 semaines.

Planche II_2 : Elevage de *Helix aspersa aspersa* en laboratoire

1 Dispositif de cages semi-autonettoyantes. (échelle = 20 cm)

Dans chaque cage, on place 5 géniteurs, des coupelles avec la nourriture Helixal© 2ème âge, un pondoir.
A : Axes rotatifs avec buses d'arrosage dans chaque cage ;
G : Gouttières de récolte de l'eau de nettoyage amenant l'eau à une évacuation d'eaux usées.

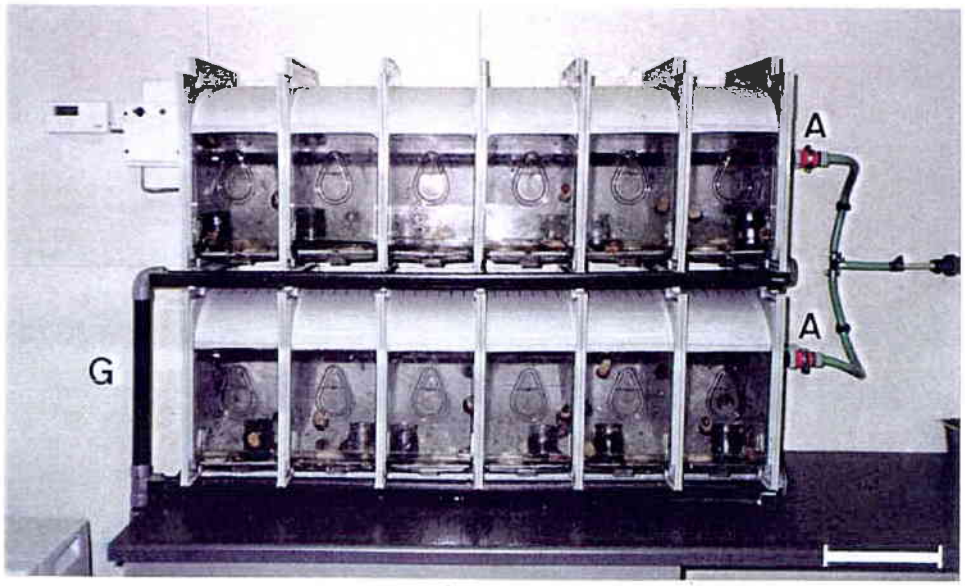
2 Détail de deux cages avec escargots matures. (échelle = 2 cm)

EP : Escargot en ponte ;
EA : Escargots accouplés ;
F : Farine Helixal© 2ème âge;
P : Pondoir avec terreau horticole.

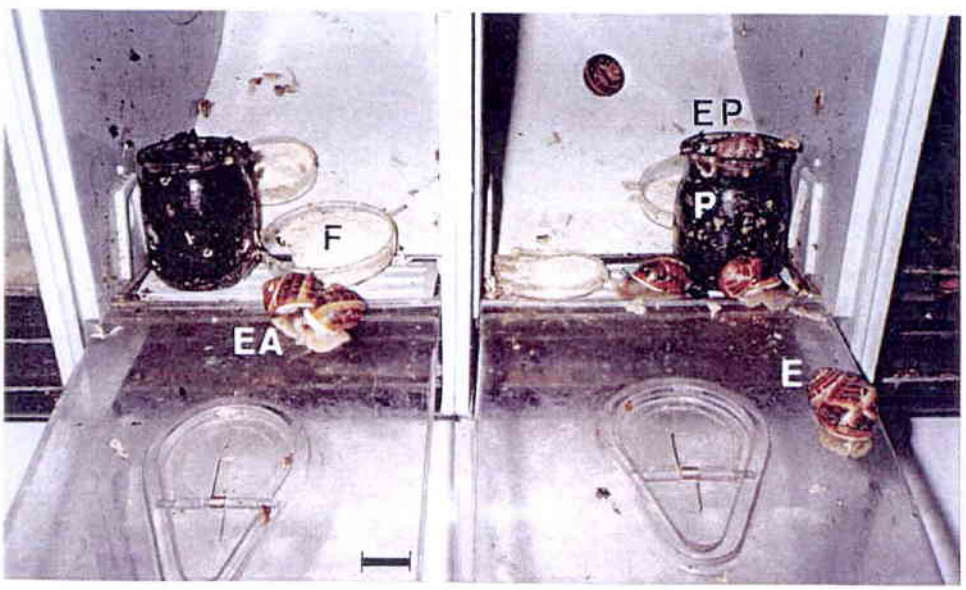
3 Détail d'un pondoir avec une ponte (O) déposée en profondeur. (échelle = 1,5 cm)

4 Dispositif d'incubation des œufs sur papier absorbant humide et élimination de la terre par lavage à l'eau (O : œufs). (échelle = 2cm)

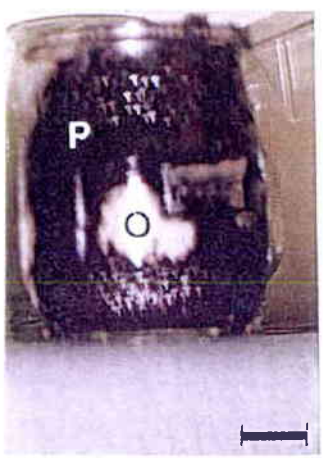
Planche II_2



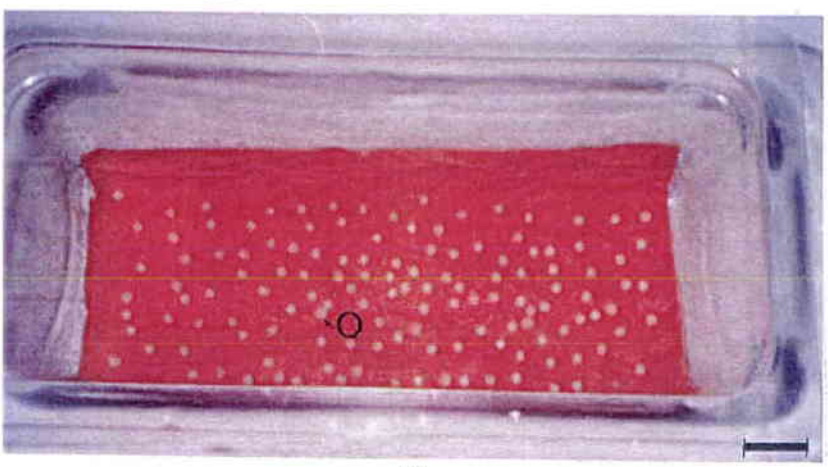
1



2



3



4

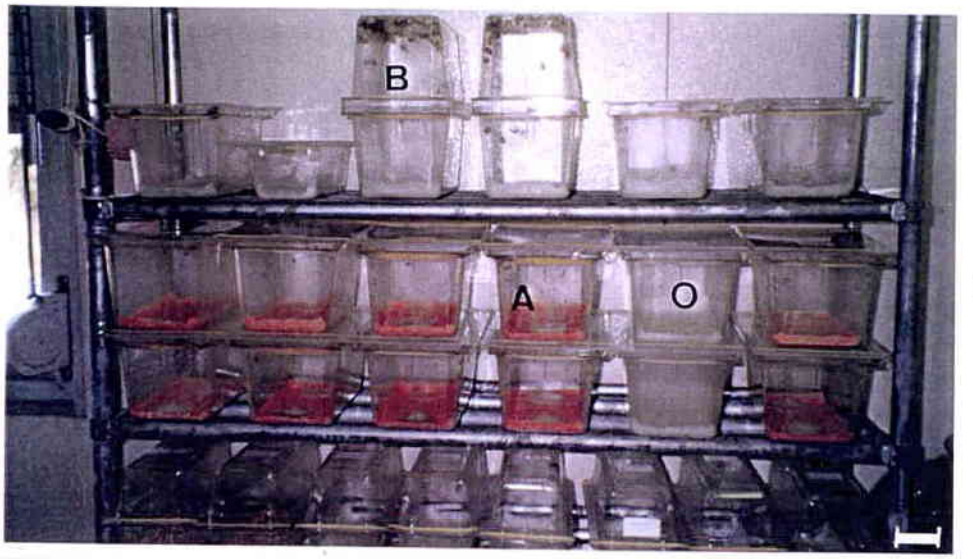
Planche II_3 : Matériel d'élevage d'*Helix aspersa aspersa*

1 Portoir en acier inoxydable avec boites à souris (IFA - CREDO) contenant des pontes en éclosion (O), des jeunes en cours d'éclosion (A) et des jeunes âgés de quelques jours (B). A ce stade, deux boites renversées l'une sur l'autre permettent d'augmenter le volume, les jeunes se placent sur le haut de la cage.(échelle = 5 cm)

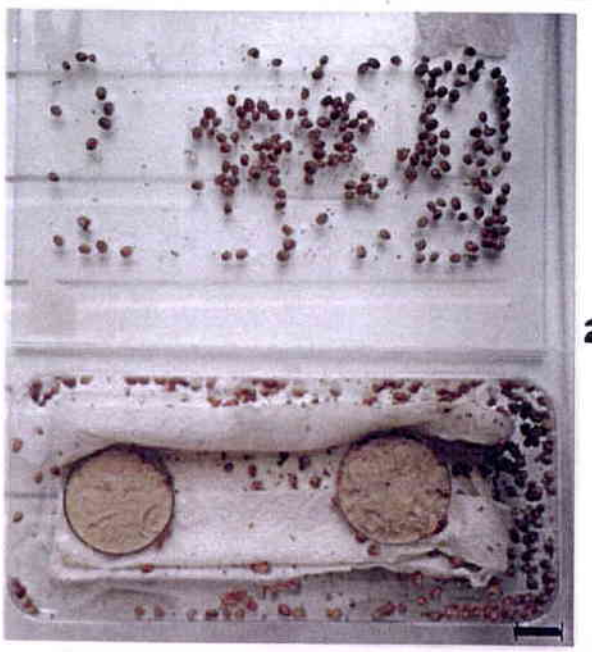
2 Jeunes *Helix aspersa aspersa* avec nourriture Helixal© 1er âge. (échelle = 2 cm)

3 et 4 Animaux en grossissement âgés de 1 mois et avant tri de sélection. Les individus plus petits (flèche) sont retirés. (échelle = 2 cm)

Planche II_3



1



2



3



4

Chapitre III : Monitoring actif et passif

Le monitoring passif fait appel aux individus récoltés sur le site. Dans ce cas, on ne connaît pas avec certitude l'âge des individus ni les dimensions exactes du territoire qu'ils ont fréquenté et sur lequel ils ont prélevé leur nourriture.

Le monitoring actif utilise des individus obtenus en élevage dans des conditions contrôlées (*Cf.* chapitre II.1.) puis transférés sur le site à étudier dans des microcosmes limitant leur déplacement et leurs sources de nourriture.

Un microcosme est constitué d'une cage sans fond, carrée (0,5 m de côté sur 0,2 m de haut). Cette cage est faite en PVC blanc et possède un couvercle amovible composé d'un grillage en PVC blanc (maille de 5 mm). Ce grillage permet la pénétration dans la cage de la lumière, de l'air et de l'eau, mais ne permet pas aux escargots de s'échapper. La cage est enfoncée sur le site à étudier sur une profondeur de 5 cm environ. La végétation est conservée apportant aux escargots la nourriture du site exposé (planche II_4, figures 1 et 2).

Le monitoring passif a été utilisé sur les sites suivants :

- *Helix pomatia* de référence pour le site de Jouy-aux-Arches (Moselle)
- Bordure d'autoroute (A31/A7) et routes (N7) ainsi que pour les animaux de références pour les espèces méridionales
- Mine de Léouvé (Alpes Maritimes)

Le monitoring actif a été utilisé sur les sites suivants :

- bordure d'autoroute (A31) sur deux sites (Bouxières-sous-Froidmont et Maizières en Moselle)
- site de Jouy-aux-Arches puis à Mallancourt-la-Montagne (Moselle)
- site d'aciérie électrique (Meurthe et Moselle)

Planche II_4 : Biomonitoring actif (figures 1 et 2) et minéralisation du matériel biologique pour analyse SAA (figures 3 et 4)

1 Microcosme constitué d'une cage carrée avec grillage à la face supérieure. (échelle = 12,5 cm)

2 Expérience de monitoring actif sur le site de Jouy-aux-Arches avec transfert d'*Helix pomatia*. (échelle = 5 cm)

Cage ouverte afin de montrer la végétation en place, des morceaux de tuile servant d'abri aux escargots. 4 piquets permettent de tenir la cage en place. Les côtés de la cage sont, par ailleurs, enfoncés de 5 cm dans le sol qui est ensuite rabattu sur les flancs et tassé.

3 De gauche à droite :

- Coquille de *Helix aspersa aspersa*
- Tube contenant la masse viscérale sèche d'un individu
- Tube contenant le pied sec d'un individu
- Tube après minéralisation à l'acide nitrique
  Notez l'absence de résidus non minéralisés.
- Coquille vide de *Helix pomatia* non minéralisée

4 Dispositif de contention des tubes pour la minéralisation à l'acide nitrique.

Les vis permettent de serrer la planche supérieure contre les bouchons et éviter la perte de vapeurs.

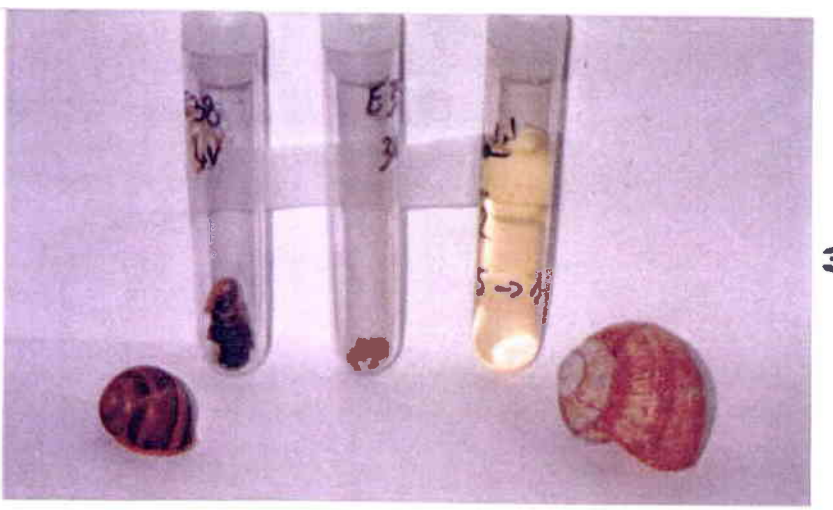
Planche II$_4$



1



2



3



4

Chapitre IV : Contamination en laboratoire (planche II_5, figures 1 à 3)

La contamination en laboratoire a permis d'obtenir de jeunes escargots *Helix aspersa aspersa* en vue d'une étude en histologie (microscopie optique et électronique et microanalyse). Ces expérimentations ont été réalisées dans des bacs à souris (*Cf.* chapitre II.2) en utilisant trois méthodologies :

- La première expérience préliminaire consiste en une contamination à différentes concentrations (5, 10, 25, 50 et 75%) de seulement la nourriture soit par des poussières d'aciérie, soit par de la poudre de plomb pur, soit par de la poudre de zinc pur, les escargots ayant comme substrat du papier absorbant humide.
- La seconde consiste en une contamination d'un substrat (sol de référence désigné S0 et provenant de la ferme expérimentale de la Bouzule (ENSAIA de Nancy, Meurthe et Moselle) contaminé à différentes concentrations (5, 10 et 25%) par des poussières d'aciérie. Les escargots reçoivent dans ce cas soit une nourriture Helixal® $2^{ème}$ âge non contaminée soit une nourriture Helixal® $2^{ème}$ âge contaminée par des poussières d'aciérie aux mêmes concentrations que pour le substrat.
- La troisième expérimentation est identique à la seconde avec un substrat qui se compose d'un sol artificiel normalisé (*Cf.* ci-dessous IV.2.3. b)

Pour réaliser les expériences, la granulométrie des poussières d'aciérie et des poudres de plomb ou de zinc a été fixée à un maximum de 2 mm par passage au travers d'un tamis en acier inoxydable à mailles carrées de 2 mm. La poudre tamisée présente des particules variant de 0,51 à 0,82 µm. La poudre de plomb (Aldrich) présente des particules d'un diamètre moyen variant de 0,38 à 50 µm. La poudre de zinc (Aldrich) présente des particules d'un diamètre moyen variant de 0,57 à 13,2 µm.

Comme les escargots consomment du sol sur lequel ils se déplacent, la contamination soit de la nourriture, soit du sol, soit des deux simultanément, permet d'apprécier les voies de contamination (orale et cutanée) en présence de métal particulaire. En effet, dans l'expérimentation réalisée, la contamination par voie pulmonaire ne semble pas possible (arrêt des particules, au niveau du pneumostome, avant la chambre pulmonaire) Les effets sur la croissance sont mesurés chaque semaine pendant 4 semaines. Les essais sont réalisés sans renouvellement du substrat tandis que la nourriture est renouvelée 3 fois par semaine.

Les résultats obtenus, lors des essais, sont comparés à ceux d'un essai témoin sans contamination des substrats et de la nourriture.

IV.1. Environnement des expériences

Les expériences sont réalisées à la température de 20 ± 2°C sous une photopériode de 12h L – 12 h O et à une humidité ambiante de 80 à 95% (*Cf.* II.1.)

IV.2. Matériels

IV.2.1. Matériel biologique

Le matériel biologique est constitué d'escargots juvéniles *Helix aspersa aspersa* âgés de 1 mois et dont le poids frais moyen est de 1 ± 0,2g.

Les escargots utilisés proviennent d'un élevage standardisé synchrone pour former une population aussi homogène que possible du point de vue de la taille, de la masse et de l'âge).

a. Substrat de sol de référence S0

Le sol de référence S0 est un sol naturel. Il provient de la Bouzule (ferme expérimentale de l'ENSAIA de Nancy, Meurthe et Moselle) et a été préparé par l'IRH de Nancy en vue d'une utilisation dans le cadre d'un programme ADEME. Le sol S0 doit être tamisé après séchage à l'air dans un tamis en acier inoxydable à mailles carrées de 2 mm et conservé conformément à la norme l'ISO 10381-6 puis humidifié comme le sol artificiel pour être utilisé comme substrat d'élevage.

b. Substrat de sol artificiel

Le substrat appelé « sol artificiel » répond à la composition suivante (telle que définie par la norme ISO-11268-2) :

	En pourcentage de la masse sèche
Tourbe de sphaignes, blonde séchée à l'air, finement moulue, exempte de tout résidu végétal visible	10%
Argile kaolinique, contenant au moins 30% de kaolinite	20%
Sable de quartz industriel (contenant en majorité 50% des grains dans la classe de granulométrie de 0,05 mm à 0,2 mm)	70%

Du carbonate de calcium ($CaCO_3$) pulvérisé, de qualité analytique reconnue, est ajouté en quantité suffisante (généralement entre 0,5 et 1% de la masse des ingrédients secs). L'objectif de cet ajout, est d'amener le pH du substrat humidifié à 6,0 ± 0,5.

Le sol artificiel ainsi préparé est humidifié avec de l'eau distillée pour atteindre une teneur en eau comprise entre 40% et 60% en masse de la capacité totale de rétention en eau, déterminée conformément à la norme ISO 11274. Pour une préparation de 140g de sol artificiel sec, il est nécessaire de rajouter un poids en eau de 42,5g afin d'obtenir 50% de la capacité de rétention en eau.

Nota : dans des expériences récentes (programme PNETOX) portant sur des sédiments artificiels de rivière, la tourbe est remplacée par de la cellulose d'origine connue. Cet ingrédient pourrait être également retenu pour la confection des sols artificiels en vue d'un « test escargot » normalisé.

c. Alimentation

L'alimentation est apportée sous forme de farine (Helixal 2ème âge) de façon à former un mélange homogène avec les contaminants. La farine Helixal utilisée permet d'obtenir, chez les témoins non contaminés, une croissance stable et très satisfaisante.

Planche II_5 : Expérience de contamination par des métaux particulaires en laboratoire

1 **Portoir avec, sur les étagères a et b, poursuite de l'élevage avec œufs en éclosion (O), jeunes en train d'éclore (E), jeunes en grossissement (G) et géniteurs en réserve (R).**

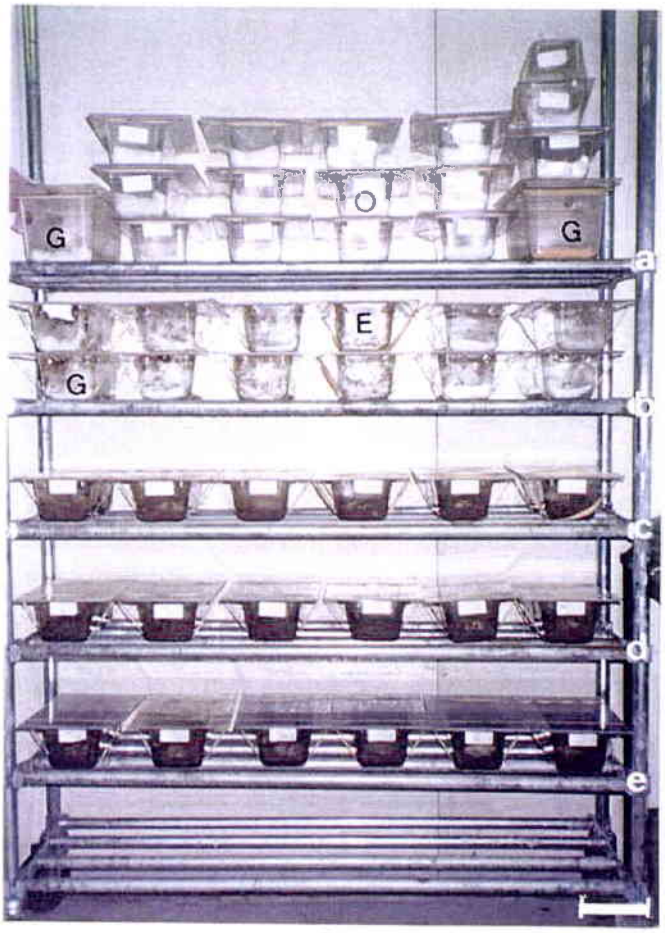
Sur les étagères c, d et e, expérience de contamination par ajout de poussières d'aciérie dans le sol désigné S0 (origine : La Bouzule). 3 cages par concentration et 3 cages pour la référence sol non contaminé. (échelle = 15 cm)

2 **Boite d'un lot de 5 individus de *Helix aspersa aspersa* sur sol non contaminé et nourriture Helixal ® 2ème âge non contaminée. (échelle = 2,5 cm)**

3 **Boite d'un lot de 5 individus de *Helix aspersa aspersa* sur sol contaminé par des poussières d'aciérie.**

Comparez la taille des individus avec ceux de la figure 2. (échelle = 2,5 cm)

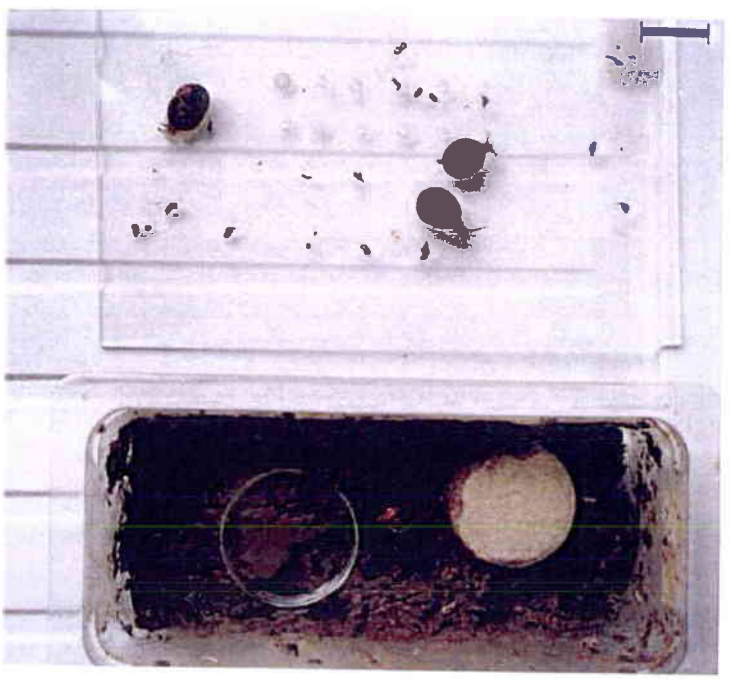
Planche II_5



1



2



3

IV.2.2. Appareillage

a. Récipients

Pour les expériences, des boîtes à souris à usage unique en polystyrène sont utilisées (réf. 080001 Ifa-Credo ; L = 24 cm, l = 10,5 cm, h = 8 cm). Les boîtes sont recouvertes par une plaque transparente en plexiglas de 26,5 cm x 13,5 cm, tenue en place par 2 élastiques pendant toute la durée des expériences. Ces plaques sont percées de petits trous afin de permettre la ventilation de la boîte.

La nourriture est distribuée dans des boîtes de Pétri de diamètre 5,5 cm et 1 cm de haut. Ces boîtes de Pétri sont en verre ou en plastique. Ces matériaux ne présentant pas d'interaction avec les substances expérimentées.

b. Environnement

Les boîtes à souris sont placées sur des étagères en acier inoxydable. L'ensemble est mis dans une pièce climatisée à la température de 20 ± 2°C et à un taux d'hygrométrie de 80 à 95%. La lumière provient de tubes fluorescents de type lumière du jour, d'une intensité de 50 à 100 lux avec un rythme d'éclairage journalier de 12 h L – 12 h O.

IV.2.3. Mode opératoire

La gamme de concentration choisie varie de 5 à 75% au cours de la première expérimentation. Au regard des premiers résultats la gamme de concentration a été réduite entre 5 et 25% en raison d'un trop fort taux de mortalité pour les concentrations les plus élevées. Trois répétitions ont été réalisées par concentration avec 5 escargots par concentration et par récipient. Le poids moyen, en début d'expérience, est de 1 ± 0,2 g.

Les contaminants utilisés sont des contaminants solides directement intégrés et intimement mélangés au sol artificiel, au sol S0 ainsi que dans la nourriture selon les différents pourcentages massiques désirés.

Les récipients reçoivent les mélanges ainsi préparés de substrats (témoins ou contaminés) à raison de 170 g environ par récipient pour les sols S0 et artificiel de manière à obtenir une couche d'environ 1 cm au fond de chaque boîte. Le substrat est étalé uniformément sur le fond du récipient avec une spatule en acier inoxydable. Il n'est pas renouvelé au cours des 4 semaines du test mais il est humidifié, si nécessaire, et mélangé une fois par semaine après avoir enlevé les excréments qui sont à la surface. Les excréments qui moisissent sur le substrat peuvent également être évacués lors des changements de nourriture.

La nourriture est placée *ad libitum* dans une boîte de Pétri de 5,5 cm de diamètre. Cette nourriture est renouvelée trois fois par semaine.

Les récipients sont placés dans la salle d'élevage décrite précédemment. Ils sont observés régulièrement et toute anomalie pouvant interférer avec le bon déroulement des essais est notée. Tous les 3 jours, la nourriture est renouvelée et les parois latérales des boîtes sont nettoyées avec du papier absorbant humide. Le couvercle est lavé à l'eau courante, puis séché et ré-humidifié par vaporisation d'eau distillée. Pour ce qui est des essais sur papier absorbant, la boite est complètement lavée à l'eau distillée et le papier absorbant recouvrant le fond de la boîte est changé et ré-humidifié. Chaque semaine, avant le changement de nourriture et le nettoyage des parois latérales et du couvercle, les escargots sont pesés individuellement (au 1/10 de g). La mortalité est notée.

Chapitre V : Analyse des métaux

V.1. Spectrométrie d'absorption atomique (planche II_4, figures 3 et 4 ; planche II_6, figures 1 et 2)

Les escargots, à jeun depuis trois jours afin de vider au maximum le tractus digestif de la nourriture contaminée non absorbée, sont traités par lots de 5 individus. Ils sont congelés jusqu'à l'analyse. Pour l'analyse des métaux, ils sont décongelés, extraits facilement de la coquille car le muscle columellaire est relâché, puis disséqués de façon à séparer le pied des viscères. Les viscères et les pieds sont pesés. Cette étude séparée des pieds et des viscères s'avère pertinente car l'animal accumule préférentiellement les micro-polluants dans différentes parties de son organisme. Les prélèvements sont séchés dans des tubes de 20 ml en polystyrène cristal (à usage unique) placés à 60°C durant plusieurs jours si nécessaire afin de pouvoir déterminer le poids sec. Cette température peut-être abaissée si le contaminant expérimenté est volatil.

Après séchage, on procède au broyage le plus fin possible, à l'aide d'un mortier.

On pèse 280 mg plus ou moins 10 mg (ou moins, si le poids de l'échantillon est trop faible) dans un tube de 20 ml en polystyrène cristal (à usage unique), dans lequel on ajoute 4,5 ml d'acide nitrique au ½ (planche IV, figures 3 et 4).

Les tubes sont bouchés et placés dans un portoir permettant de bloquer les bouchons par compression. Le portoir est ensuite placé, pendant 24 heures, dans une étuve à 65°C où l'attaque acide s'effectue sous pression. Après refroidissement des tubes, on ajoute 14,5 ml d'eau distillée.

L'analyse s'effectue en Spectrophotométrie d'Absorption Atomique en flamme (Perkin-Elmer 2380) pour le cuivre, le manganèse, le fer et le zinc (planche II_6, figure 2) et en Spectrophotométrie d'Absorption Atomique en four (Varian SpectrAA 300/400) pour le cadmium, le chrome, le nickel et le plomb (planche II_6, figure 1).

V.2. Analyse des isotopes du plomb

Les échantillons d'escargots sont préparés comme pour l'analyse des métaux en absorption atomique. La minéralisation est effectuée à l'acide nitrique ½ afin d'obtenir une solution à 2% d'HNO_3.

Les échantillons de sols et d'hydroxydes métalliques sont séchés, broyés puis tamisés à 0,5 mm. Après tamisage, l'échantillon est soumis au même traitement que les cendres d'aciérie et la poudre de plomb à savoir une minéralisation en présence de 10 ml d'acide nitrique (69%) par ébullition en reflux pendant 3 heures (180°C) suivie d'une réduction du volume de minéralisât à 2 ml puis après refroidissement d'un ajustement du volume à 50 ml.

La mesure des rapports $^{206}Pb/^{207}Pb$ et $^{208}Pb/^{207}Pb$ est réalisée par déviation, en fonction de leur masse, des isotopes ionisés dans un champ magnétique (spectromètre de masse). L'ionisation est obtenue par une source de plasma (ICPMS). L'ionisation thermique (TIMS) n'a pas été utilisée dans cette étude. La présentation détaillée de ces deux méthodes est effectuée par Hopper *et al.* (1991) ou Keinonen (1992).

Dans le traitement des données, seules les valeurs comprises dans l'intervalle : moyenne ± 2 δ sont conservées.

Chapitre VI : Méthodes histologiques (microscopie optique, électronique et microanalyse)

VI.1. Microscopie optique

Les techniques sont détaillées dans les traités de Lison (1953), Martoja et Martoja (1967) et Gabe (1968). L'animal est anesthésié par injection dans l'hémocoele de 0,02 ml/g d'escargot de solution de succinylcholine chloride (Sigma) à 1% (Burton, 1975) afin que l'animal sorte totalement son pied de la coquille. Après enlèvement rapide de la coquille les organes sont immédiatement prélevés (rein, glande digestive, intestin et pied). Chaque fragment tissulaire est immergé dans le liquide fixateur. Trois types différents de fixateurs ont été utilisés : le formol neutre à 10%, le Bouin Hollande et le liquide de Möller qui n'est autre que du formaldéhyde à 40% additionné à du bichromate de potassium à 3%.

Après l'étape de fixation et de lavage, l'échantillon subit une déshydratation par passage successif dans une série d'alcool de degré croissant (70°, 95° et 100°) puis dans trois bains de toluène.

Après la déshydratation, l'échantillon est imprégné pendant 24h par de la paraffine à la température de 56°, puis inclus dans la paraffine sous forme de blocs dimensionnés au moyen des barres de Leukart.

Les coupes peuvent être ensuite réalisées. Les blocs sont préalablement taillés afin de rendre apparent l'échantillon à couper. Les coupes, d'une épaisseur de 7 µm, s'effectuent à l'aide d'un microtome Leitz. Les coupes sont collées par de l'eau albumineuse sur une lame échauffée par une platine chauffante puis déparaffinées au toluène et hydratées par passages successifs dans des bains d'alcool de degré décroissant (100°, 95° et 70°) puis enfin dans de l'eau.

La réhydratation étant faite, les coupes peuvent être colorées. Les colorations utilisées sont de quatre types (Les techniques sont détaillées dans les traités de Lison (1953), Martoja et Martoja (1967) et Gabe (1968) :

- Après fixation au liquide de Möller, les sels de plomb apparaissent sous forme de cristaux jaunâtres de chromate de plomb. Une coloration topographique peut-être effectuée par le bleu de toluidine qui colore les noyaux en bleu. Un témoin est réalisé par comparaison et vérification des artéfacts possibles.
- Après fixation au formol ou au Bouin, différentes colorations complémentaires ont été utilisées :

    - Trichrome de Masson en un temps
    - Bleu alcyan, Hématoxyline de Groat, Orange G
    - Bleu de Toluidine

Après coloration, les lames sont déshydratées par passage dans une série d'alcool de degré croissant (70°, 95° et 100°) puis dans du toluène (trois bains).

Le montage final est achevé par utilisation d'un baume d'inclusion (EUKITT) et la pose d'une lamelle.

Les observations sont réalisées au moyen d'un microscope optique équipé d'un appareil automatique de prise de vue (microscope Leitz Dialux zo ; système de photographie automatique Leica et boîtier photographique) et d'une caméra haute définition permettant l'analyse d'image (Sony 3CCD ; logiciel « analysis » Olympus) (planche VI, figure 4).

VI.2. Microscopie électronique (planche II_6, figure 3)

La fixation des échantillons, prélevés comme décrit précédemment, est effectuée au glutaraldéhyde dans un tampon cacodylate 0,02 M (1 vol/1 vol) pendant deux heures à une température de 4°C. Ces derniers sont rincés dans un tampon de cacodylate 0,01 M (2 x 30 min au réfrigérateur). Une étape de post-fixation s'en suit au tétroxyde d'osmium à 1% dans un tampon de cacodylate (solution finale à 0,01 m) pendant 2 heures à température ambiante. Les échantillons sont ensuite rincés dans un tampon de cacodylate 0,01 M pendant 30 min. Il s'ensuit une déshydratation dans une série d'alcool de degré croissant (éthanol 30° pendant 5 min, 50° pendant 5 min, 70° pendant 10 min, 95° pendant 10 min et 100° deux fois 15 min).

Les échantillons subissent une phase d'imprégnation progressive par de la résine (R) qui est un mélange Epon-Araldite. Cette imprégnation s'effectue en quatre étapes successives en présence d'oxyde de propylène (O.P) :

- R 1/3 + 2/3 O.P. pendant 1 heure
- R ½ + ½ O.P. pendant 1 heure
- R 2/3 + 1/3 O.P. pendant 1 heure
- Résine pure pendant 12 heures

L'inclusion se fait dans un moule plastique à température ambiante puis le durcissement dans une étuve à 38°C pendant 1 heure et à 60°C pendant 48 à 72 heures.

Les échantillons sont coupés au moyen d'un ultra-microtome (LKB Ultratome V). Deux types de coupes sont faites :

- semi-fines (épaisseur 1µm) colorées au Bleu de Toluidine permettant la reconnaissance des structures concernées par la coupe
- fines (épaisseur 70 à 100 nm)

Les coupes fines sont recueillies sur une grille de 200 mesh en cuivre. Ces coupes sont contrastées par de l'acétate d'uranyle pendant 10 min puis par du citrate de plomb pendant 5 min selon Reynolds (1963).

L'examen de ces coupes se fait sur un microscope électronique à transmission JEOL CX 100 à 80 kV.

Parallèlement à cette préparation, une mise en évidence du plomb a été effectuée. Pour cela il y a eu un ajout au fixateur de 2 % de sulfure d'ammonium (ou de sulfure de sodium) pendant 2 heures. Les échantillons ainsi fixés ont été rincés par une solution de nitrate d'argent à 10% pendant 15 min et lavés dans un tampon tris-maléate trois fois de suite.

Les observations en microscopie électronique les plus représentatives des structures ont été photographiées. Le développement des plaques s'effectue en chambre noire photographique au moyen d'un révélateur (1 vol pour 9 vol d'eau), puis après rinçage à l'eau courante, elles sont fixées puis de nouveau rincées à l'eau courante et séchée à la température de la pièce.

Le développement papier se fait par l'usage d'un agrandisseur et à différents temps de pose selon le contraste du négatif.

Planche II_6 : Appareils d'analyse des métaux. Microscopie électronique en transmission. Analyse d'image

1 Spectrophotomètre d'absorption atomique en four (Varian SpectrAA 300/400) pour Cd, Cr, Ni et Pb.

2 Spectrophotomètre d'absorption atomique en flamme (Perkin-Elmer 2380) pour Cu, Mn, Fe et Zn.

3 Microscope électronique à transmission (MET) couplé à un spectromètre de dispersion d'énergie des photons X (EDXS) et d'un spectromètre de pertes d'énergie d'électrons transmis (PEELS) (Service de Microscopie Electronique de Nancy)

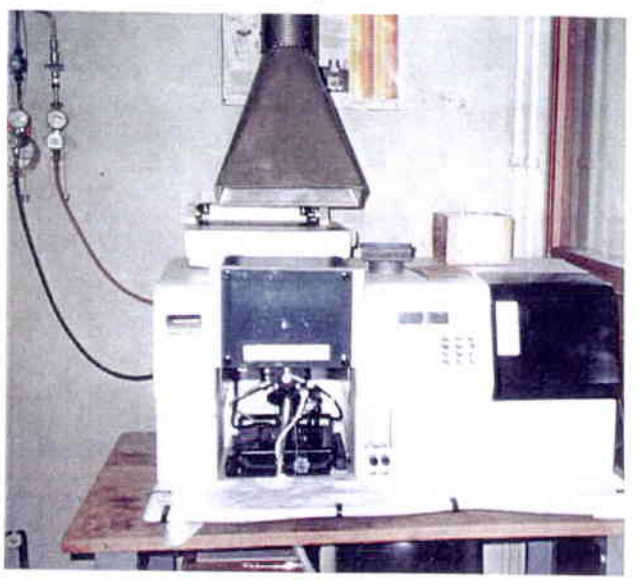
4 Analyse d'image.

Caméra Sony 3CCD (C) et à l'écran du micro-ordinateur (E), examen d'une coupe histologique de rein de *Helix aspersa aspersa* montrant des concrétions de tailles variées. Le logiciel Analysis de Olympus permet d'effectuer les mesures des diamètres des concrétions.

Planche II_6



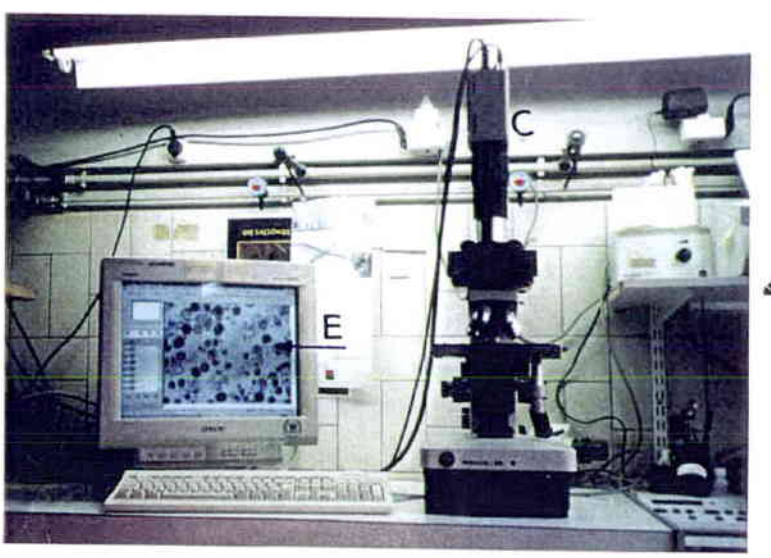
1



2



3



4

UNIVERSITE DE METZ
S.C.D.

VI.3. Analyse aux rayons X, spectre EEL et LAMMA

VI.3.1. Analyse X (planche II_6, figure 3)

Compte tenu de l'existence de références antérieures dans les travaux du laboratoire (Giambérini, 1993) et de synthèses destinées aux biologistes (Cajaraville, 1995), je ne citerai ici que l'essentiel des principes de l'analyse X.

Les échantillons destinés à l'analyse X ne subissent pas la post fixation au tétroxyde d'osmium. Des coupes fines sur ultra-microtome sont montées sur des grilles sandwich en nickel et ne sont pas contrastées à l'acétate d'uranyle et au citrate de plomb afin de ne pas interférer avec la recherche du plomb dans l'échantillon.

Quand un faisceau d'électrons bombarde un échantillon solide, un grand nombre d'interactions surviennent. En effet, plusieurs types de signaux sont émis. Les interactions sont de 2 types. Dans le premier type, il y a une diffusion élastique c'est-à-dire que l'électron est dévié par le noyau de l'atome sans variation d'énergie ($\Delta E=0$) mais avec un changement de direction ($\vec{k} \neq \vec{k}_o$). Le deuxième type d'interaction consiste en une diffusion inélastique c'est-à-dire que l'électron incident transfère une partie de son énergie sous forme de variation énergétique ($\Delta E \neq 0 \Rightarrow \lambda \neq \lambda_o$). Dans le cas de la diffusion inélastique, on distingue deux gammes de transfert d'énergie. En effet, il y a les faibles transferts avec excitation des photons ou réseau périodique du matériau, d'où production de chaleur (pertes d'$\approx$0,1 eV) mais aussi avec excitation des électrons de la bande de conduction générative des électrons secondaires (pertes de 0 à 50 eV) ou encore excitation des plasmons ou « gaz d'électrons libres ». D'autre part, il y a des transferts forts avec ionisation des niveaux électroniques profonds avec transfert d'énergie très variable (0,1 keV à 170 keV) et génération soit de photons X soit d'électrons Auger mais également freinage radiatif ou Bremstrahlung c'est-à-dire un ralentissement des électrons par le champ électromagnétique au voisinage du noyau atomique. Le spectre correspondant est continu avec un maximum d'énergie égal à l'énergie des électrons primaires.

La base de l'analyse X est l'exploitation des signaux X émis lors des diffusions inélastiques avec transfert important d'énergie.

La figure 30 illustre une interaction électron incident - électrons du cortège électronique avec départ d'un électron du niveau K et désexcitation par arrivée du niveau L.

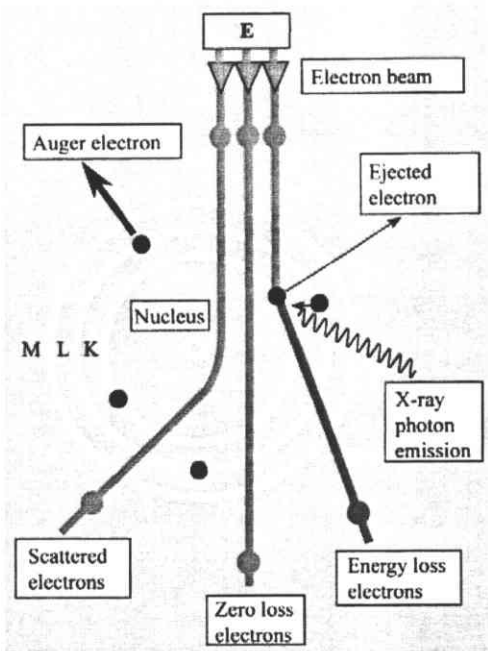


Figure 30 : Principe de l'interaction électron – matière

Le bilan énergétique est positif : $\Delta E=E_k-E_L$. Les énergies des différents niveaux du cortège électronique varient de façon discrète, il en est de même de leur différence. Cette énergie va permettre soit l'émission d'un photon X d'énergie ΔE caractéristique de la présence d'un élément donné dans la cible, soit l'émission d'un électron Auger qui est un électron de faible énergie sur lequel est transférée l'énergie ΔE.

Suivant le niveau de l'électron éjecté et celui de l'électron remplaçant, différentes raies sont émises. Les raies caractéristiques ainsi produites se superposent au spectre du rayonnement continu.

Le rôle d'un système de détection de rayons X est d'enregistrer les photons émis par le volume irradié et de déterminer pour chaque élément présent dans l'échantillon, les intensités des raies caractéristiques. L'analyse peut ainsi être réalisée soit par spectrométrie à dispersion de longueur d'onde (WDS) correspondant à la sonde de Castaing, soit par spectrométrie à sélection d'énergie (EDS), qui est la technique employée dans ce travail, couplée à un microscope électronique à transmission de type Philips CM20.

Ce microscope électronique à transmission, opérant à 200 ou 120 kV, est associé à un spectromètre de dispersion d'énergie (modèle EDAX). La taille de sonde est d'environ 14 nm.

Le spectromètre comprend :

- Un détecteur semi-conducteur en silicium-lithium qui transforme les photons émis par l'échantillon bombardé d'électrons en charges électriques proportionnelles à l'énergie des photons incidents. Le détecteur ou diode est protégé par une fenêtre très fine en béryllium (0,4 µm).
- Une chaîne analytique formée d'un préamplificateur, d'un amplificateur, d'un convertisseur analogique numérique, d'un rejet d'empilement, d'un analyseur multi-canal, d'un correcteur de temps mort et d'une mémoire de stockage.

Le spectre total émis par l'échantillon est analysé à l'aide du système informatique couplé au spectromètre par des méthodes qualitatives et semi-quantitatives. Le temps de comptage est généralement de 100 secondes, temps qui peut-être augmenté à 200 secondes.

L'objectif de l'étude étant qualitatif plus que quantitatif, le nombre d'individus analysé a été au maximum de trois. Un maximum d'individus étant conservé pour l'étude de la bioaccumulation en spectrométrie d'absorption atomique.

L'analyse X a principalement été utilisée pour les vérifications des observations histochimiques du plomb et pour un complément d'informations en ce qui concerne les autres métaux et les éléments essentiels du métabolisme.

VI.3.2. Spectre EEL

La spectroscopie de pertes d'énergie d'électrons transmis est une technique permettant l'identification des éléments présents dans l'échantillon. Les avantages de cette technique résident dans le fait que l'on s'intéresse à un processus à un processus primaire d'excitation. Les structures fines des pics, au niveau des seuils, renseignent sur l'environnement chimique des éléments analysés.

Les spectres EEL ont été enregistrés à l'aide d'un spectromètre Gatan 666 couplé au microscope électronique Philips CM20 opérant à 200 kV.

- Les conditions expérimentales sont les suivantes :
- Filament LaB6 : insaturé
- Diaphragme d'entrée : $2\beta = 20$ mrad
- Dispersion : 0,2 eV/canal
- La résolution en énergie mesurée à mi-hauteur du pic de perte zéro = 1,4 eV
- Taille de la zone analysée : 20 nm
- Temps d'acquisition des spectres :
  Afin d'améliorer le rapport signal bruit, plusieurs spectres sont accumulés.
  - Domaine de pertes faibles : 0,025 (s/spectre) x 100 (spectres = 2,5 s
  - Seuil K du carbone : 1,6 (s/spectre) x 5 (spectres) = 8 s

VI.3.3. Analyse laser (LAMMA)

Certaines coupes fines ont été étudiées par une autre technique non basée sur l'excitation des électrons.

La microanalyse par microsonde laser (Laser Microprobe Mass Analysis : LAMMA) utilise un rayon laser à la place du faisceau d'électrons. Le rayon laser de haute énergie perfore une section histologique selon un diamètre de 1 mm et forme un « plasma » de particules chargées et non chargées. Les ions sont séparés par un spectromètre de masse. Cette technique est également désignée LIMA : Laser Ionisation Mass Analysis et LPMS : Laser Probe Mass Spectrometry.

Les conditions opératoires de l'analyse laser sont les suivantes : $\lambda = 355$ nm, sensibilité = 120 mV, E = 100 µS, $I = 5.10^8$ w/cm^2.

L'utilisation de cette technique a permis de faire un premier screening de la composition élémentaire des granules rénaux suivi d'une analyse en spectre EEL.

VI.4. Analyse d'image (planche II_6, figure 4)

L'analyse d'image a été utilisée pour mesurer les granulométries des poudres de plomb et de zinc de certains protocoles expérimentaux, la granulométrie des poussières d'aciérie, la taille des sphérocristaux des cellules à calcaire de la glande digestive, la taille des concrétions des cellules rénales ainsi que la taille des particules phagocytées par les cellules intestinales.

Chapitre VII : Méthodes d'analyses statistiques

- Pour l'étude statistique, 5 à 9 animaux ont été testés pour chacun des lots. Les différences significatives ($P < 0.05$) ont été analysées suivant le test non-paramétrique de Mann-Whitney U test (Seigel, 1956).

- L'établissement du coefficient de corrélation linéaire a été effectué pour rechercher l'existence et la significativité d'une corrélation entre sa concentration dans l'aliment et la concentration en ce même métal dans l'organisme.

TROISIEME PARTIE :
Résultats
Les Gastéropodes et la Bioindication de la Contamination polymétallique

Chapitre I : Etablissement d'une grille de contamination polymétallique appliquée à *Helix aspersa aspersa*

L'étude des niveaux de concentration en métaux a pu être réalisée sur des individus adultes de *Helix aspersa aspersa* fournis par un ensemble d'héliciculteurs du GNPE. Les résultats ont fait l'objet de rapports exhaustifs (Pihan *et al*, 1994a, 1994b, 1996).

Nous reprendrons ci-après les résultats principaux ayant permis de définir des classes de contamination. Pour des raisons de confidentialité vis-à-vis des partenaires du GNPE, les noms des héliciculteurs et la désignation des sites ne sont pas indiqués. A ces lots du GNPE ont été ajoutés certains lots provenant de laboratoires associés au programme (Lycée Professionnel Agricole de Rivesaltes, Centre INRA du Magneraud et Université de Franche-Comté).

I.1. Screening des concentrations en cuivre (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa*

I.1.1. Concentrations en cuivre dans les pieds et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* provenant du milieu naturel (figures 31 a_1 et a_2)

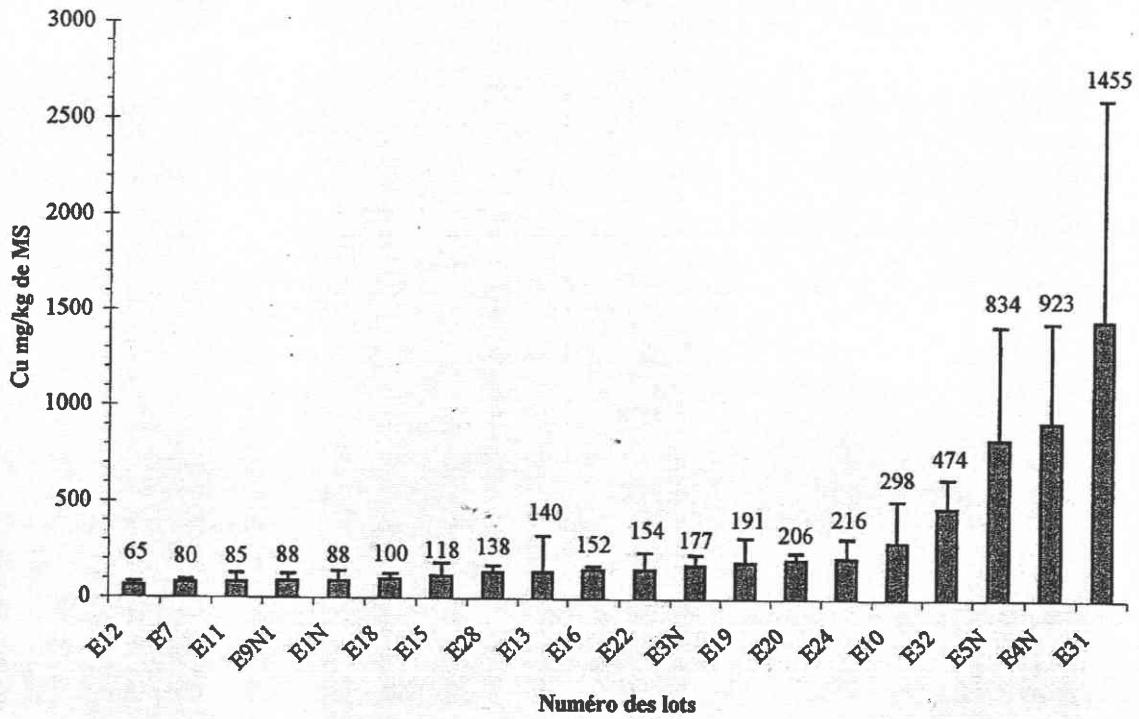
20 lots de 5 individus, provenant de différentes régions de France, ont été étudiés en séparant les pieds et les viscères. Les concentrations en cuivre sont plus élevées dans les pieds que dans les viscères, mais globalement, nous le verrons ci-dessous, les autres métaux étant en concentrations plus élevées dans les viscères, la grille de contamination comportant 4 classes a été fixée par rapport aux viscères (tableaux 23 et 24).

Selon cette grille, 10 lots relèvent de la classe I, 3 lots de la classe II, 3 lots de la classe III et 4 lots de la classe IV. Une recherche des activités anthropiques dans les stations prospectées met en évidence, pour les lots de la classe IV, une récolte sur d'anciennes vignes (E31) et pour les lots de la classe III un environnement proche d'exploitations viticoles. Cette activité est connue pour l'usage de sulfate de cuivre.

I.1.2. Concentrations en cuivre dans les pieds et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* provenant d'élevages (figures 32 b_1 et b_2)

24 lots de 5 individus ont été analysés en ce qui concerne les concentrations en cuivre dans les viscères et parmi ceux-ci, 20 ont donné lieu à l'analyse simultanée des concentrations dans les pieds. Conformément à ce qui a été signalé dans les lots prélevés en nature, les concentrations en cuivre sont supérieures dans le pied par rapport à celles dans les viscères. Par référence à la grille de contamination établie pour le cuivre dans les viscères, 10 lots relèvent de la classe I, 5 lots de la classe II, 2 lots de la classe III et 7 lots de la classe IV. Le classement d'un grand nombre de lots en classe IV oriente la recherche de la cause vers la qualité de l'aliment distribué d'autant que la formulation INRA comporte un ajout en sulfate de cuivre. Le lot d'élevage N6 présente la concentration la plus faible même inférieure à la plus basse concentration du lot E7 prélevé dans la nature. Par contre, le lot d'élevage E8 présente un niveau de contamination du même ordre de grandeur que celui du lot E31 prélevé sur une ancienne exploitation viticole. Le lot N9 qui a reçu un aliment non complémenté en CMV (sans sulfate de cuivre) relève de la classe I et peut être comparé aux lots B et P qui relèvent de la classe IV et ont reçu un aliment complémenté en sulfate de cuivre.

a_1 : Concentrations en cuivre dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* de la nature



a_2 : Concentrations en cuivre dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* de la nature

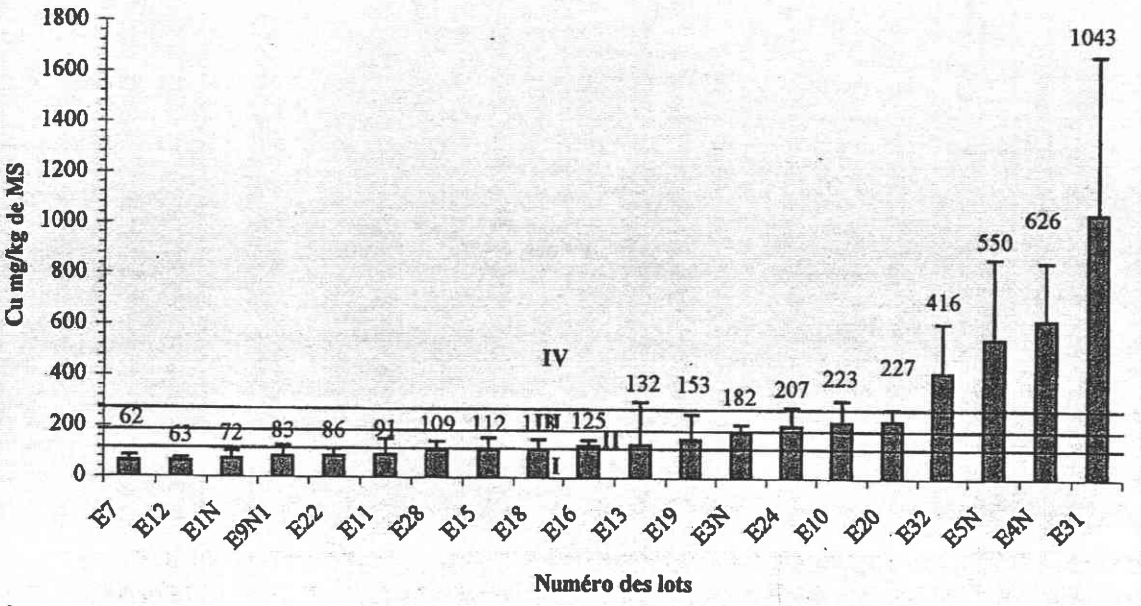
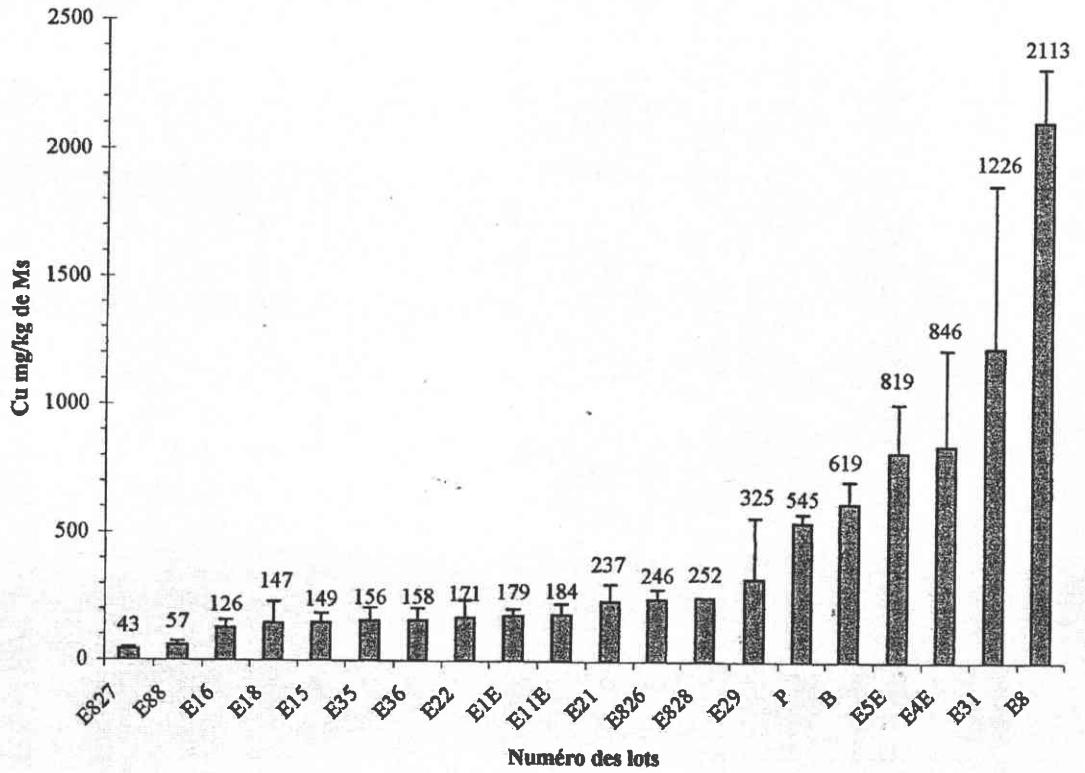


Figure 31 : Concentrations en cuivre dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'H*elix aspersa aspersa* de la nature

b_1: Concentrations en cuivre dans les pieds des Helix aspersa aspersa d'élevage



b_2 : Concentrations en cuivre dans les viscères des Helix aspersa aspersa d'élevage

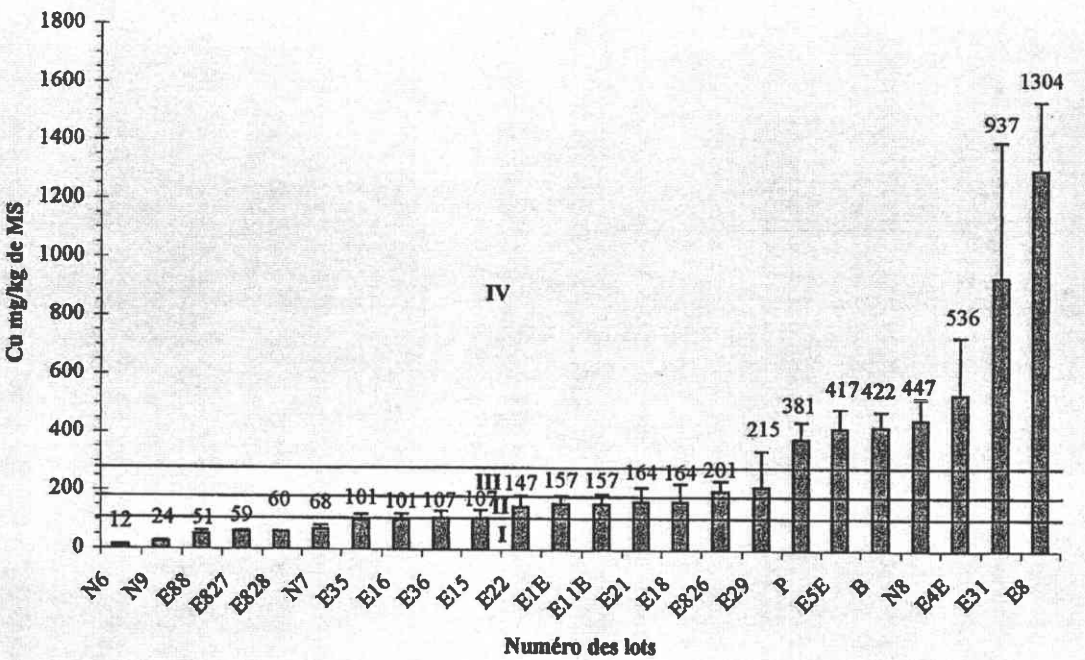
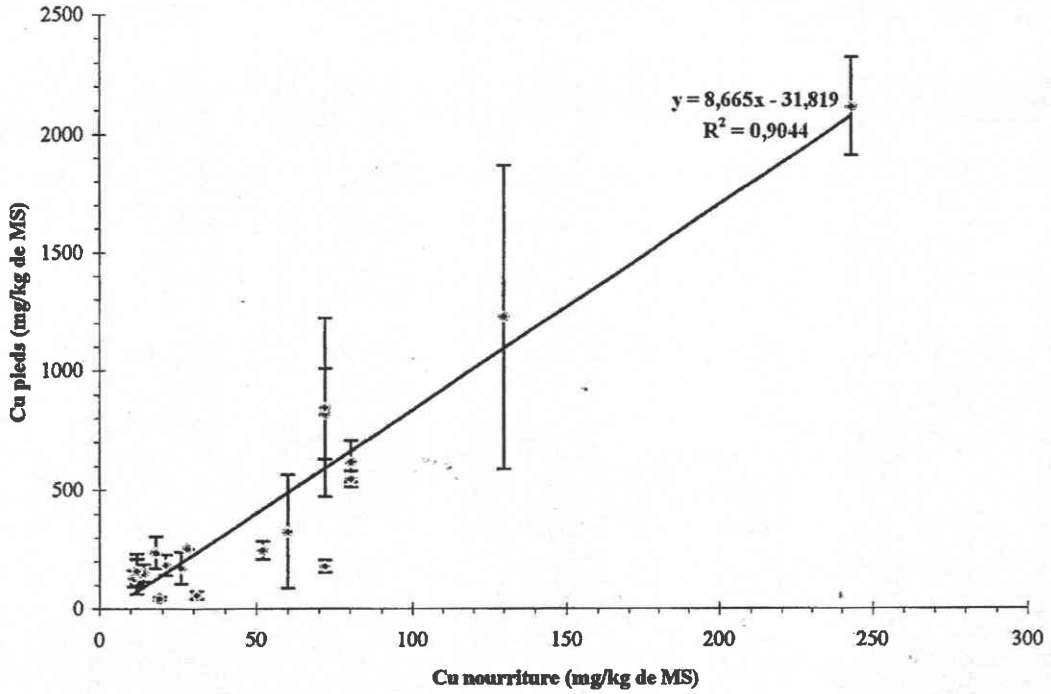


Figure 32 : Concentrations en cuivre dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'H*elix aspersa aspersa* d'élevage

c_1 : Concentrations en cuivre dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de la nourriture



c_2 : Concentrations en cuivre dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de la nourriture

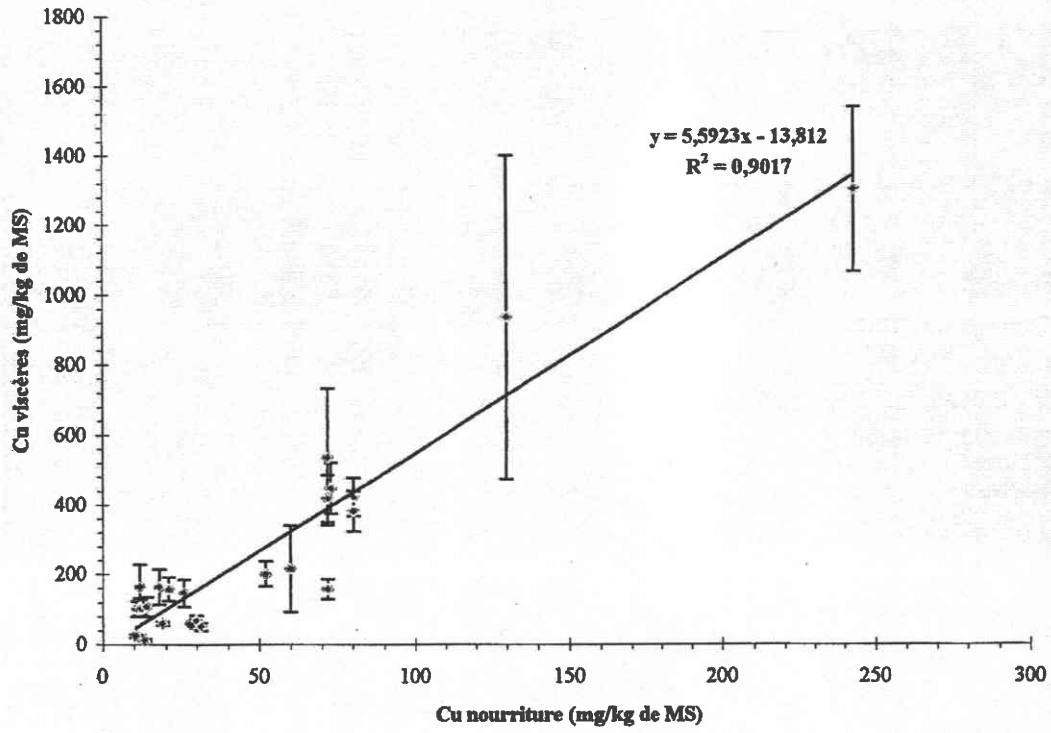


Figure 33 : Corrélation entre la concentration en cuivre dans l'aliment et la concentration en cuivre dans le pied (c_1) et dans les viscères (c_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

I.1.3. Etude de la corrélation entre la concentration en cuivre dans l'aliment et la concentration en cuivre dans le pied et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* provenant d'élevage (figures 33 c_1 et c_2)

Chaque héliciculteur ayant fourni un échantillon de l'aliment obtenu à partir de fournisseurs identifiés, l'existence d'une corrélation entre la concentration en cuivre dans l'aliment et la concentration en cuivre dans les escargots a été recherchée sur un effectif de 24 lots concernant les viscères et 20 lots concernant les pieds. Il existe une corrélation significative et positive entre la concentration en cuivre dans l'aliment et la concentration en cuivre dans le pied ou les viscères (R^2 : 0,904 pour le pied et R^2 : 0,902 pour les viscères). Cette étude est une étude globale et il faut tenir compte de la diversité des lieux de production, des techniques d'élevage (hors sol ou en parc) avec une mise à disposition de végétaux variés et un sol ayant supporté un nombre variable d'années de production. Les droites de régression se situent dans le domaine de la macroconcentration.

I.1.4. Conclusion

Conformément aux données bibliographiques, *Helix aspersa aspersa* est un macroconcentreur de cuivre et notre étude précise cette capacité pour le pied aussi bien que pour les viscères.

En ce qui concerne le lot N8 qui a donné lieu à une expertise du fait d'une mortalité survenant dans certains parcs, la concentration obtenue dans les viscères relève de la classe IV tout en étant loin de la concentration constatée dans le lot E8. Dans ce cas, plus que la concentration moyenne en cuivre contenue dans l'aliment, c'est surtout l'hétérogénéité de l'aliment qui est en cause. En effet, on peut constater, dans certains cas, une action létale lorsque l'animal est en contact direct par la bouche avec un grain de sulfate de cuivre. Ce constat nous a incité à proposer un abaissement de la concentration en cuivre permettant d'une part d'induire une plus faible concentration en cuivre chez l'escargot et d'autre part, diminuant le risque de la prise directe de sulfate de cuivre. La possibilité de réaliser l'élevage sans ajout de complément apportant le cuivre (expérience avec CMV ou sans CMV) est évoquée dans le paragraphe I.8.4.

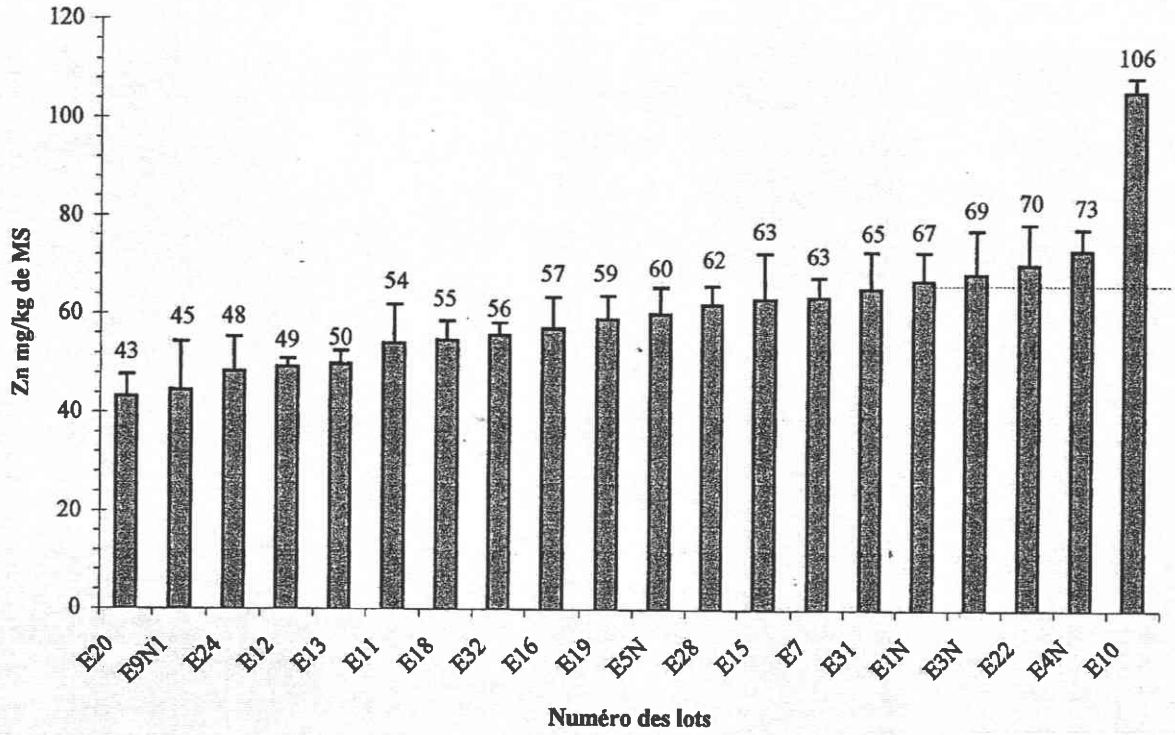
I.2. Screening des concentrations en zinc (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa*

I.2.1. Concentrations en zinc dans les pieds et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* provenant du milieu naturel (figures 34 a_1 et a_2)

Les 20 lots analysés pour le cuivre l'ont été également pour le zinc.

Les concentrations dans le pied varient d'un facteur x2,44 alors que celles des viscères varient d'un facteur x5 avec une concentration significativement supérieure dans les viscères. La grille de contamination s'applique aux viscères en mg/kg de MS de zinc. 7 lots relèvent de la classe I, 7 lots relèvent de la classe II, 5 lots relèvent de la classe III et 1 lot relève de la classe IV. Le lot E7 qui relevait de la classe I pour le cuivre, relève de la classe IV pour le zinc. Une recherche des causes éventuelles expliquant le classement met en évidence l'usage autour de chaque propriété de nombreux grillages galvanisés en atmosphère marin.

a_1 : Concentrations en zinc dans les pieds des *Helix aspersa aspersa* de la nature



a_2 : Concentrations en zinc dans les viscères des *Helix aspersa aspersa* de la nature

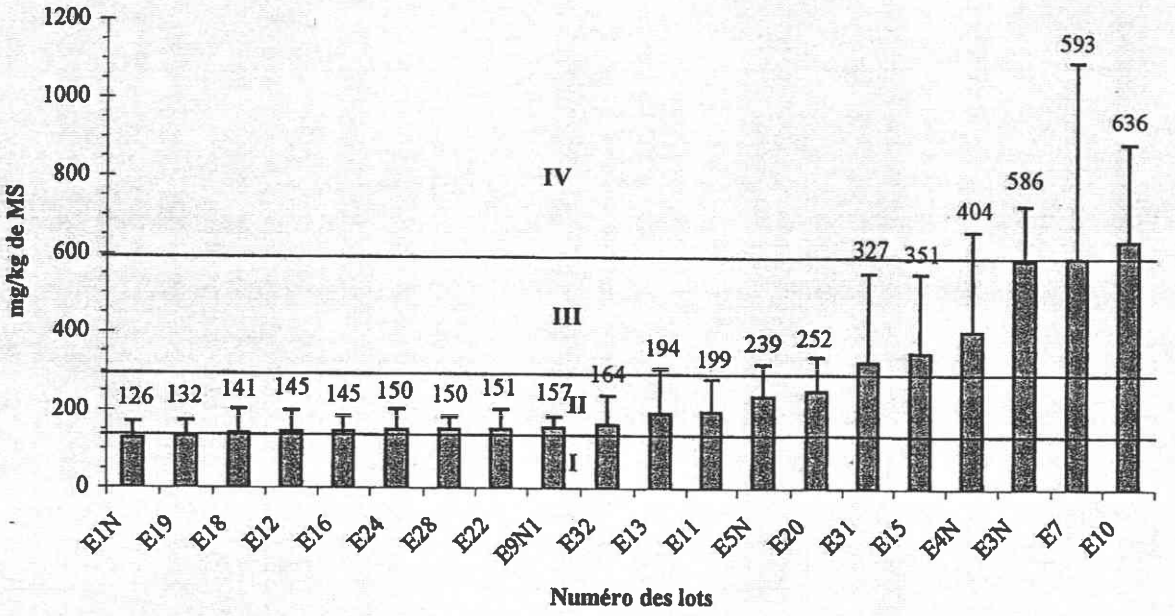
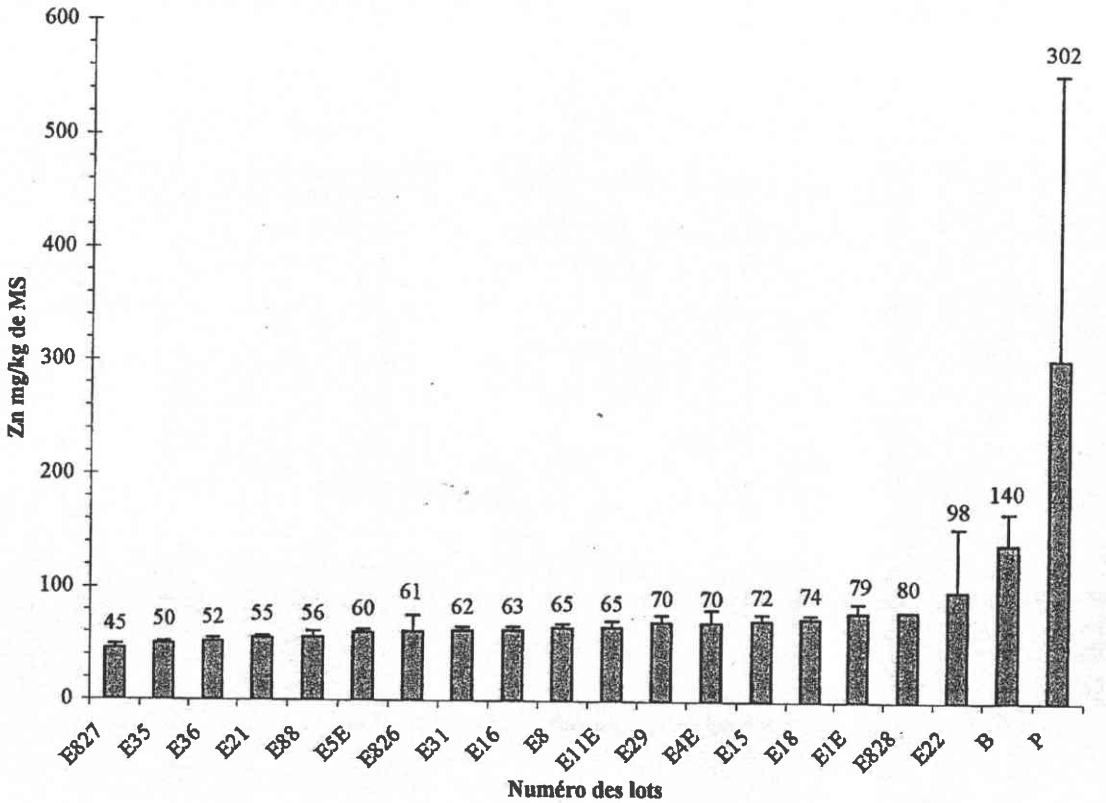


Figure 34 : Concentrations en zinc dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'H*elix aspersa aspersa* de la nature

b_1 : Concentrations en zinc dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage



b_2 : Concentrations en zinc dans les viscères d'*Helix aspersa apersa* d'élevage

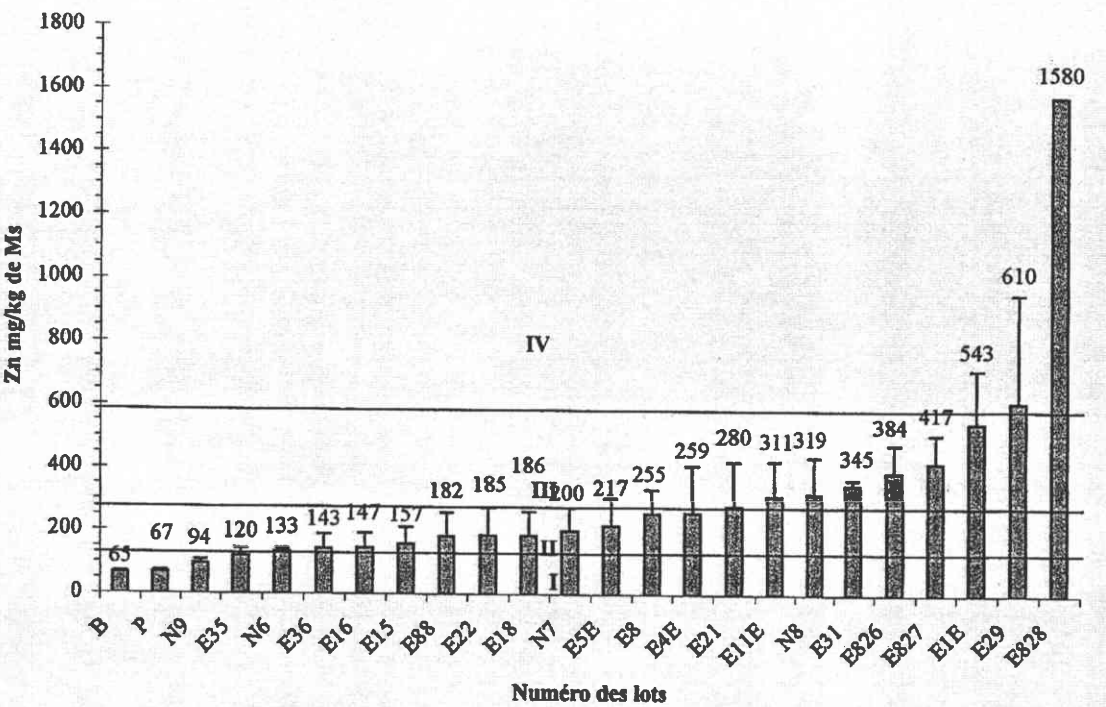


Figure 35 : Concentrations en zinc dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

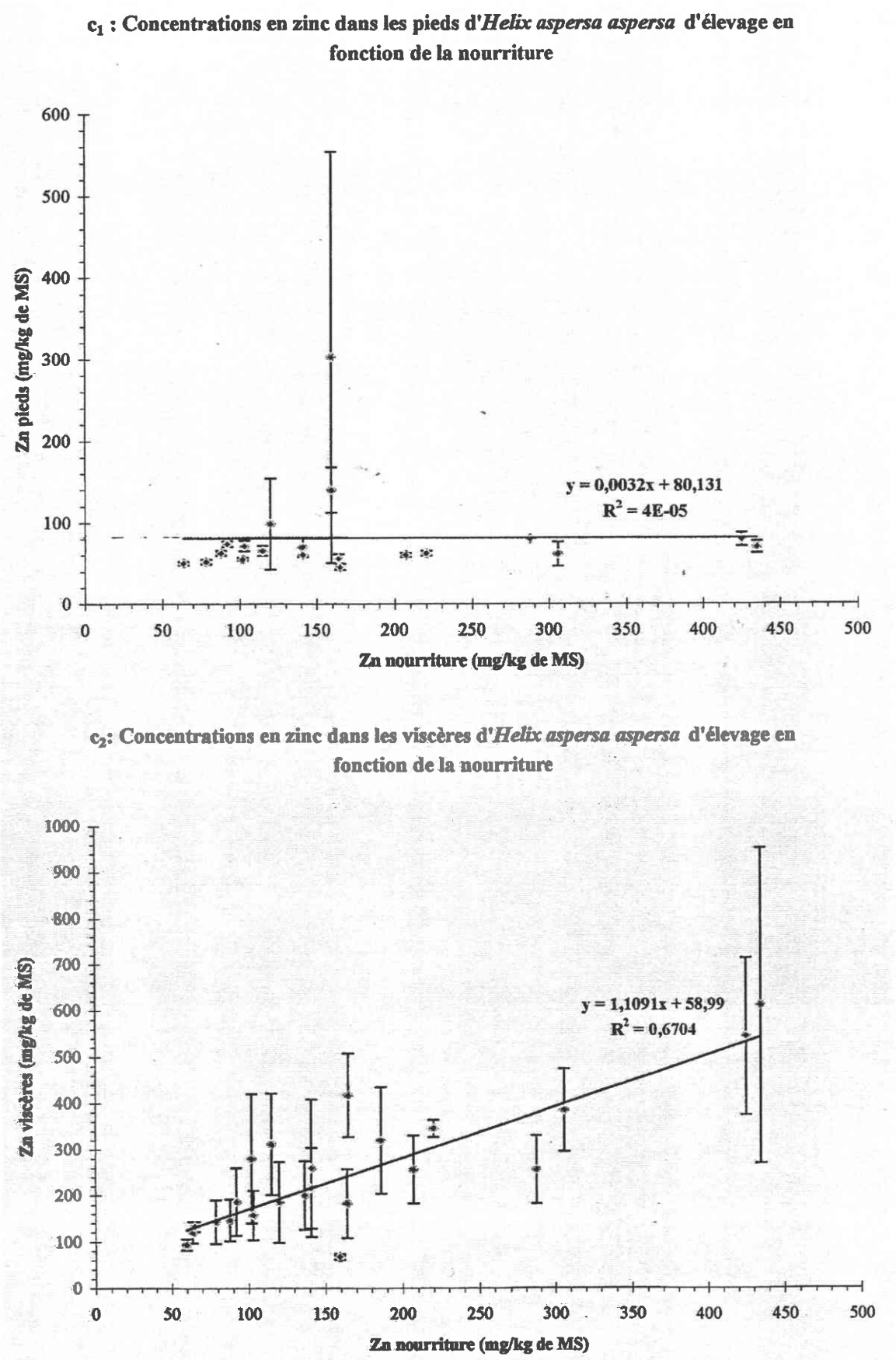


Figure 36 : Corrélation entre la concentration en zinc dans l'aliment et la concentration en zinc dans le pied (c_1) et dans les viscères (c_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

I.2.2. Concentrations en zinc dans les pieds et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* provenant d'élevages (figures 35 b_1 et b_2)

Les analyses ont été réalisées sur 20 lots pour les pieds et les viscères plus 4 lots pour uniquement les viscères.

Les concentrations en zinc dans le pied (20 lots, figure 35 b_1) varient peu entre les différents lots (45,4 mg/kg de MS pour le lot E827 à 302,2 mg/kg de MS pour le lot P) quel que soit la concentration en zinc dans l'aliment. Cette gamme de concentrations est identique à celle constatée dans le pied d'*Helix aspersa aspersa* provenant de la nature.

Les concentrations en zinc dans les viscères (24 lots, figure 35 b_2) varient d'un facteur x24,3 de la plus faible concentration (65 mg/kg de MS pour le lot B à 1580 mg/kg de MS pour le lot E828). Ceci met en évidence un organotropisme du zinc vers certains organes de la masse viscérale, vraisemblablement la glande digestive. 7 lots relèvent de la classe I, 9 lots relèvent de la classe II, 6 lots relèvent de la classe III et 2 lots relèvent de la classe IV). Cette gamme correspond à celle constatée dans les viscères de *Helix aspersa aspersa* provenant de la nature.

I.2.3. Etude de la corrélation entre la concentration en zinc dans l'aliment et la concentration en zinc dans le pied et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage (figures 36 c_1 et c_2)

La figure 36 c_1 montre qu'il n'y a pas de corrélation entre la concentration en zinc dans l'aliment et la concentration en zinc dans le pied. Par contre la figure 36 c_2 montre une corrélation significative et positive (R^2 : 0,67) avec une droite de régression se situant dans la plage de microconcentration. L'analyse limitée aux viscères permet, dans le cas du zinc, de retenir *Helix aspersa aspersa* comme microconcentreur de zinc, ce qui est une capacité non toujours vérifiée pour l'animal entier.

I.3. Screening des concentrations en cadmium (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa* à partir de lots d'*Helix aspersa aspersa* provenant de la nature et de lots d'élevage

I.3.1. Concentrations en cadmium dans les pieds et les viscères chez *Helix aspersa aspersa* provenant de la nature et d'élevage (figures 37 a_1 et a_2)

Compte tenu du petit nombre de lots ayant donné lieu à la recherche du cadmium, nous avons regroupé les données en provenance des lots d'élevage et des lots de la nature soit pour le pied (4 + 2 = 6 lots, figure 37 a_1) et pour les viscère (8 + 2 = 10 lots, figure 37 a_2).

Les concentrations en cadmium dans le pied sont inférieures à celles des viscères. Tous les lots d'élevage présentent une concentration moyenne en cadmium dans les viscères inférieure à 5 mg/kg de MS. Cette valeur a été choisie comme valeur seuil entre les classes I et II.

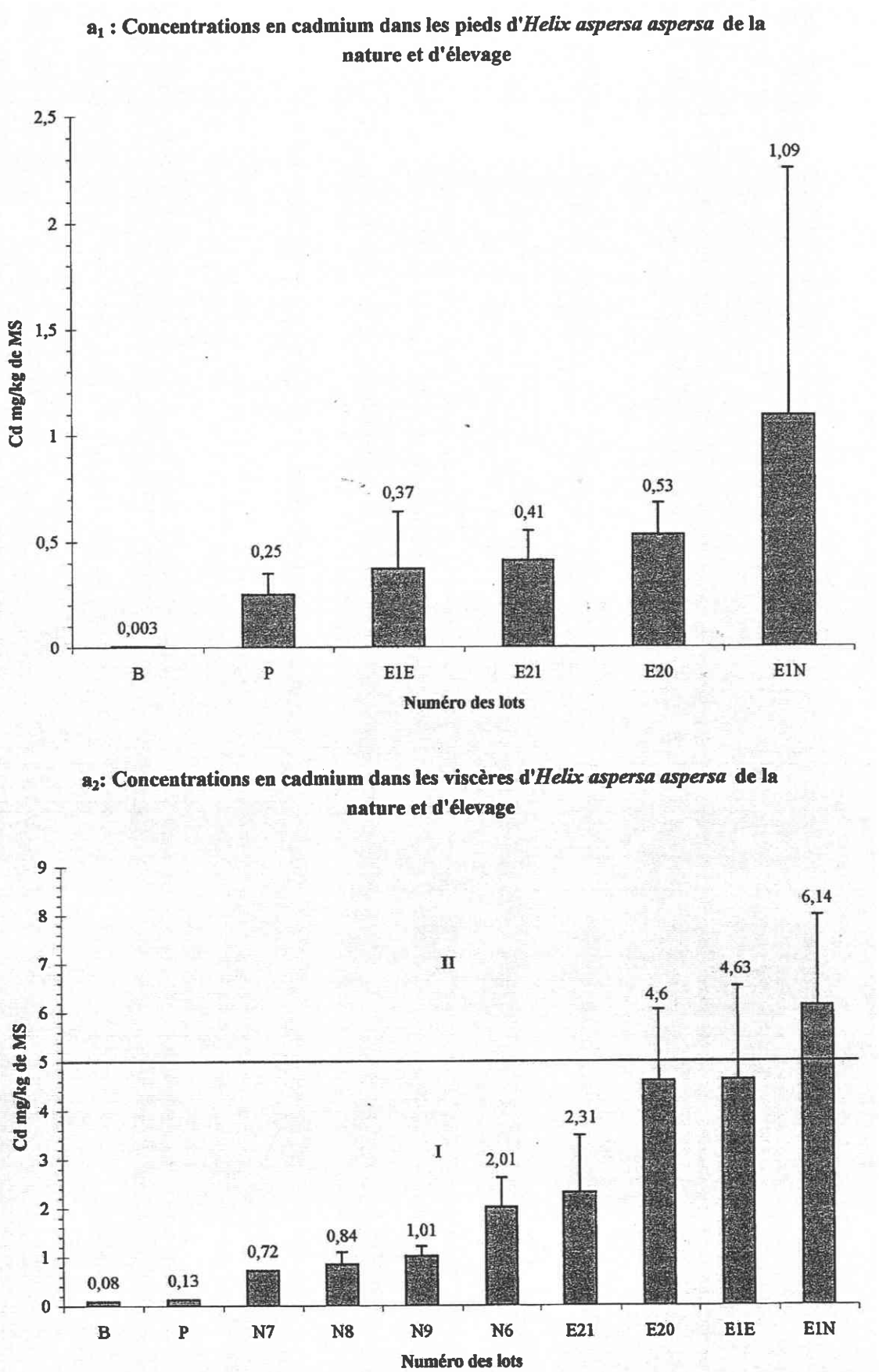
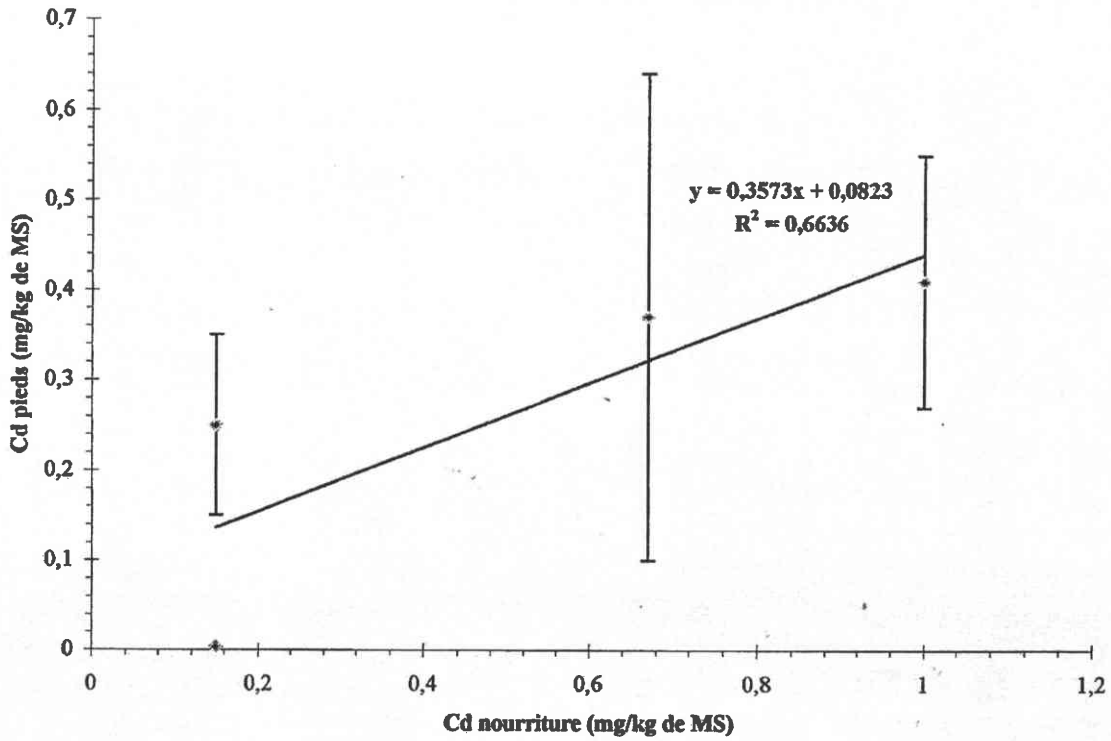


Figure 37 : Concentrations en cadmium dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage (E20 et E1N : lots de la nature ; autres lots : élevage)

b_1 : Concentrations en cadmium dans les pieds des *Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de la nourriture



b_2 : Concentrations en cadmium dans les viscères des *Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de la nourriture

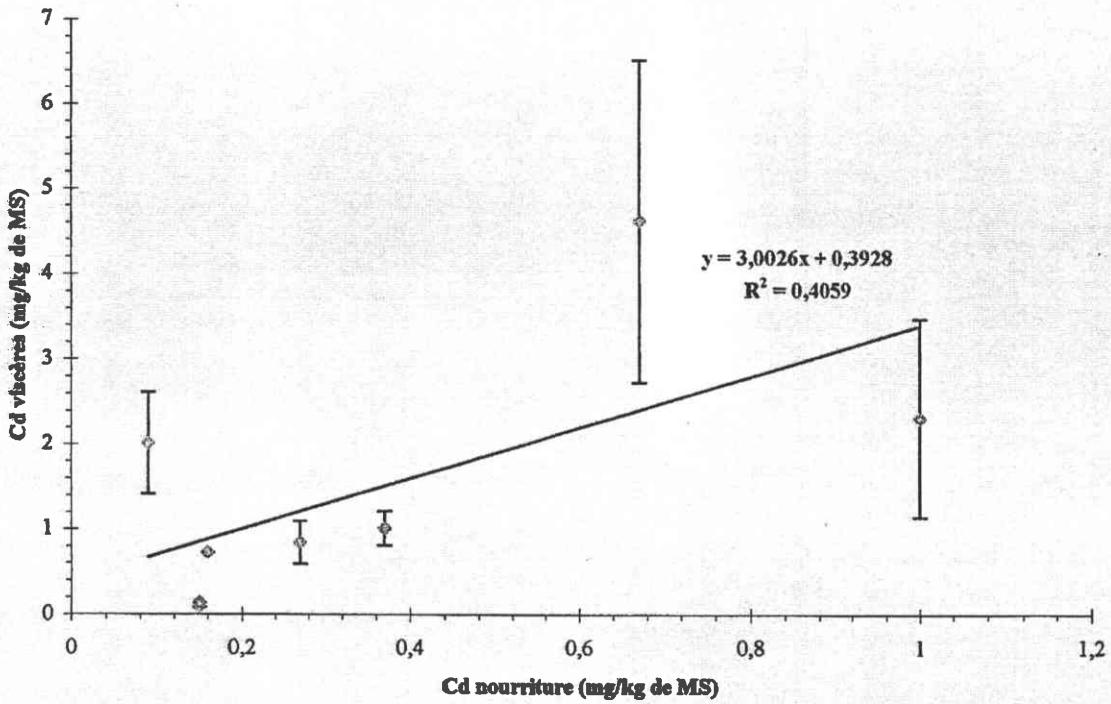


Figure 38 : Corrélation entre la concentration en cadmium dans l'aliment et la concentration en cadmium dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

I.3.2. Etude de la corrélation entre la concentration en cadmium dans l'aliment et la concentration en cadmium dans le pied et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage (figures 38 b_1 et b_2)

Les figures 38 b_1 et 38 b_2 mettent en évidence l'absence de corrélation entre la concentration en cadmium dans l'aliment et celle dans le pied ou les viscères. Pour les viscères, la droite de régression est située dans le domaine de la macroconcentration.

Le fait d'analyser séparément la masse viscérale permet de retenir *Helix aspersa aspersa* comme organisme macroconcentreur de cadmium.

I.4. Screening des concentrations en manganèse (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa*

I.4.1. Concentrations en manganèse dans les pieds et les viscères chez *Helix aspersa aspersa* provenant de la nature et d'élevage (figures 39 a_1 et a_2)

De même que pour le cadmium, compte tenu du nombre restreint de lots analysés en provenance de la nature les données en provenance des lots d'élevage et de la nature ont été regroupées.

Les concentrations en manganèse dans le pied (6 + 2 = 8 lots, figure 39 a_1) sont inférieures à celles dans les viscères (10 + 2 = 12 lots, figure = 39 a_2). La gamme de concentration se situe entre 12,1 et 25,27 mg/kg de MS.

Les concentrations en manganèse dans les viscères se situent dans une gamme de valeurs plus étendues que pour le pied (27,22 à 383 mg/kg de MS). 9 lots relèvent de la classe I, 1 lot relève de la classe II et 2 lots relèvent de la classe III).

I.4.2. Etude de la corrélation entre la concentration en manganèse dans l'aliment et la concentration en manganèse dans le pied et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage (figures 40 b_1 et b_2)

Les figures 40 b_1 et 40 b_2 mettent en évidence une corrélation significative entre la concentration en manganèse dans l'aliment et celle dans les viscères (10 lots) (R^2 : 0,774). La droite de régression pour les viscères se situe dans le domaine des déconcentreurs mais la bioindication du manganèse par l'analyse de concentration dans les viscères est possible. En ce qui concerne le pied (6 lots) la corrélation n'est pas significative.

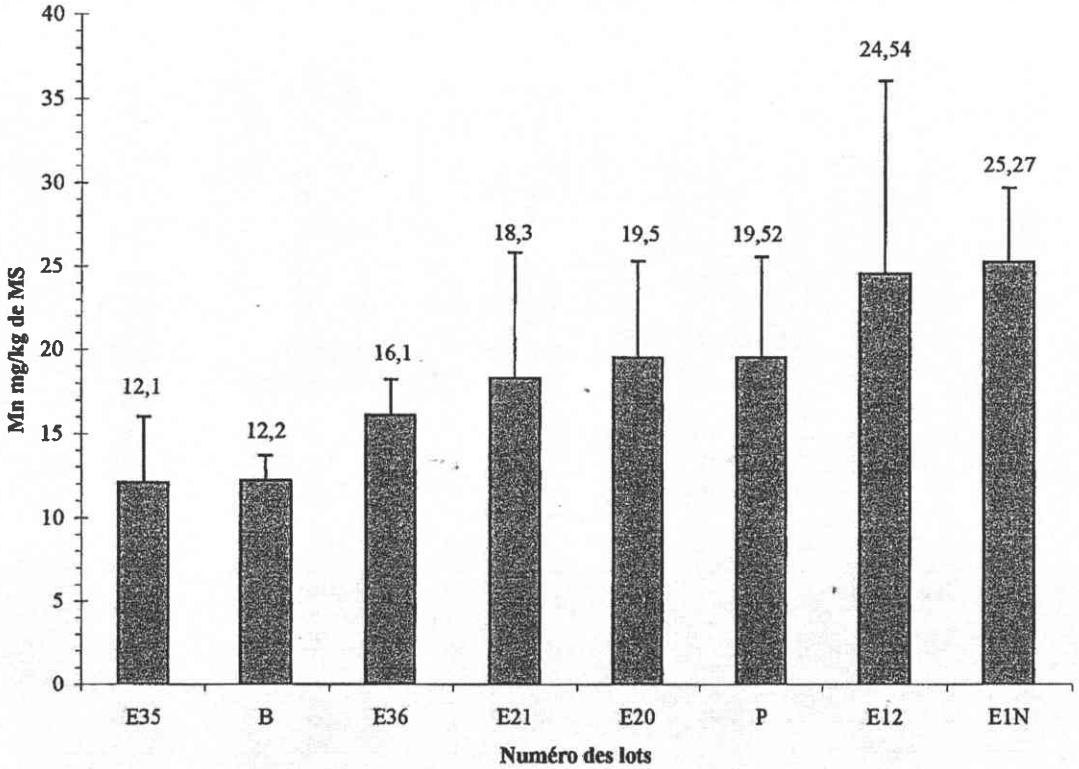
I.5. Screening des concentrations en plomb (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa*

I.5.1. Concentrations en plomb dans les pieds et les viscères chez *Helix aspersa aspersa* provenant de la nature et d'élevage (figures 41 a_1 et a_2)

Compte tenu du nombre restreint de lot ayant fait l'objet d'une analyse de plomb, les données des lots d'élevage et de la nature sont regroupées dans les figures 41 a_1 et a_2.

Les concentrations en plomb dans le pied (6 + 2 = 8 lots, figure 41 a_1) sont inférieures à celles dans les viscères (10 + 2 = 12 lots, figure 41 a_2). La gamme de concentration se situe entre 0,04 et 0,99 mg/kg de MS.

a_1 : Concentrations en manganèse dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage



a_2 : Concentrations en manganèse dans les viscères des *Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

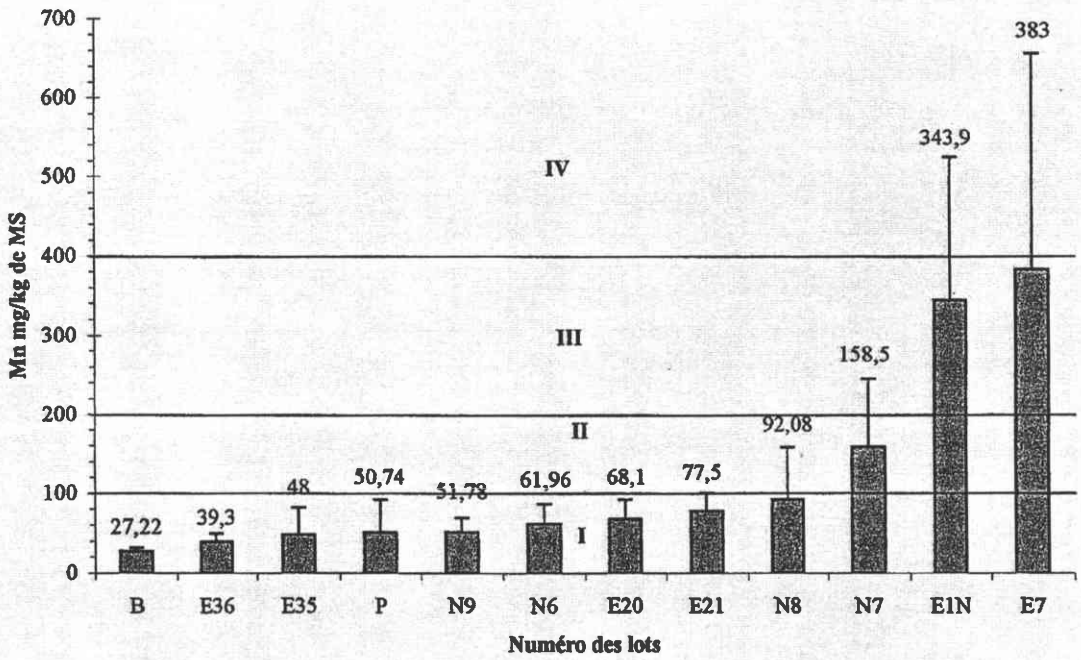


Figure 39 : Concentrations en manganèse dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'H*elix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage (E20 et E1N : lots de la nature ; autres lots : élevage)

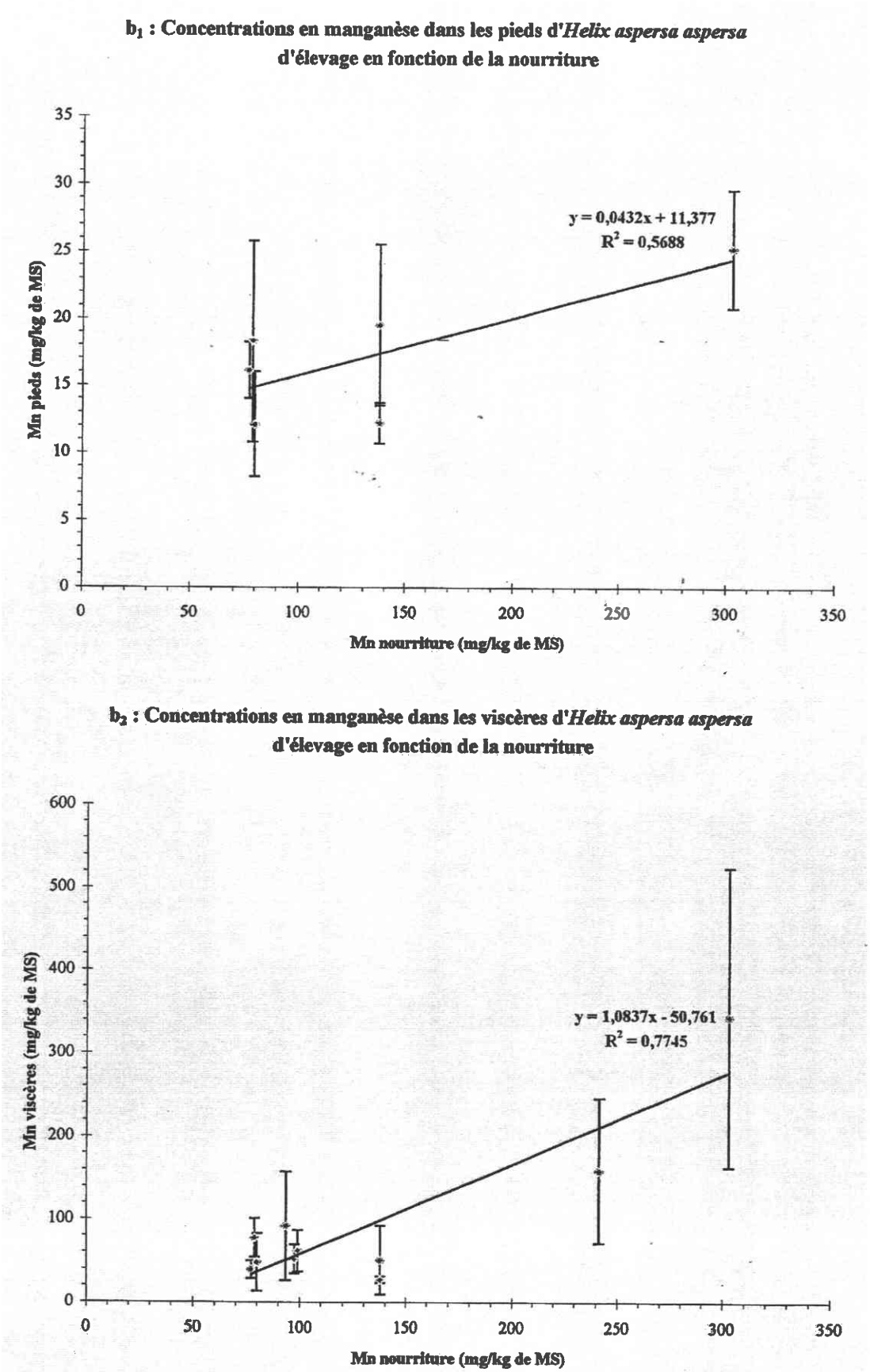
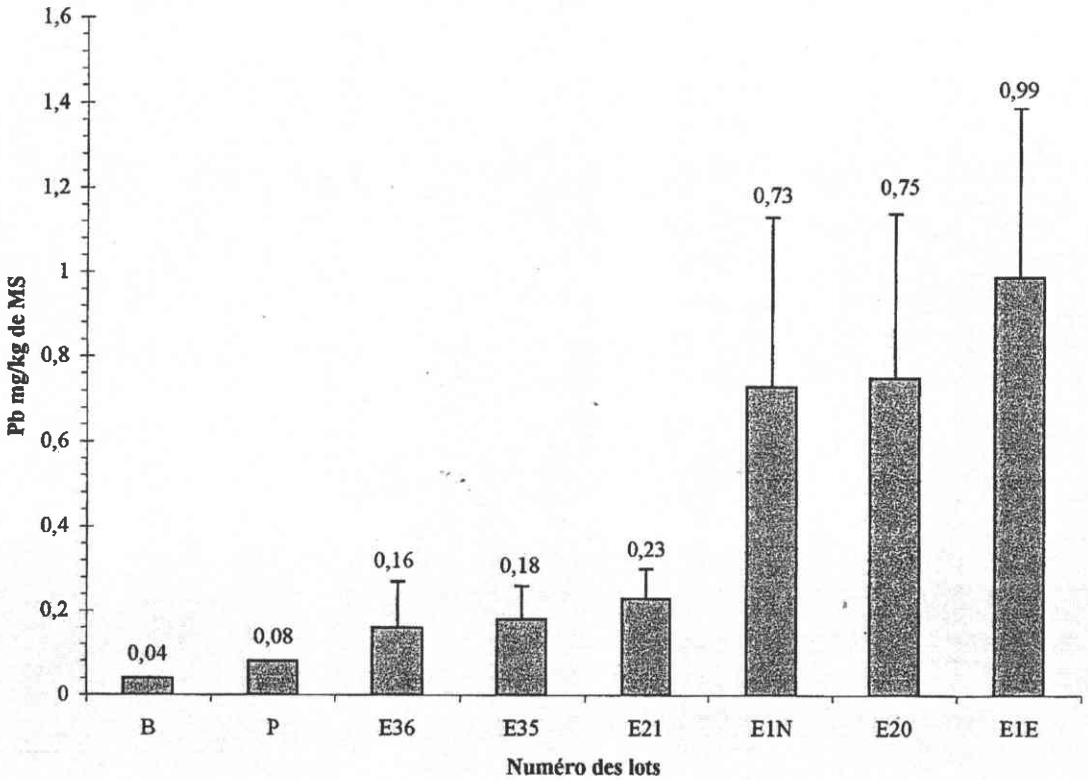


Figure 40 : Corrélation entre la concentration en manganèse dans l'aliment et la concentration en manganèse dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

a_1 : Concentrations en plomb dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage



a_2 : Concentrations en plomb dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

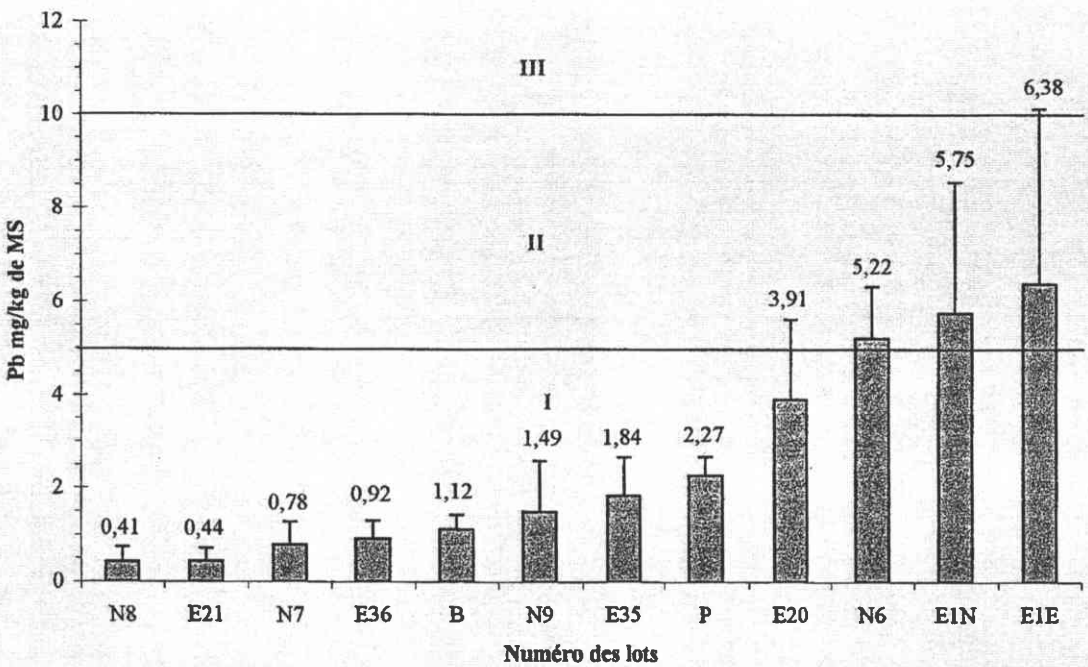
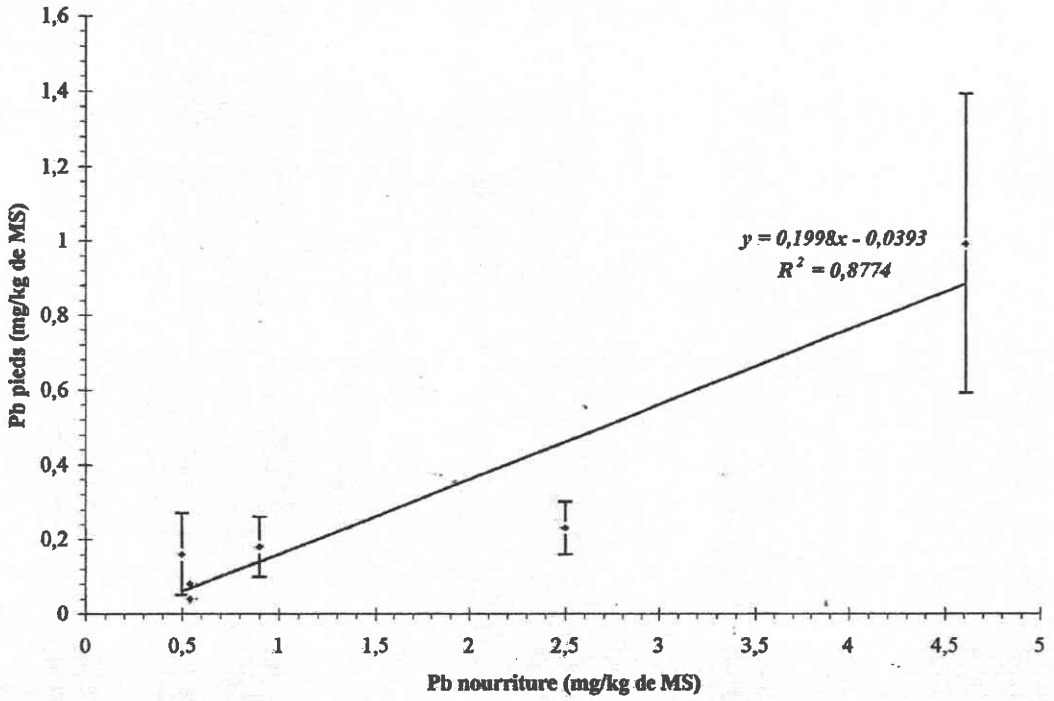


Figure 41 : Concentrations en plomb dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'H*elix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage (E20 et E1N : lots de la nature ; autres lots : élevage)

b_1 : Concentrations en plomb dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de la nourriture



b_2 : Concentrations en plomb dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de la nourriture

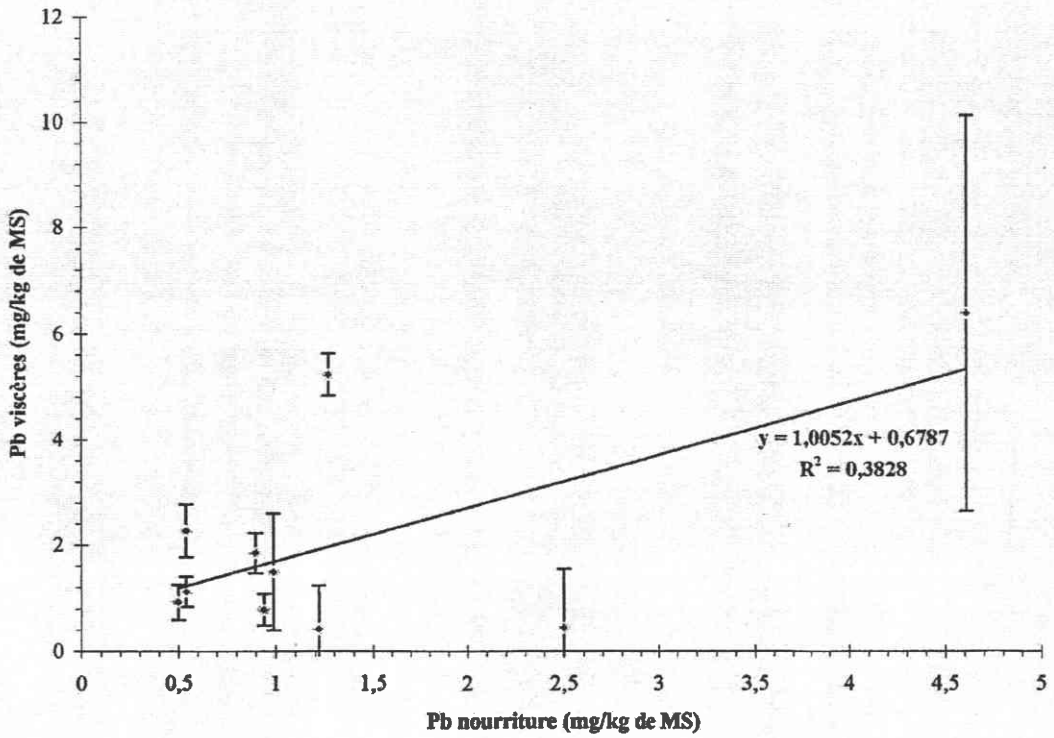


Figure 42 : Corrélation entre la concentration en plomb dans l'aliment et la concentration en plomb dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

Les concentrations en plomb dans les viscères (figure 41 a_2) se situent dans une gamme significativement supérieure de 0,41 à 6,38 mg/kg de MS.

9 lots se révèlent de la classe I et 3 lots se révèlent de la classe II avec un seuil fixé entre les deux classes à 5 mg/kg de MS.

I.5.2. Etude de la corrélation entre la concentration en plomb dans l'aliment et la concentration en plomb dans le pied et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage (figures 42 b_1 et b_2)

La figure 42 b_1 met en évidence une corrélation significative et positive entre la concentration en plomb dans l'aliment et celle dans le pied (6 lots, R^2 : 0, 877). La droite de régression se situe dans le domaine des organismes déconcentreurs pour le plomb dans le pied.

Par contre, pour les viscères (10 lots, R^2 : 0,383), la corrélation est non significative avec un positionnement des moyennes de concentration dans les trois types d'organismes : macroconcentreurs, microconcentreurs et déconcentreurs du moins pour la gamme de concentrations en plomb correspondant aux aliments analysés.

I.6. Screening des concentrations en nickel (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa*

I.6.1. Concentrations en nickel dans les pieds et les viscères chez *Helix aspersa aspersa* provenant de la nature et d'élevage (figures 43 a_1 et a_2)

Compte tenu du nombre restreint de lots ayant fait l'objet d'une analyse de nickel, les données des lots d'élevage et de la nature sont regroupées dans les figures 43 a_1 et a_2.

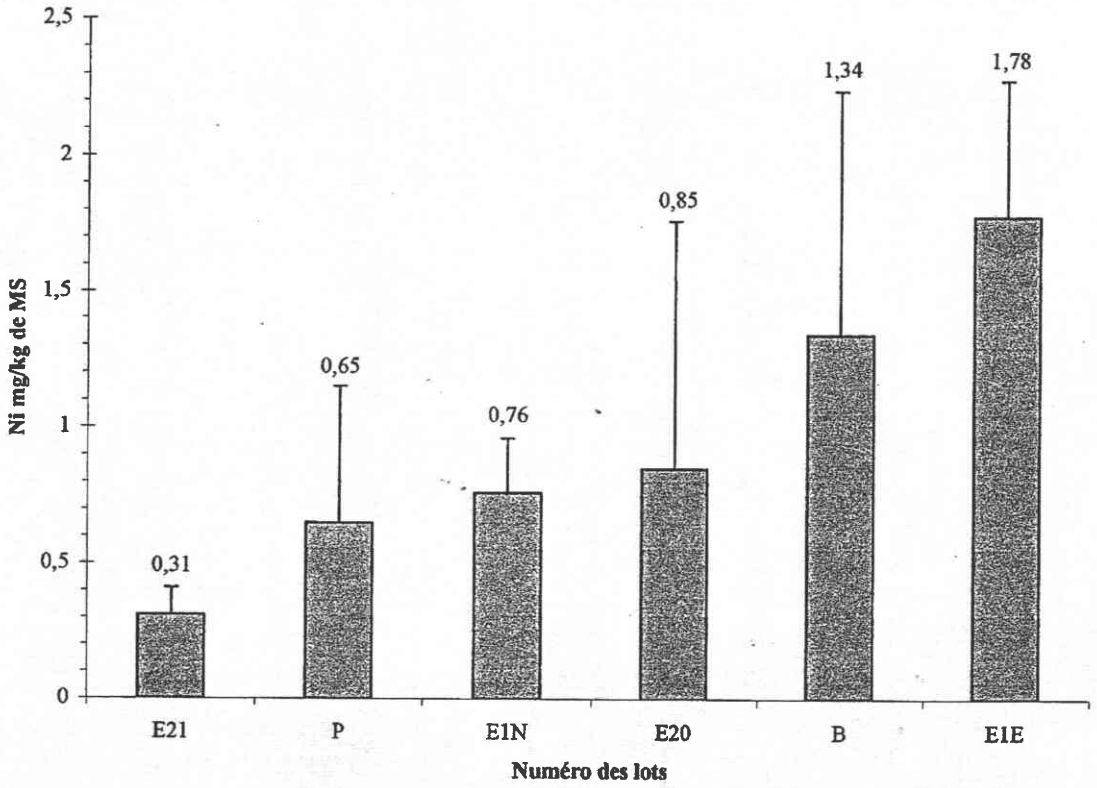
Les concentrations en nickel dans le pied (4 + 2 = 6 lots, figure 43 a_1) sont inférieures à celles dans les viscères (8 + 2 = 10 lots, figure 43 a_2). La gamme de concentration se situe entre 0,31 et 1,78 mg/kg de MS.

Les concentrations en nickel dans les viscères (figure 43 a_2) se situent dans une gamme significativement supérieure de 0,61 à 6,51 mg/kg de MS avec 8 lots relevant de la classe I, un lot relève de la classe II avec un seuil entre les classes I et II fixé à 3 mg/kg de MS et un lot en classe III avec un seuil entre la classe II et la classe III fixé à 6 mg/kg de MS.

I.6.2. Etude de la corrélation entre la concentration en nickel dans l'aliment et la concentration en nickel dans le pied et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage (figures 44 b_1 et b_2)

La figure 44 b_1 ne met pas en évidence de corrélation pour le pied (4 lots, R^2 : 0,16). Il en est de même pour les viscères (6 lots, R^2 : 0,441). Dans les deux cas, la droite de régression se situe dans le domaine des organismes déconcentreurs. Pour les faibles concentrations en nickel dans l'aliment, les écarts types sont très importants chez les escargots.

a_1 : Concentrations en nickel dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage



a_2 : Concentrations en nickel dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

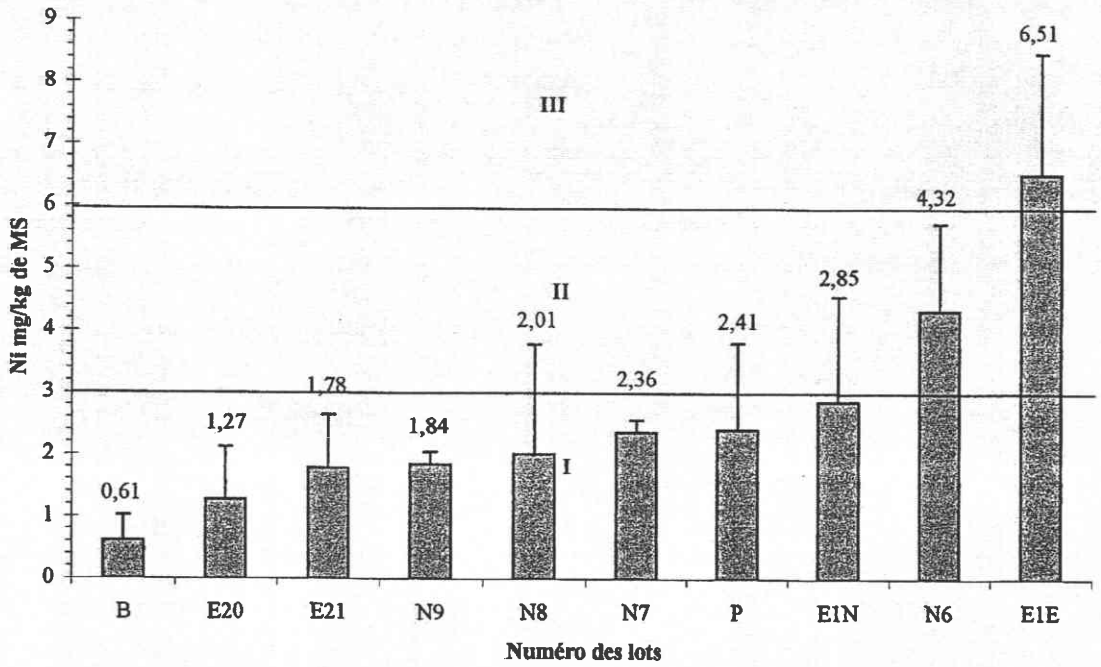
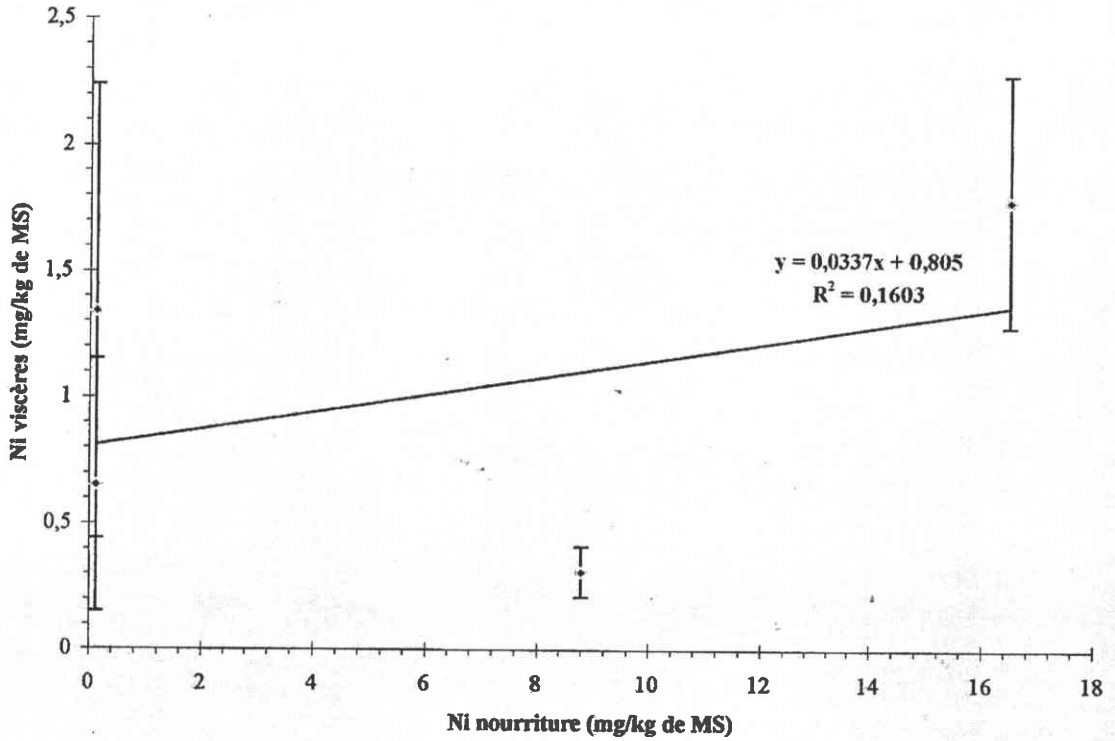


Figure 43 : Concentrations en nickel dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage (E20 et E1N : lots de la nature ; autres lots : élevage)

b_1 : Concentrations en nickel dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de la nourriture



b_2 : Concentrations en nickel dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de la nourriture

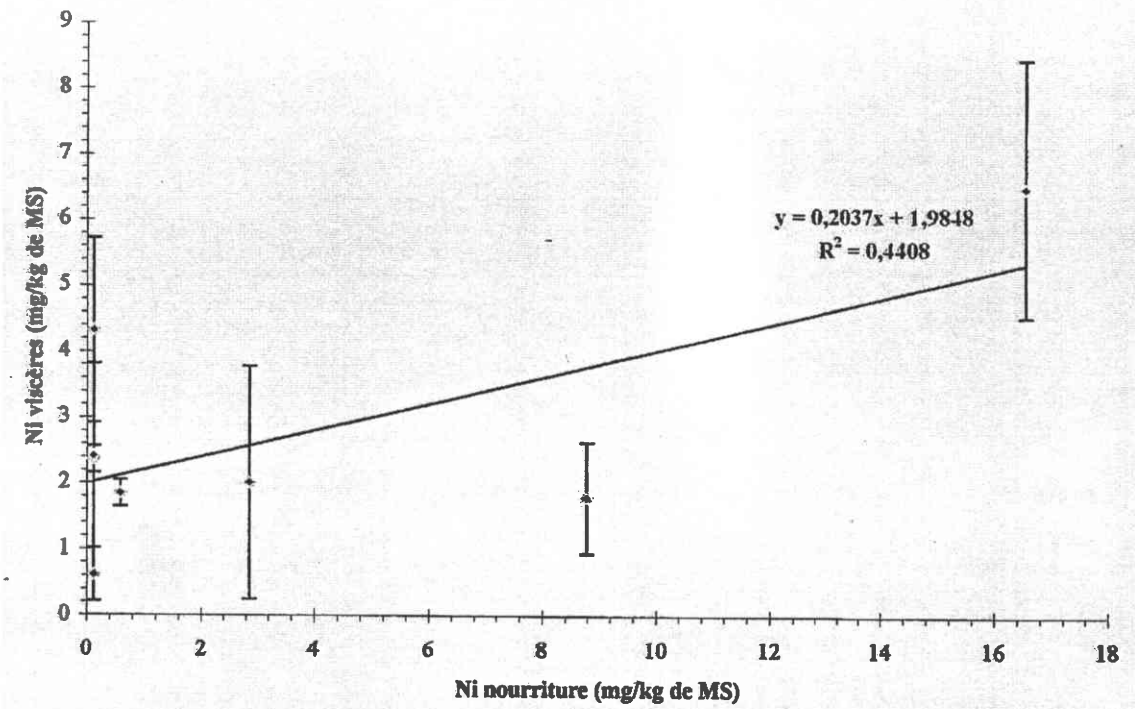
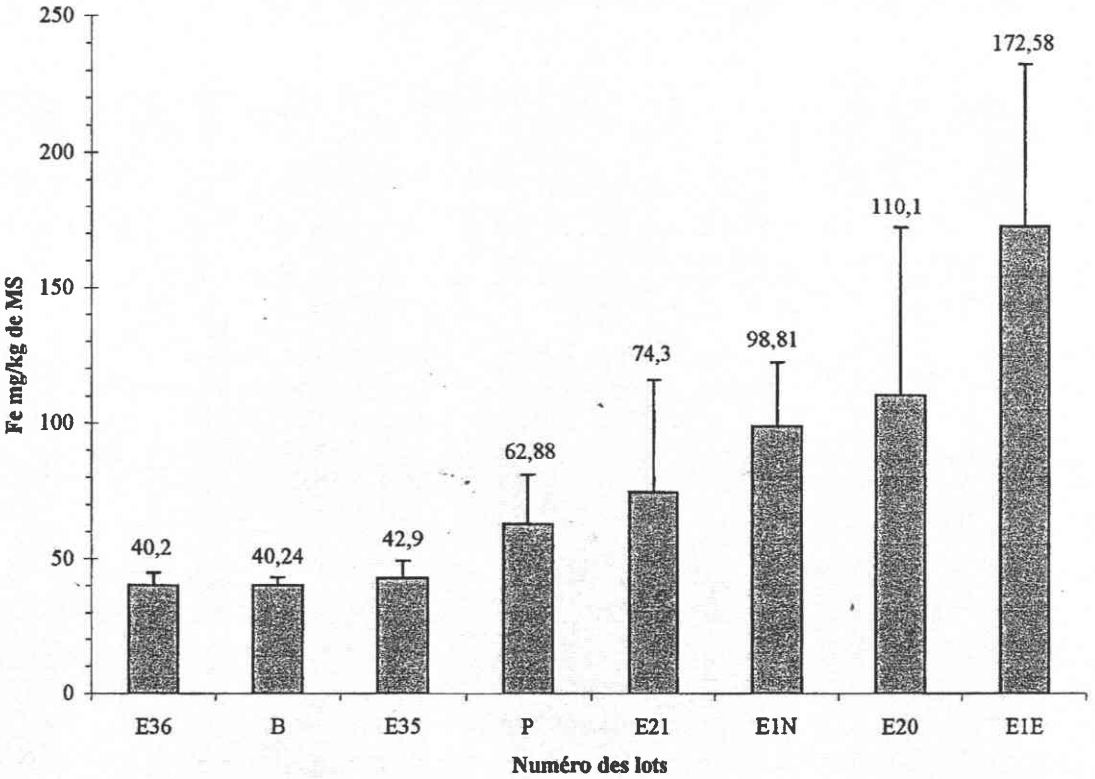


Figure 44 : Corrélation entre la concentration en nickel dans l'aliment et la concentration en nickel dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

a_1 : Concentrations en fer dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage



b_2 : Concentrations en fer dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

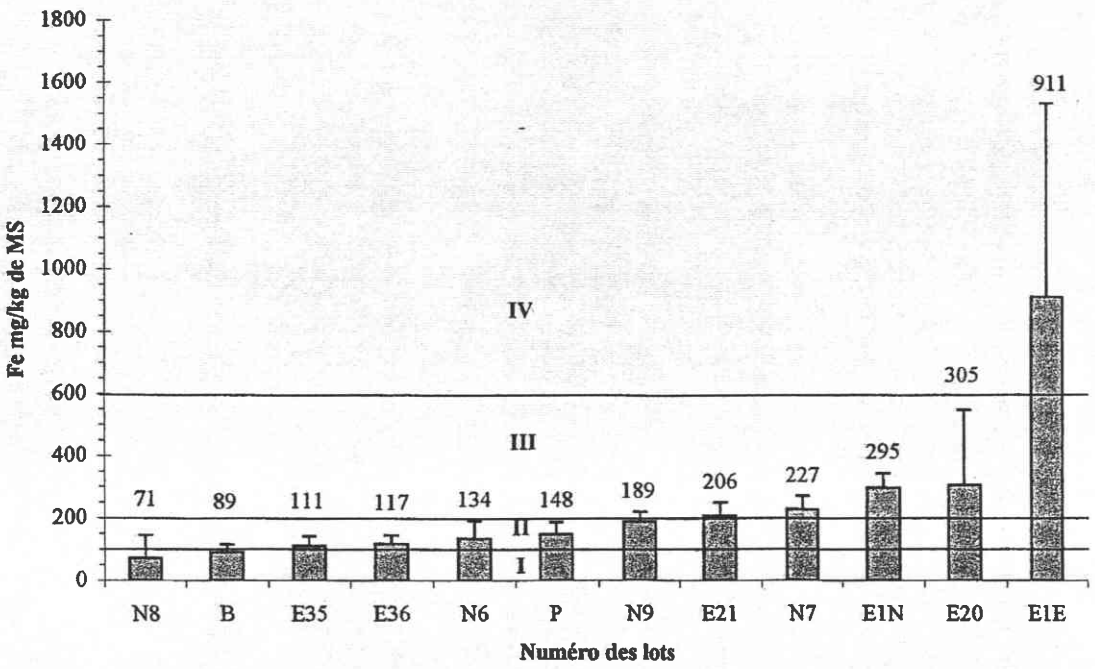
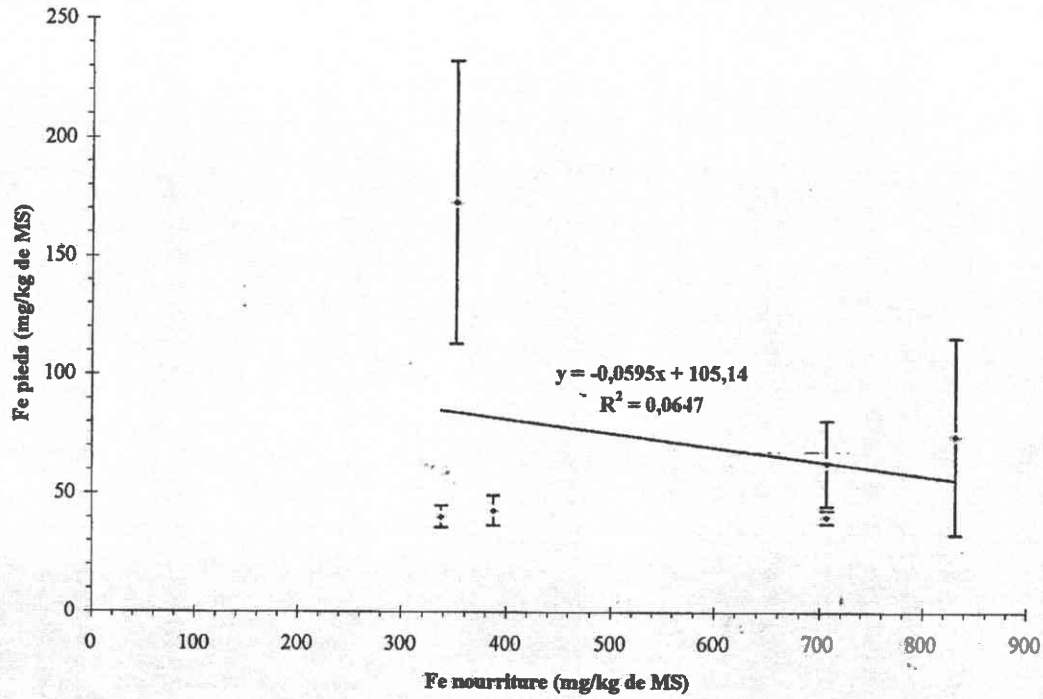


Figure 45 : Concentrations en fer dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage (E20 et E1N : lots de la nature ; autres lots : élevage)

b_1 : Concentrations en fer dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* en fonction de l'aliment



b_2 : Concentrations en fer dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de l'aliment

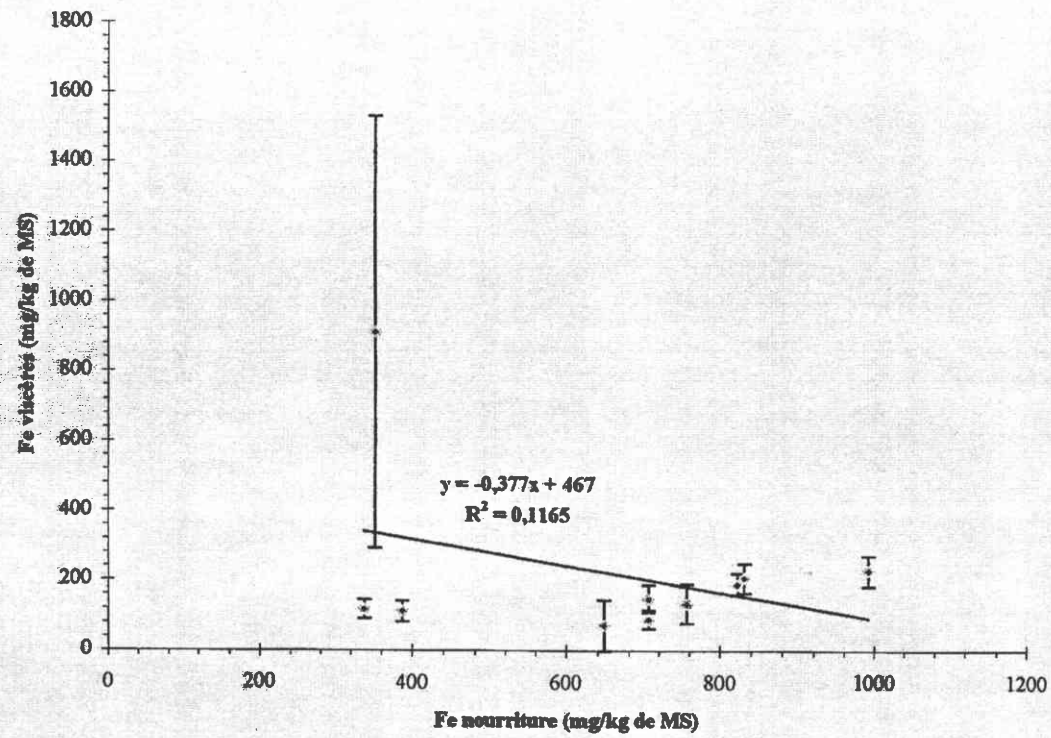


Figure 46 : Corrélation entre la concentration en fer dans l'aliment et la concentration en fer dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

I.7. Screening des concentrations en fer (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa*

I.7.1. Concentrations en fer dans les pieds et les viscères chez *Helix aspersa aspersa* provenant de la nature et d'élevage (figures 45 a_1 et a_2)

Compte tenu du nombre restreint de lots ayant fait l'objet d'une analyse de fer, les données des lots d'élevage et de la nature sont regroupées dans les figures 45 a_1 et a_2.

Les concentrations en fer dans le pied (6 + 2 = 8 lots, figure 45 a_1) sont inférieures à celles dans les viscères (10 + 2 = 12 lots, figure 45 a_2). La gamme de concentration se situe entre 40,2 et 172,6 mg/kg de MS.

Les concentrations en fer dans les viscères (figure 45 a_2) se situent dans une gamme significativement supérieure de 71 à 911 mg/kg de MS avec 2 lots relevant de la classe I, 5 lots relevant de la classe II avec un seuil entre la classe I et la classe II fixé à 100 mg/kg de MS, 4 lots en classe III avec un seuil entre la classe II et la classe III fixé à 200 mg/kg de MS, un lot en classe IV avec un seuil entre la classe III et la classe IV fixé à 600 mg/kg de MS.

I.7.2. Etude de la corrélation entre la concentration en fer dans l'aliment et la concentration en fer dans le pied et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage (figures 46 b_1 et b_2)

Les figures 46 b_1 et b_2 mettent en évidence l'absence de corrélation pour le pied (6 lots) et les viscères (10 lots) (R^2 respectivement de 0,064 et 0,116) du moins dans la gamme des concentrations en fer correspondant à celles des aliments fournis. Les deux droites de régression se situent nettement dans le domaine des organismes déconcentreurs.

I.8. Screening des concentrations en chrome (en mg/kg de Ms) chez *Helix aspersa aspersa*

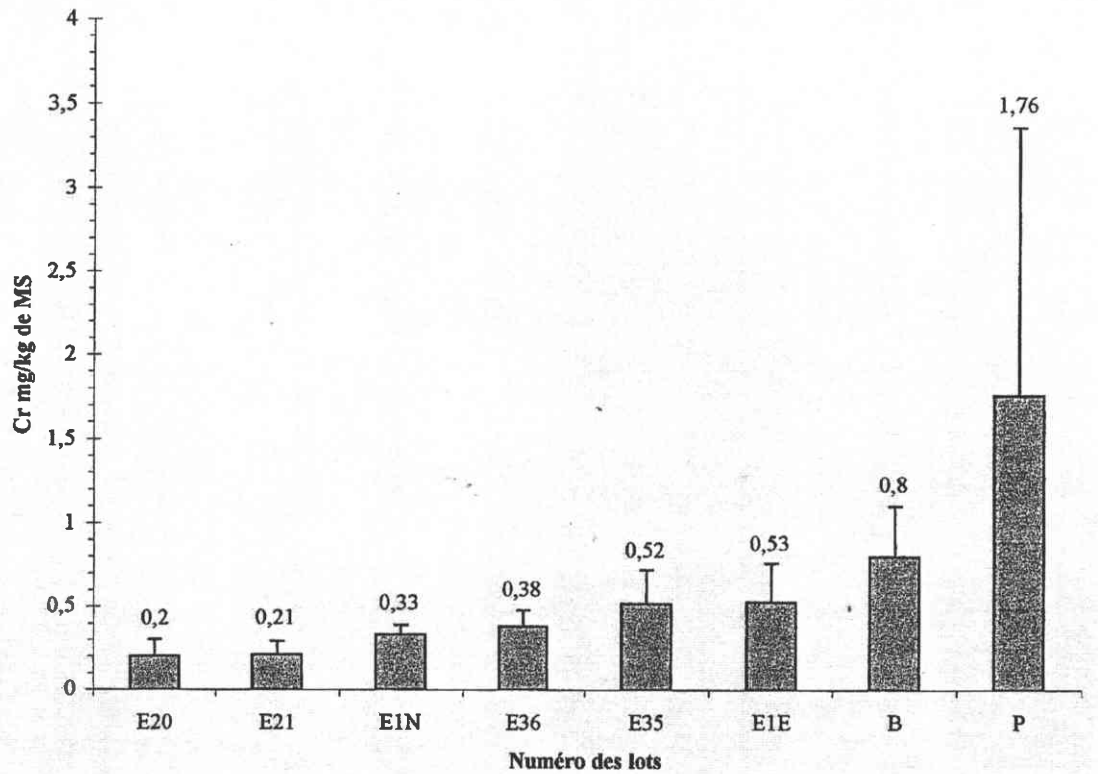
I.8.1. Concentrations en chrome dans les pieds et les viscères chez *Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage (figures 47 a_1 et a_2)

Compte tenu du nombre restreint de lots ayant fait l'objet d'une analyse de chrome, les données des lots d'élevage et de la nature sont regroupées dans les figures 47 a_1 et a_2.

Les concentrations en chrome dans le pied (6 + 2 = 8 lots, figure 47 a_1) sont significativement inférieures à celles dans les viscères (10 + 2 = 12 lots, figure 47 a_2). La gamme de concentration se situe entre 0,2 et 1,76 mg/kg de MS.

Les concentrations en chrome dans les viscères (figure 47 a_2) se situent dans une gamme significativement supérieure à celles du pied, entre 0,57 et 4,58 mg/kg de MS avec 5 lots relevant de la classe I, 2 lots relevant de la classe II avec un seuil entre la classe I et la classe II fixé à 0,6 mg/kg de MS, 5 lots en classe III avec un seuil entre la classe II et la classe III fixé à 1,8 mg/kg de MS.

a_1 : Concentrations en chrome dans les pieds d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage



a_2 : Concentrations en chrome dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage

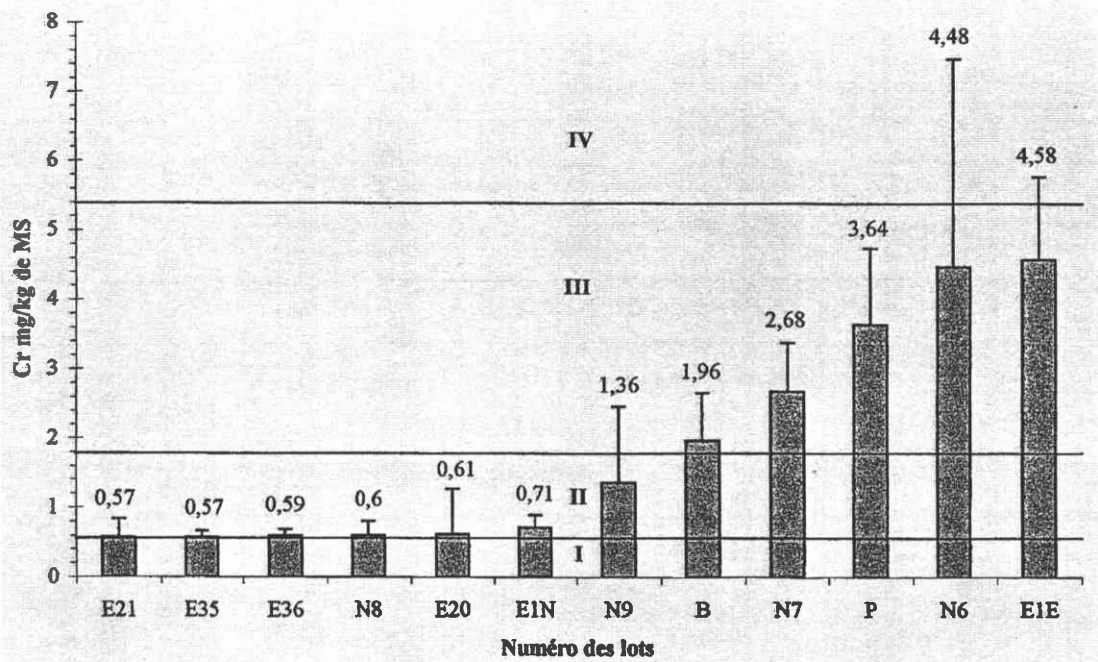
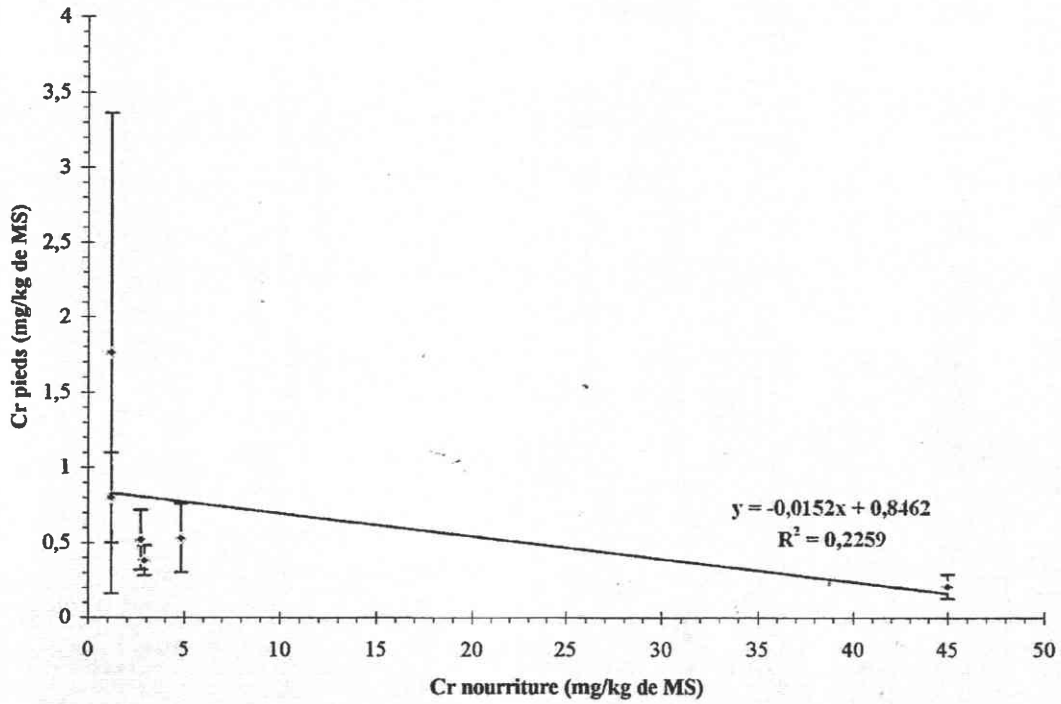


Figure 47 : Concentrations en chrome dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'H*elix aspersa aspersa* de la nature et d'élevage (E20 et E1N : lots de la nature ; autres lots : élevage)

b_1 : Concentrations en chrome dans les pieds des *Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de la nourriture



b_2 : Concentrations en chrome dans les viscères des *Helix aspersa aspersa* d'élevage en fonction de la nourriture

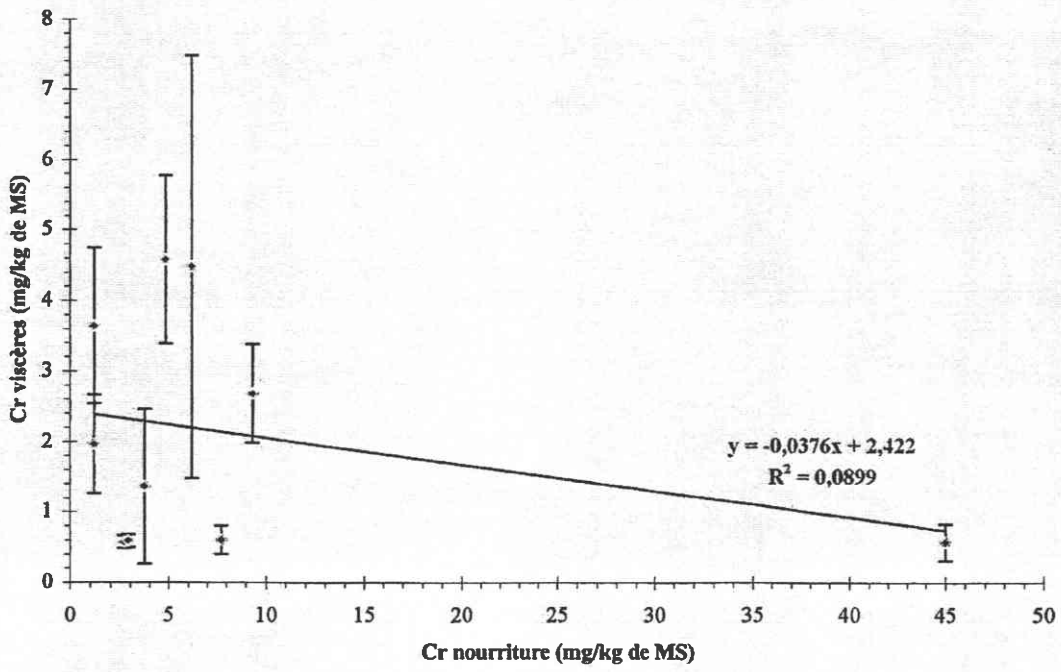


Figure 48 : Corrélation entre la concentration en chrome dans l'aliment et la concentration en chrome dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage

I.8.2. Etude de la corrélation entre la concentration en chrome dans l'aliment et la concentration en chrome dans le pied et les viscères des lots d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage (figures 48 b_1 et b_2)

Les figures 48 b_1 et b_2 mettent en évidence l'absence de corrélation pour le pied (6 lots) et les viscères (10 lots) d'autant que les écarts types sont très importants dans certains lots. Les droites de régression se situent dans le domaine des organismes déconcentreurs.

I.9. Conclusion et discussion sur les capacités de bioaccumulation d'*Helix aspersa aspersa*. Comparaison des capacités de bioaccumulation d'*Helix aspersa aspersa*, *Helix aspersa maxima* et *Helix pomatia*. Propositions concernant les concentrations en métaux dans l'aliment d'élevage

I.9.1. Capacité de bioaccumulation d'*Helix aspersa aspersa*

La capacité de bioaccumulation de *Helix aspersa aspersa* varie selon le métal considéré. Pour tous les métaux, sauf le cuivre, la concentration dans la masse viscérale est significativement supérieure à celle dans le pied. Nous proposons donc de retenir comme référence la contamination en métal dans la masse viscérale avec définition des différentes classes de contamination de I à IV selon les tableaux 24a et 24b ci-après. Cette grille sera testée sur d'autres lots provenant de sites variés (proximité autoroutière, ancienne mine de cuivre, centre d'enfouissement technique, friche industrielle avec aciérie électrique, *Cf.* chapitres III à V, 3ème partie). Contrairement à la classification de Berger et Dallinger (1993), pour quatre métaux (Cu, Zn, Cd et Pb), qui se réfère à des activités humaines à savoir :

- Classe I : Environnement non contaminé ;
- Classe II : Ville et trafic ;
- Classe III : mines et fonderies.

Nous proposons une grille basée sur le niveau de contamination en métal atteint chez les escargots car des activités humaines différentes peuvent, selon leur intensité, induire un niveau de contamination en métal équivalent. La signification des classes est la suivante pour Chacun des 8 métaux considérés :

- Classe I : Absence de contamination ;
- Classe II : Contamination faible ;
- Classe III : Contamination importante ;
- Classe IV : Contamination très importante.

Un indice de contamination polymétallique (ICPM) est obtenu en additionnant les indices de classe obtenus pour les différents métaux. Une classe V sera proposée ultérieurement pour

certains métaux dans des cas de contamination excessive sur des sites industriels (*Cf.* site d'aciérie électrique – chapitre IV.4.).

Tableau 24a : Proposition de grille de contamination pour les viscères d'*Helix aspersa aspersa* pour Cu, Fe, Mn et Zn en mg/kg de MS

Classe	Cuivre	Fer	Manganèse	Zinc
I	Cu ≤ 130	Fe ≤ 100	Mn ≤ 100	Zn ≤ 150
II	130 < Cu ≤ 200	100 < Fe ≤ 200	100 < Mn ≤ 200	150 < Zn ≤ 300
III	200 < Cu ≤ 300	200 < Fe ≤ 600	200 < Mn ≤ 400	300 < Zn ≤ 600
IV	Cu > 300	Fe > 600	Mn > 400	Zn > 600

Tableau 24b : Proposition de grille de contamination pour les viscères d'*Helix aspersa aspersa* pour Cd, Cr, Ni et Pb en mg/kg de MS

Classe	Cadmium	Chrome	Nickel	Plomb
I	Cd ≤ 5	Cr ≤ 0,6	Ni ≤ 3	Pb ≤ 5
II	5 < Cd ≤ 10	0,6 < Cr ≤ 1,8	3 < Ni ≤ 6	5 < Pb ≤ 10
III	10 < Cd ≤ 50	1,8 < Cr ≤ 5,4	6 < Ni ≤ 12	10 < Pb ≤ 50
IV	Cd > 50	Cr > 5,4	Ni > 12	Pb > 50

En ce qui concerne la bioaccumulation, les données obtenues à partir des lots d'élevage recevant une alimentation de concentration métallique connue permettent de définir la capacité de bioaccumulation en fonction du facteur de bioconcentration, en distinguant le pied et la masse viscérale (tableau 25).

$$FBC = \frac{\text{Concentration du métal dans l'organisme}}{\text{Concentration du métal dans l'aliment}}$$

Tableau 25 : Synthèse des capacités de bioaccumulation de *Helix aspersa aspersa* en fonction du métal et des parties de l'organisme analysées.
Légende : P : Pied ; V : Viscères ; M : Macroconcentreur ; m : Microconcentreur ; D : Déconcentreur ; Corrélations (+) : positive ; s : significative ; ns : non significative

	Métal	Cu	Cd	Zn	Mn	Pb	Ni	Fe	Cr
P	Type d'organisme (M, m, D)	M	D	D	D	D	D	D	D
	Corrélation ([Me] H.a.a./[Me] aliment)	s (+)	ns	ns	ns (+)	s (+)	ns	ns	ns
V	Type d'organisme (M, m, D)	M	M	m	D	M. m. D.	D	D	D
	Corrélation ([Me] H.a.a./[Me] aliment)	s (+)	ns	s (+)	s (+)	ns	ns	ns	ns

- *Helix aspersa aspersa* est un macroconcentreur (FBC > 2) :

  - De cuivre dans le pied et les viscères. Selon Dallinger (1993) c'est également le cas pour *Helix pomatia* et *Arianta arbustorum* ;
  - De cadmium dans la masse viscérale Dallinger (1993) classe également *Helix aspersa aspersa* parmi les macroconcentreurs après analyse de l'animal entier (FBC = 3 à 8). La bioconcentration importante du cadmium est également le cas d'autres espèces avec un FBC qui augmente : *Helix pomatia* (FBC = 6 à 10) ; *Arianta arbustorum* (FBC = 20) ; *Cepaea nemoralis* (FBC = 18 à 33).

- *Helix aspersa aspersa* est un microconcentreur (1 <FBC < 2) :

  - De zinc dans la masse viscérale. L'analyse de la masse viscérale donne une information plus fiable que l'escargot entier pour lequel Dallinger (1993) indique un FBC variant de 0,3 à 2 par contre *Helix pomatia* (FBC = 1à 9) et *Arianta arbustorum* (FBC = 7,3) sont des macroconcentreurs de zinc après analyse de l'ensemble de l'organisme.

- *Helix aspersa aspersa* présente une capacité variable allant de la macroconcentration à la déconcentration (FBC < 1) en ce qui concerne le plomb dans la masse viscérale ceci en fonction de la concentration dans l'aliment. Selon Dallinger (1993), *Helix pomatia* (FBC = 1,3) et *Arianta arbustorum* (FBC = 1,6) sont classés parmi les microconcentreurs pour l'organisme entier ;

- *Helix aspersa aspersa* présente une capacité de déconcentration (FBC < 1) :

  - D'une part dans le pied pour Cd, Zn, Mn, Pb, Ni, Fe et Cr ;
  - D'autre part dans la masse viscérale pour Mn, Ni, Fe et Cr

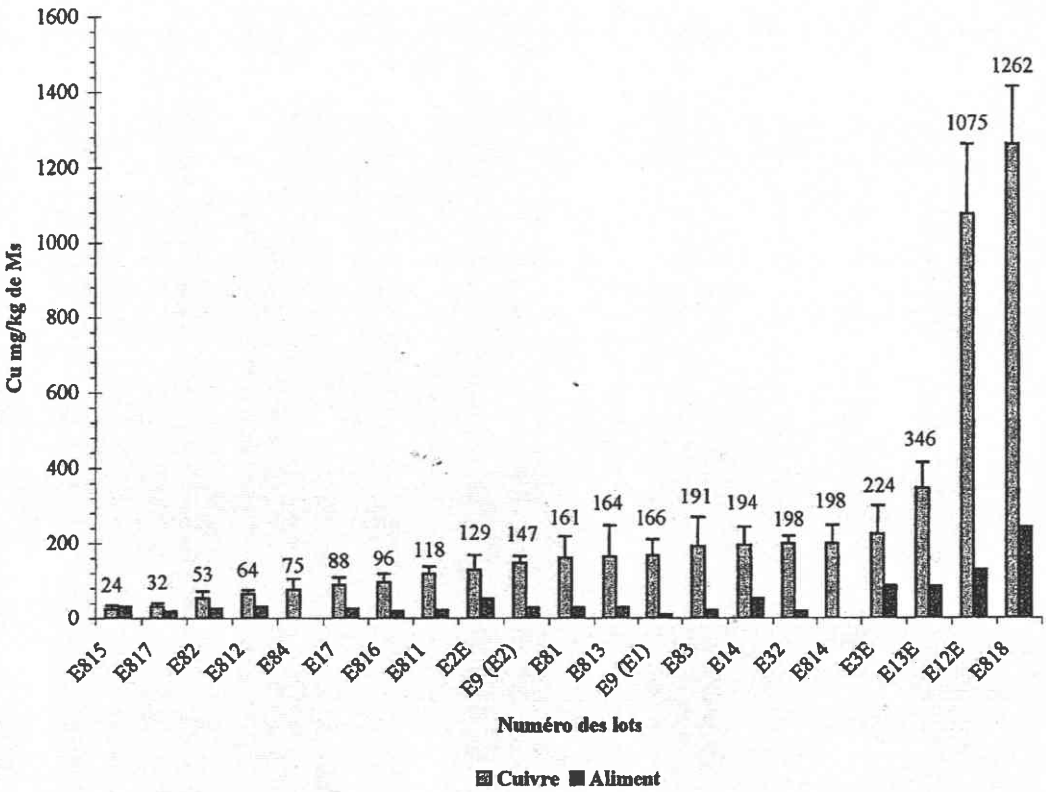
L'existence d'une corrélation significative et positive entre la concentration dans l'aliment et celle dans l'escargot a été établie pour le cuivre dans le pied et la masse viscérale, le zinc et le manganèse dans la masse viscérale, le plomb dans le pied.

Les conditions d'élevage influencent le niveau de bioaccumulation, par exemple en ce qui concerne le cuivre, les animaux analysés provenant de parcs d'engraissement présentent une contamination supérieure à celle d'individus élevés en hors sol alors qu'ils reçoivent une nourriture contenant la même concentration en métaux. Dans ce cas, les escargots ont accès à une alimentation plus diversifiée (sol, plantes variées selon les élevages : plantain, rumex, ortie, renoncule, trèfle nain, luzerne, pâturin, topinambour, chiendent, bardane, aliment pour héliciculture).

I.9.2. Comparaison entre les capacités de bioaccumulation d'*Helix aspersa aspersa* et d'*Helix aspersa maxima*

Afin d'approfondir les connaissances obtenues à partir de lots en provenance de la production hélicicole et de récolte *in situ*, des expériences en laboratoire ont été réalisées dans l'objectif de mieux contrôler les paramètres intervenant dans la bioaccumulation des métaux (espèce, âge des individus, nature de l'aliment et concentration en métaux, température, humidité et photopériode). C'est ainsi que les capacités de bioaccumulation du zinc et du cuivre ont été comparées chez les deux sous-espèces *Helix aspersa aspersa* (petit gris) et *Helix aspersa maxima* (gros gris d'Algérie). Cette étude, ayant fait l'objet d'une publication en collaboration (Gomot et Pihan, 1997), est présentée sous cette forme en chapitre II. La partie expérimentale a été réalisée à Besançon et les analyses de métaux à Metz.

a_1 : Concentrations en cuivre dans le pied d'*Helix aspersa maxima* d'élevage



a_2 : Concentrations en cuivre dans les viscères d'*Helix aspersa maxima* d'élevage

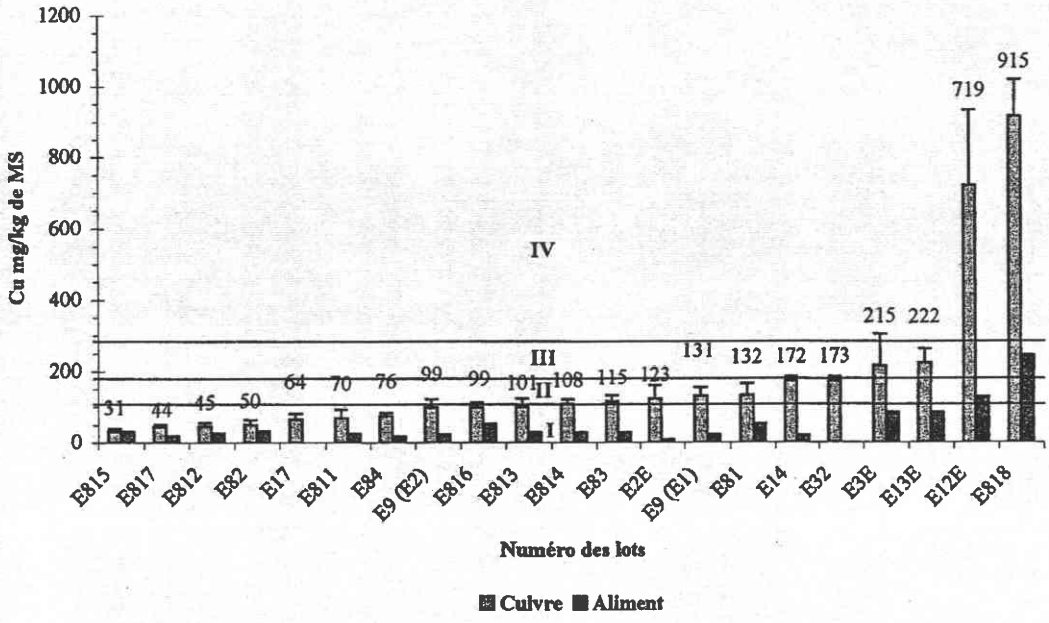
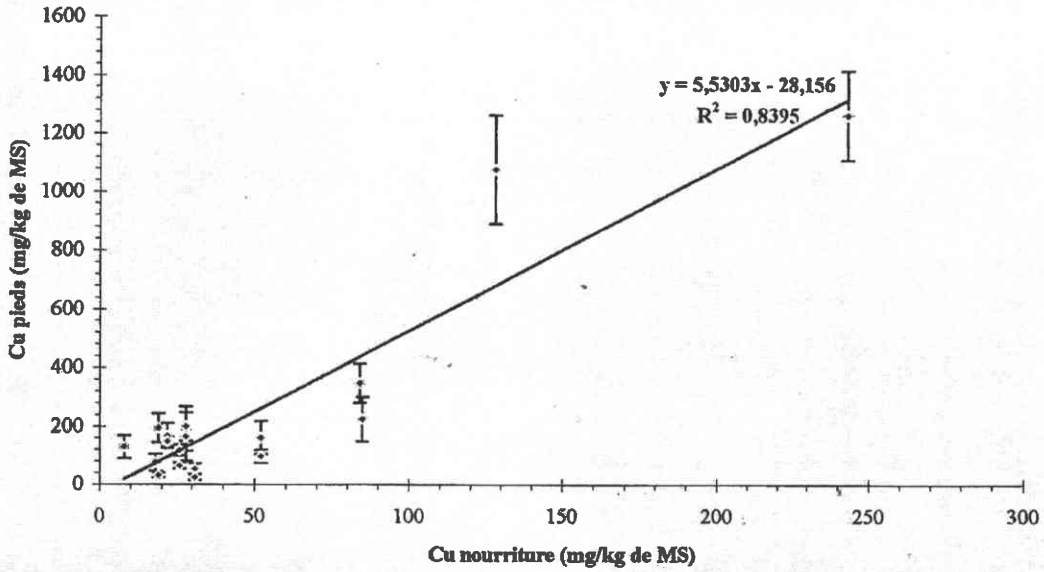


Figure 49 : Concentrations en cuivre dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'H*elix aspersa maxima* d'élevage

b_1 : Concentrations en cuivre dans les pieds d'*Helix aspersa maxima* en fonction de la concentration dans la nourriture



b_2 : Concentrations en cuivre dans les viscères d'*Helix aspersa maxima* en fonction de la concentration dans la nourriture

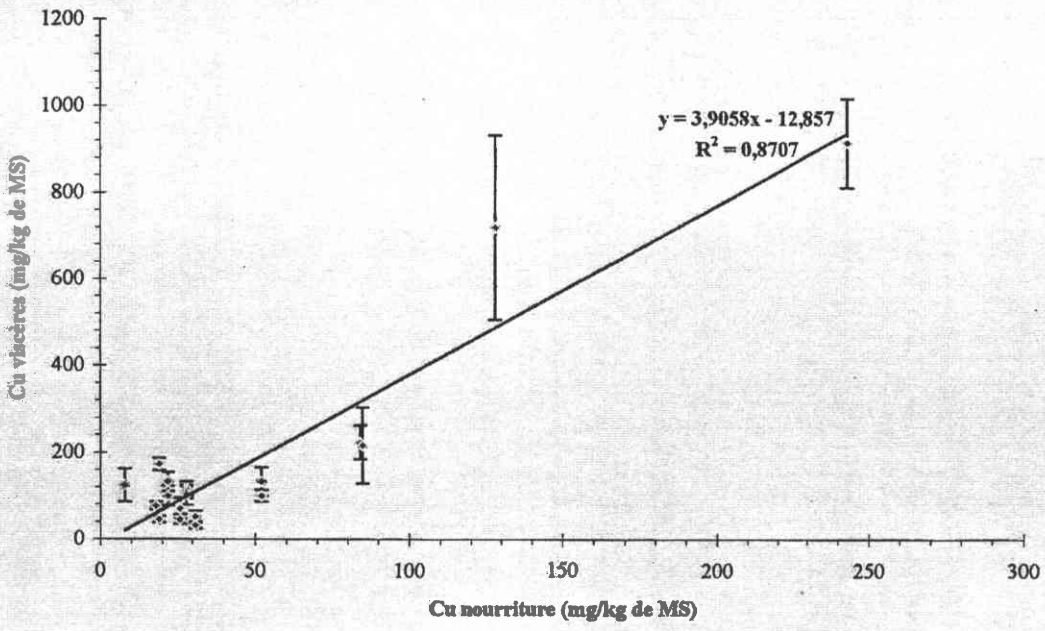
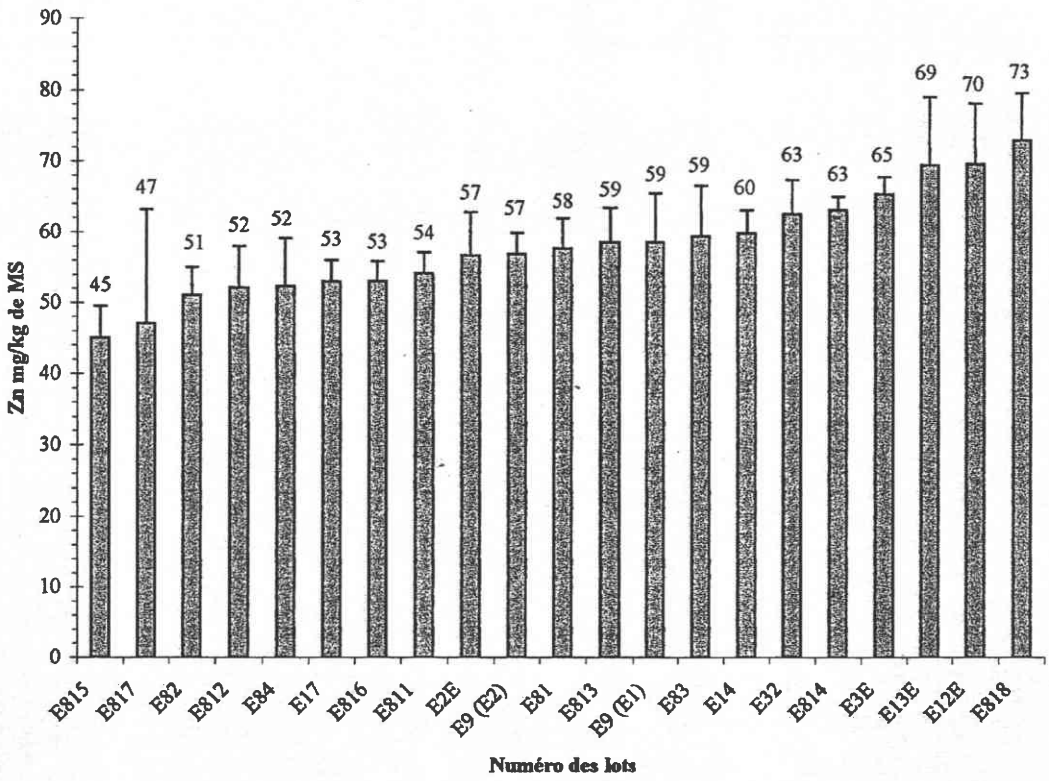


Figure 50 : Corrélation entre la concentration en cuivre dans l'aliment et la concentration en cuivre dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa maxima* d'élevage

a_1 : Concentrations en zinc dans le pied d'*Helix aspersa maxima* d'élevage



a_2 : Concentrations en zinc dans les viscères d'*Helix aspersa maxima* d'élevage

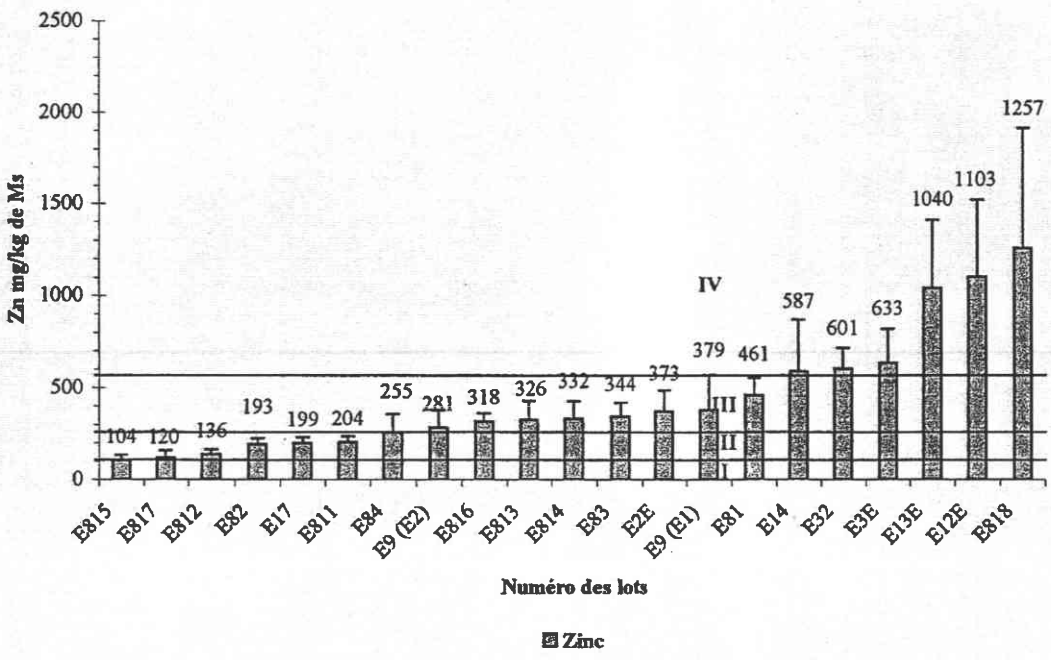
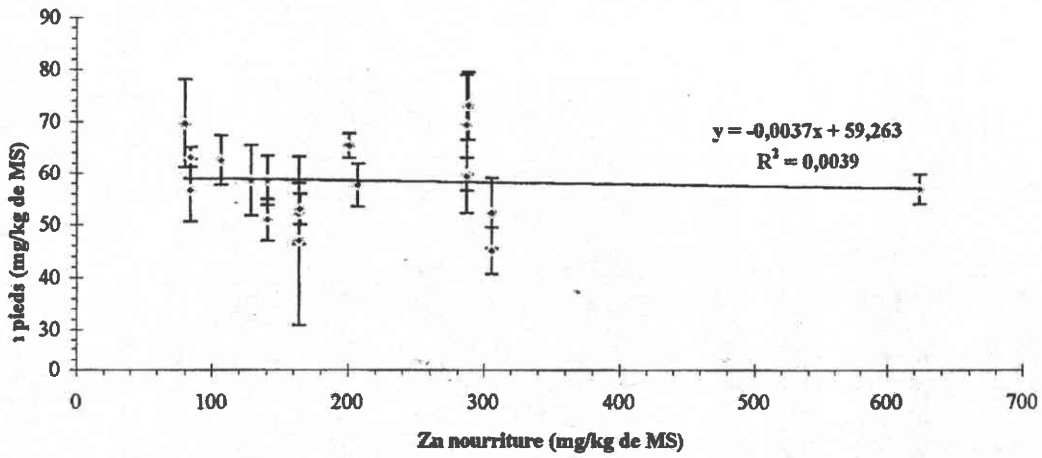


Figure 51 : Concentrations en zinc dans le pied (a_1) et dans les viscères (a_2) d'H*elix aspersa maxima* d'élevage

b_1 : Concentrations en zinc dans les pieds d'*Helix aspersa maxima* d'élevage en fonction de la concentration en zinc dans la nourriture



b_2 : Concentrations en zinc dans les viscères d'*Helix aspersa maxima* en fonction de la concentration dans la nourriture

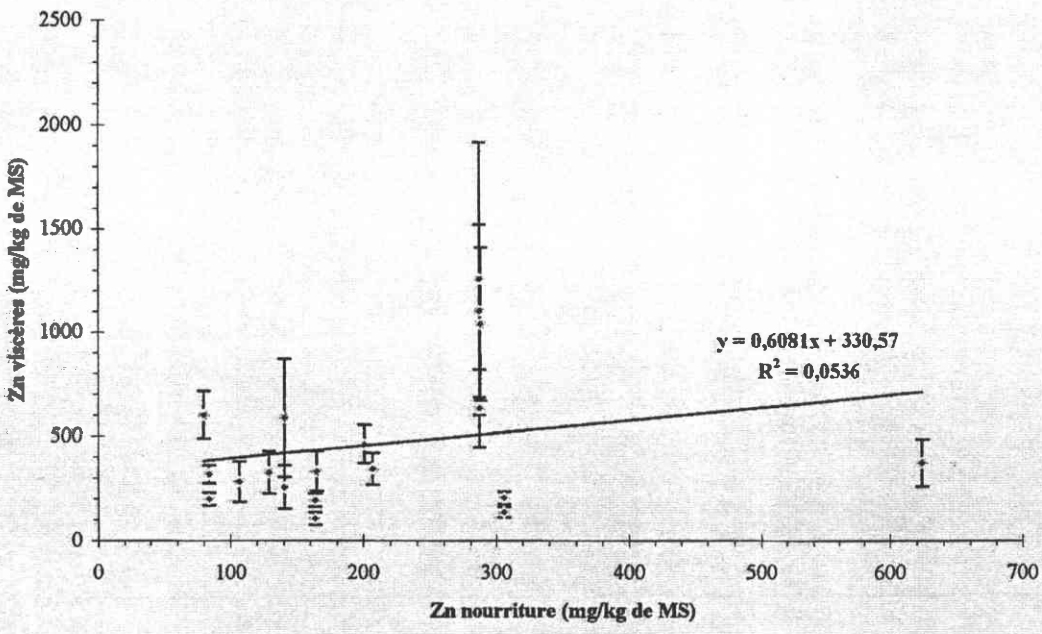


Figure 52 : Corrélation entre la concentration en cuivre dans l'aliment et la concentration en cuivre dans le pied (b_1) et dans les viscères (b_2) d'*Helix aspersa maxima* d'élevage

Les données des six lots d'*Helix aspersa maxima* utilisés dans la publication citée précédemment ont été traitées ensuite simultanément avec celles de 15 autres lots d'*Helix aspersa maxima* ayant également donné lieu à l'étude de la bioaccumulation du cuivre et du zinc dans différents types d'élevages (hors sol et parcs) avec utilisation d'aliments contenant de 8 à 243 mg/kg de cuivre et de 80 à 624 mg/kg de zinc.

Les capacités de bioaccumulation du zinc et du cuivre d'*Helix aspersa maxima* par rapport à *Helix aspersa aspersa* sont inférieures. Toutefois, les conclusions établies précédemment pour *Helix aspersa aspersa* vis-à-vis du cuivre sont identiques en ce qui concerne la significativité des corrélations pour *Helix aspersa maxima* (figures 49 a_1 et a_2, 50 b_1 et b_2, tableau 26).

Tableau 26 : Synthèse des capacités de bioaccumulation de *Helix aspersa maxima* en fonction du métal et des organes analysés.
Légende : P : Pieds ; V : Viscères ; M : Macroconcentreur ; m : Microconcentreur ; D : Déconcentreur ; Corrélation (+) : positive ; hs : hautement significative ; s : significative ; ns : non significative

	Métal	Cu	Zn
P	Type d'organisme	M	D
	Corrélation ([Me] H.a.a./[Me] aliment)	hs (+)	ns
V	Type d'organisme	M	M, m et D en fonction de la concentration croissante en zinc dans l'aliment
	Corrélation ([Me] H.a.a./[Me] aliment)	hs (+)	ns

Par contre, en ce qui concerne le zinc (figures 51 a_1 et a_2, 52 b_1 et b_2), si la conclusion pour le pied est identique, la réponse de la masse viscérale se modifie chez *Helix aspersa maxima* en fonction de la concentration croissante en zinc dans l'aliment avec, pour les faibles concentrations dans l'aliment, une microconcentration puis, en présence des concentrations élevées dans l'aliment, une déconcentration.

I.9.3. Application de la grille établie pour *Helix aspersa aspersa* à *Helix pomatia*

Dans le cadre des comparaisons inter-espèces, des capacités de bioaccumulation, 12 lots d'*Helix pomatia* en provenance du milieu naturel ont été analysés en ce qui concerne le plomb (figure 53 a_1 et a_2).

L'application de la grille de contamination établie pour *Helix aspersa aspersa*, en ce qui concerne la concentration en plomb dans les viscères, donne la répartition suivante : 3 lots en classe I, 4 lots en classe II, 4 lots en classe III et un lot en classe IV. Le lot sans contamination (classe I) E840 provenait de Lituanie alors que les lots E829 et E830, en classe III, provenaient de Pologne et le lot le plus contaminé E23 (classe IV) de la surface d'un centre d'enfouissement de déchets industriels spéciaux (DIS) avant sa remédiation. En provenance d'une même station, les individus de taille moyenne présentent une concentration en plomb supérieure à celle des gros individus (lot E830 par rapport au lot E829 et lot E832 par rapport au lot E831).

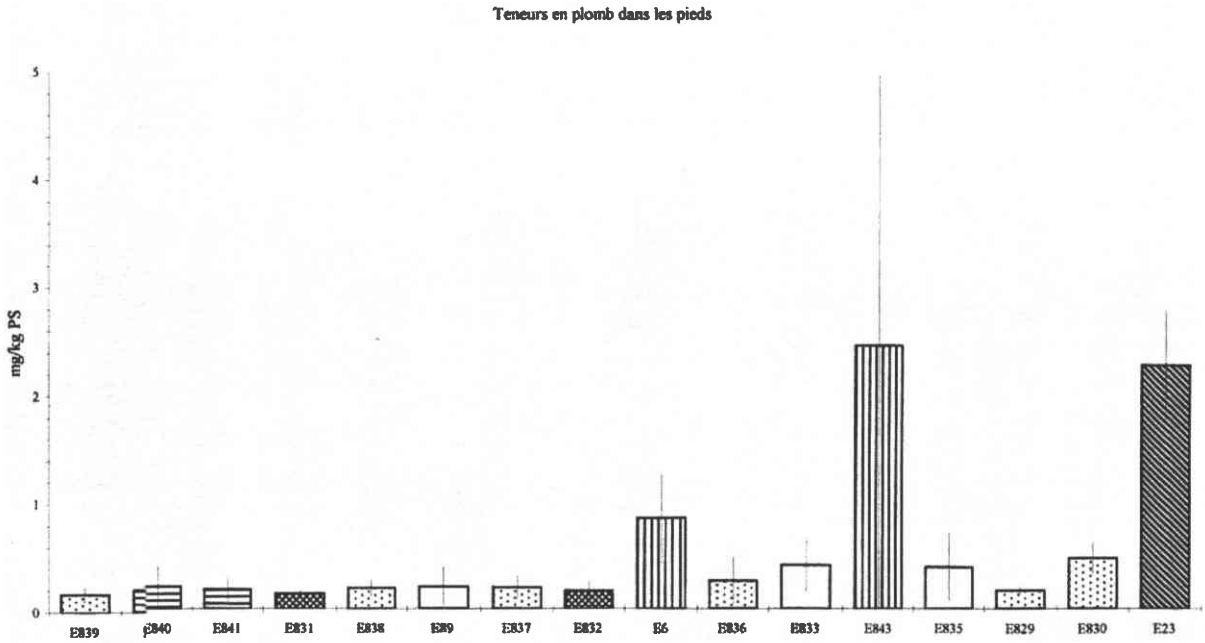


Figure 53 a_1 : Concentrations en plomb dans le pied d'*Helix pomatia*

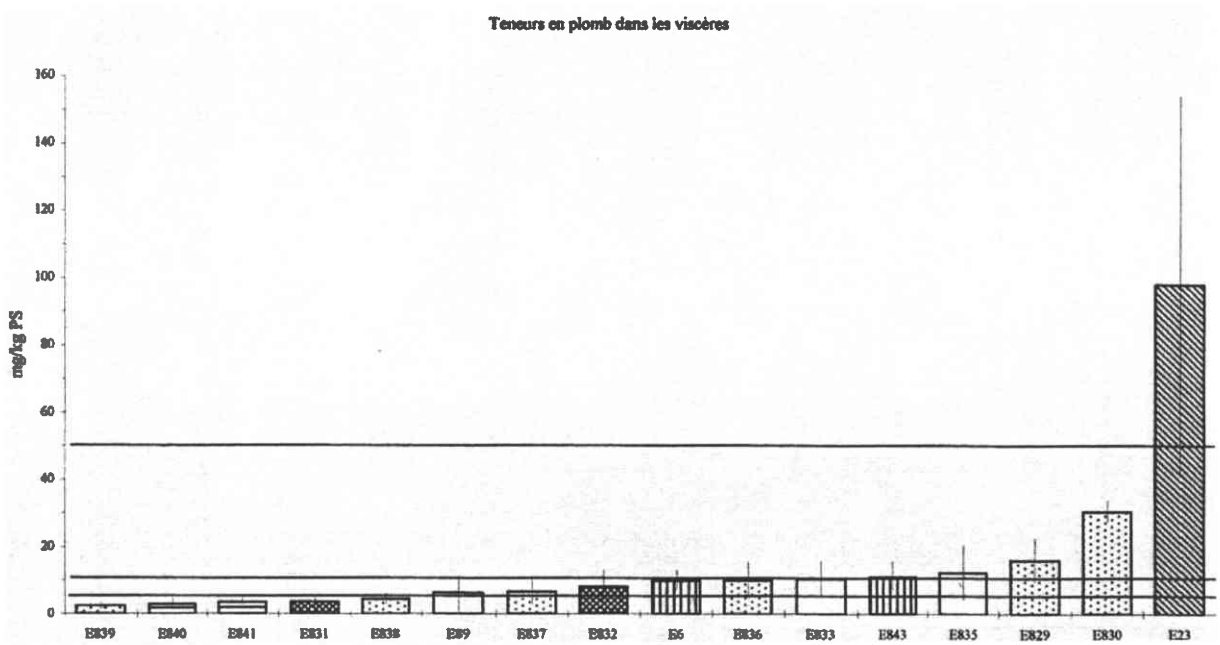


Figure 53 a_2 : Concentrations en plomb dans les viscères d'*Helix pomatia*

Une expérience de décontamination en laboratoire a été réalisée à Besançon à partir du lot provenant de Pologne. Après plusieurs mois de nourrissage, une décontamination est constatée en fonction de la nature de la nourriture fournie (E836 : classe II, décontamination supérieure avec bardane ; E837, classe II, décontamination inférieure avec salade ; E838 classe I, décontamination supérieure avec aliment 1 (E3) : E839 classe I, décontamination inférieure avec aliment 2 (4F)). Ceci peut représenter un intérêt dans l'hypothèse de l'importation ou de la récolte sur le territoire national d'escargots ayant accumulés du plomb et pouvant être décontaminés par nourrissage avec un aliment contrôlé pendant une période de stabulation.

Selon Dallinger (1993), *Helix pomatia* est un microconcentreur de plomb (FBC = 1,3) et un macroconcentreur de cuivre (FBC = 10), de cadmium (FBC = 6 à 20) et de zinc (FBC = 1 à 9).

I.9.4. Propositions concernant les concentrations en métaux dans l'aliment d'élevage (figure 54)

Les données établissant les corrélations entre les concentrations en cuivre dans l'aliment et les concentrations en cuivre dans la masse viscérale mettent en évidence que jusqu'à 30 mg/kg d'aliment en MS tous les individus d'un lot ou au moins certains individus d'un lot relèvent de la classe I, classe qui existe dans 50% des lots de la nature. Or les aliments analysés (29 d'origine et de composition différentes) contiennent entre 11 et 243 mg de cuivre/kg d'aliment en MS). Il convient donc de diminuer la quantité de cuivre dans l'alimentation, ce qui est possible puisque dans certaines formulations, il y a ajout de sulfate de cuivre.

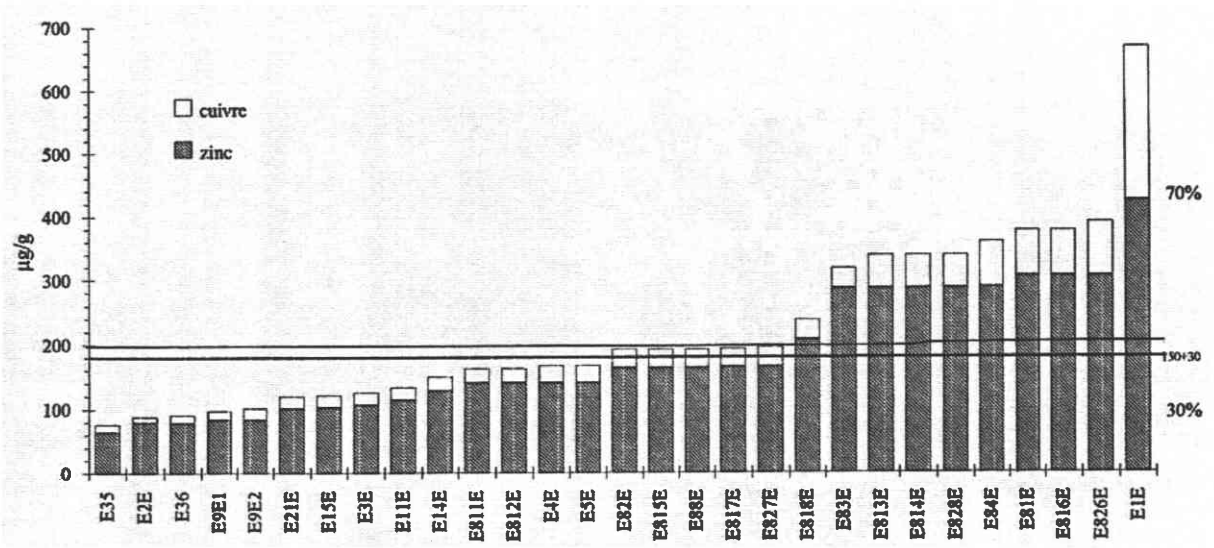


Figure 54 : Gamme de concentration acceptable en cuivre + zinc dans l'aliment

En ce qui concerne le zinc, pour les lots d'élevage étudiés, les concentrations en zinc dans l'aliment varient de 64 à 435 mg de zinc/kg d'aliment en MS. La corrélation établie entre la concentration dans l'aliment et la concentration dans la masse viscérale montre que jusqu'à une concentration dans l'aliment de 100 mg de zinc/kg d'aliment en MS, les lots étudiés relèvent de la classe I, classe qui existe dans 35% des lots de la nature même si entre 100 et 170 mg de zinc /kg d'aliment en MS, certains lots relèvent encore de la classe I. Il apparaît qu'une concentration en zinc de 100 mg de zinc/kg d'aliment en MS soit recommandable.

Le zinc et le cuivre étant des oligo-éléments essentiels majeurs chez l'escargot, nous proposons de retenir la somme des concentrations dans les deux métaux avec une valeur à ne pas dépasser qui serait de 30 mg de cuivre/kg d'aliment en MS et de 170 mg de zinc/kg d'aliment en MS soit un total de 200 mg de cuivre + zinc/kg d'aliment en MS avec, compte tenu des mélanges peu reproductibles dans la fabrication des aliments, une variabilité entre 180 et 200 mg de cuivre + zinc/kg d'aliment en MS. Pour les échantillons étudiés, 14 présentent une somme inférieure à 180, 5 sont dans l'intervalle 180 – 200 et 10 dépassent nettement les 200 mg de cuivre + zinc/kg d'aliment en MS.

Pour le cadmium, les données acquises en élevage permettent de retenir l'absence de changement de classe I en classe II pour les viscères jusqu'à une concentration de 0,7 mg de cadmium/kg d'aliment en MS.

Pour le manganèse, cette limite se situe à 200 mg de manganèse/kg d'aliment en MS.

Pour le plomb, on peut fixer, par extrapolation, la concentration acceptable à 2,5 mg de plomb/kg d'aliment en MS.

Pour le fer, la gamme de concentrations obtenues dans les différents aliments n'a pas d'incidence sur la concentration dans les viscères. Une valeur guide de 700 mg de fer /kg d'aliment en MS est proposée. Pour le chrome, les résultats obtenus ne permettent pas de proposer une concentration dans l'aliment.

Chapitre II : Comparaison des capacités de bioaccumulation de cuivre et de zinc chez deux sous espèce d'*Helix*, *Helix aspersa aspersa* et *Helix aspersa maxima*

Gomot, A. et Pihan F., 1997. Comparison of the Bioaccumulation Capacities of Copper and Zinc in Two Snail Subspecies (*Helix*). Ecotoxicology and Environmental Safety 38, 85-94.

Received December 27, 1996

Bioaccumulation analyses of copper and zinc were carried out in two snail subspecies (*Helix aspersa aspersa* and *Helix aspersa maxima*) after 3 months of controlled farming (out of ground) with foods of different formulations. The results reveal some clear interspecific differences in affinity toward copper and zinc. For the two metals considered, *H. aspersa aspersa* has a bioaccumulation capacity much greater than that of *H. aspersa maxima*, mainly in the foot for copper and in the viscera for zinc. After 3 months, the concentrations of copper in feet and viscera are much higher than those presented in the literature on field animals. The farming and the analysis methodologies permitted obtaining snails under standard condition and open the way to the development of rational protocols for ecotoxicological studies in a laboratory as well as in the field. © 1997 Academic Press

Key Words: Snails; bioaccumulation; copper; zinc; farming.

INTRODUCTION

The metal accumulation capacities of the terrestrial pulmonate gastropods have been the focus of investigations carried out in most cases with wild animals collected in field (Table 1). The determination of the amount of metal in organs of animals collected in wild populations has permitted the establishment of cartographies of biotop quality (Dallinger and Berger, 1992), which confirm the advantage of using snails as pollution bioindicators (Coughtrey and Martin, 1977). These authors, working with *Helix aspersa* Müller, have determined that animals of similar weight and/or height are suitable for the use as biological indicators of metallic pollution. Williamson (1980) has pointed out, for *Cepaea nemoralis*, that other variables must be considered, such as the photoperiod and the pluviosity, and he has confirmed the importance of the weight and the age of the animals studied. Analysis of the metal content in different species of collected gastropods at wild sites have revealed some differences in accumulation between very close species of slugs (Greville and Morgan, 1989) collected from an old Pb–Zn mine. Similar observations have been made on different species of snails (Rabitsch, 1996). In the field this variation can be attributed to variable alimentary preferences according to the species or to interspecies differences in metabolism. To determine which of these two hypotheses is right, a choice was made to feed two subspecies of snails with the same foods.

The technique of snail farming (*Helix*) worked out at the laboratory (Gomot and Deray, 1987; Gomot, 1994) allows snails with a known biological past to be obtained during every season. It appears that the mastery of farming is an interesting factor in studying the dynamic of the accumulation of metals in eliminating the influences of the environmental fluctuations pointed out by the authors working with wild populations.

Helix aspersa aspersa (*H a a:* Petit Gris) and *Helix aspersa maxima* (*H a m:* Gros Gris) are two subspecies particularly well adapted to farming because their growth is quick: the adult height can be obtained in 3 months under optimal conditions, as previously studied (Gomot, 1994), with very different weights between the subspecies (8 to 12 g for *H a a* and 15 to 25 g for *H a m*).

The aim of the present study was to analyze the accumulation of copper (Cu) and zinc (Zn) in snails of the two subspecies *H a a* and *H a m* after 3 months of farming under controlled conditions, according to the composition of four foods. The contents of these two metals have been preliminarily determined in food in order to compare the bioaccumulation factors in the two subspecies. Cu and Zn were chosen for two reasons: first, these metals constitute the essential trace elements in the snails' biology (Cu enters in the constitution of the respiratory pigment and Zn is an indispensable oligoelement); second, Cu and Zn are often emitted in large quantities during human use of products (fertilizers, pesticides, herbicides, industrial wastes, mine exploitation, siderurgy, steel works, motorway activities: vehicles, security slides, and wire netting) and can be considered for study of environmental contaminations.

MATERIALS AND METHODS

Environmental Parameters

Snails were reared under a long photoperiod, 18 h L/24 h, at 20 ± 2°C with a hygrometry of 80–95%. During the first 4

0147-6513/97 $25.00
Copyright © 1997 by Academic Press
All rights of reproduction in any form reserved.

TABLE 1

Some Data in the Literature on Registered Concentrations of Copper and Zinc in Pulmonate Gastropod Mollusks

Species	Origin	Details on snails or feed	Organs analyzed	Metal (mg/kg DM) Copper	Zinc	Reference
Cepaea nemoralis	Nature	Different distances from a smelting site	Body without shell	30 to 86	85 to 413	Martin and Coughtrey, 1982
Helix aspersa					644 to 714	
		Estimated age, 1 to 5 years and more			2,300 to 702	Beeby and Eaves, 1983
Helix aspersa	Indoor breeding	Mean weight of snails, 2.5 g and 3.5 g		162	671	Claves and Demeyer, 1986
Arion ater	Nature	Different distances from a major road		85	705	Popham and d'Auria, 1980
				61	507	
				101	575	
				105	846	
		Near a Pb/Zn mine		68	923	Greville and Morgan, 1990
Arianta arbustorum		Uncontamined or contaminated sites		100 to 400	130 to 301	Berger and Dallinger, 1993
Achatina fulica	Breeding	Rabbit pellets Cu, 16; Zn, 129; 2.5 months old	Hepatopancreas	412	404	Ireland, 1988
		Rabbit pellets 4 months	Foot	20	44	Ireland and Marigomez, 1992
			Hepatop.	21	178	
		The same + 1.5% CaCo3	Foot	17	41	
			Hepatop.	9	262	
Helix pomatia	Nature	Lettuce and then enriched lettuce (Cu: 1142) 3 weeks	Foot C, DM	120		Moser and Wieser, 1979
			T, DM	133		
			Hepatop. C	30		
			T	192		
		Lettuce (Cu, 28; Zn, 206) for 1 month and then enriched lettuce (Cu, 534; Zn, 761) 1 month	Mantle C	102	69	Dallinger and Wieser, 1984a
			T	253	69	
			Foot C	95	99	
			T	150	99	
			Hepatop. C	96	585	
			T	174	1,285	
		Same treatment	Hepatop. C	443	1,184	Dallinger and Wieser, 1984b
			T	201	2,050	
			Hepatop.	Mean, 218 (124 to 299)	Mean, 1,150 (550 to 2,570)	Reinskog and Petersson, 1990
Review on:						
Seven species of snails		Uncontamined or contaminated sites		30 to 408	86 to 1,868	Berger and Dallinger, 1993
Nine species of slugs						
Helix pomatia		Uncontamined or contaminated sites	Most representative is hepatop. (max. values* in *B. fructicum*) and kidney (max. values** in *A. arbustorum*	600 **	11,854 *	Rabitsch, 1996
Aegonis verticillus						
Arianta arbustorum						
Brudybaena fructicum						
Helix pomatia		Uncontamined or contaminated sites	Foot	143 and 145	72 and 70	Pihan *et al.*, 1994b
			Hepatop.	172 and 135	206 and 1,008	
Helix aspersa		Outdoor enclosure feed + vegetables	Foot	88 and 206	67 and 43	
			Hepatop.	72 and 227	126 and 252	
Helix aspersa asperso	Indoor breeding	3-month-old snails feed (three types, Table 2)	Foot	42 to 2113	45 to 80	Present results
			Hepatop.	59 to 1304	255 to 1580	
Helix aspersa maxima			Foot	31 to 1540	45 to 57	
			Hepatop.	44 to 915	204 to 1142	

Note. DM, dry matter; C, control; T, treated; hepatop., hepatopancreas.

farming weeks, young snails were fed with Helixal (Clairvaux Les Lacs, France) first age, and then for the 8 following farming weeks with Helixal second age (two different productions were tested: A and B) or Sanders (Athis-Mons, France) (C), or UCAAB (Chateau Thierry, France) (D). Table 2 lists the main constituents of these foods. The density of the snails was 500 individuals/m^2 the first 4 farming weeks and then 100 individuals/m^2 for the following weeks of growth. The different farming stages took place in farming cages for snails (Patent 80/27741) focused at the laboratory. Under these conditions, the only manner of contamination is trophic contamination.

Chemical Analysis

Analyses are carried out individually on five animals for each plot. The snails are starved 48 hr before being frozen at –20°C. After defrosting, the shell and the body are separated. The body is cut into two parts: the first one, called foot (F), involves the muscular sole, the mantle edge, the esophagus, and the salivary glands, as well as the anterior part of the genital system and the ovispermiduct; the second, called viscera (V), involves the rest of the body (digestive gland, kidney, heart, gonad, and albumen gland). Part of the hemolymph and the mucus is lost on the instruments and the fingers (loss between 12 and 15% with regard to the total weight of the snail

TABLE 2
Proximate Analysis of the Snail Feeds

Snail feed	Proteins (g/100 g)	Lipids (g/100 g)	Ash (g/100 g)	Calcium (g/100 g)	Copper (mg/kg)	Zinc (mg/kg)
A	13.4	4.3	31.4	10.8	28 ± 15.8	287 ± 11.4
B	12.8	3.4	35.5	13.1	243 ± 77.1	207 ± 8.4
C	15.5	1.1	34.5	12.7	19 ± 0.4	165 ± 4.5
D	14	1.8	25	7.9	52 ± 12.9	306 ± 1.4
Uncontaminated lettuce[a]					28 ± 12.4	206 ± 75
Enriched lettuce[a] ($ZnCl_2$, $CuCl_2$)					534 ± 116	761 ± 330

[a] From Dallinger and Wieser (1984a).

with shell). Feet and viscera are then dried at 60°C to a constant weight and crushed by means of a mortar. A total of 300 ± 10 mg of a sample are mineralized with 4 ml of HNO_3 diluted at 50% (quality Normapur) under pressure in a plugged tube. The tubes are polyethylene. Mineralization is developed in a drying oven at 65°C for 24 hr. After cooling, the volume is settled at 19 ml with distilled water. A centrifugation at 1500 rpm for 15 min may be necessary if the presence of particles that may disturb the analysis is noted. In this case, the analysis is carried out on the supernatant. Blanks, in series of 20 tubes, allow evaluation of the contribution of metals not of interest in the analysis. The mineral samples are stored in a cold chamber at 4°C until the analysis. Copper and zinc amounts were determined by atomic absorption spectrophotometry with an air–acetylene flame (Perkin–Elmer).

The results are expressed in milligrams per kilogram of dry weight: average + standard deviation. When the standard deviation is not indicated, the result has been obtained from a pool of animals (the animals' numbers by pool are indicated in Table 3).

Statistical Analysis

Significant differences were analyzed using the Mann–Whitney *U* test (Siegel, 1956) for the batches with individual results. Using a pool of snails for analyses does not allow statistical comparison of results.

RESULTS

Global Analysis of the Metals in Food and in Snails

In foods A and C, Cu contents are close to those determined in the vegetal food (uncontaminated lettuce) used by Dallinger and Wieser (1984a), whereas food D has a Cu content twice as high and the food B has a Cu content eight times higher. The classification in increasing concentration of Cu is C < A < D < B. For Zn, the contents are of the same magnitude for foods B and C and similar to those in the uncontaminated lettuce (Table

TABLE 3
Copper and Zinc Concentrations in the Foot and Viscera of Two Species of Snails Reared with Different Feeds

Species	Snail feed	Age (months)	Mean weight (g ± SD)	Copper (mg/kg of dry matter)				Zinc (mg/kg of dry matter)			
				Foot	SD	Viscera	SD	Foot	SD	Viscera	SD
Helix aspersa maxima	A	3	19.1 ± 2.8	144.3 ± 42.6		92.7 ± 10.8		55 ± 5.8		1141.8 ± 541.5	
	B		20 ± 1.9	1261.9 ± 153.3		915 ± 102.6		57.7 ± 4.2		343.7 ± 75.9	
			20.6 ± 1.9[b]	1540		687		50		360	
	C		19.3 ± 3.1	31.7 ± 8.8		44.2 ± 7.6		53 ± 3		331.8 ± 94.4	
	D		17 ± 2	95.9 ± 22.1		98.2 ± 13.3		45.1 ± 4.4		204.3 ± 30.2	
Helix aspersa aspersa	A	3	9.6 ± 1.5[b]	252		60		80		1580	
	B		10.8 ± 0.4	2113 ± 206.2		1304.6 ± 236.4		65.1 ± 3.5		255.4 ± 73.9	
	C		14.3 ± 2.3	42.6 ± 6.7		59.1 ± 4.8		45.4 ± 3.8		417.1 ± 90.4	
Helix pomatia	Nature and then (1)[a]	Unknown	18	95 ± 40		96 ± 57.7		99 ± 27.2		585 ± 163	
	Nature and then (2)[a]		to 25	150.1 ± 20		174 ± 44.5		99 ± 37.7		1285 ± 301.3	

[a] From Dallinger and Wieser (1984a): (1) uncontaminated lettuce for 32 days; (2) enriched lettuce for 32 days.
[b] Values for a pool of 20 snails.

2): the contents in foods A and D are 1.5 times higher. The classification in increasing concentration of Zn is C < B < A < D.

In snails (Table 3), Cu is quite uniformly spread in the foot and the viscera, whereas for the upper values of about 50 mg/kg in food, it is mainly in the foot (in five cases of seven) (Fig. 1A). Zn is always found mainly in the viscera, at concentrations varying according to the food; its concentration in the foot is lower and relatively constant independent of the Zn concentration in the food (Fig. 1B).

From these analyses (Tables 2 and 3), relations that can be established between the concentrations of Cu and Zn in foods and in one of the subspecies (*H a m*) are first emitted, and then the bioaccumulation differences between *H a m* and *H a a* are questioned.

Analysis of the Metals in Helix aspersa maxima

For *H a m* fed with the four foods; A, B, C, and D, for 3 months, it is noted that: (i) The Cu contents in the foot and viscera of the animals fed food B are very high and are greater than those of animals fed the three other foods (generally $P < 0.01$ and in the case of foods B/C (foot), $P = 0.0143$). The multiplying coefficients are presented in Table 4; they are of the same magnitude in the food and in the viscera. A good correlation of the results obtained with five snails individually titrated or on a plot of some snails (Table 3, food B) is noted. The excess of Cu in food B is perfectly traduced by the contents of both parts of the animal (Table 3, Fig. 1A). In contrast, for the foods A and D, the Cu concentrations in the organs are not significantly different. The hypothesis that a regulating process exists unto a Cu content in the food of 50 mg/kg can be emitted.

(ii) For Zn, a very high concentration is noted in the viscera of *H a m* eating food A (Table 3; significant difference for foods A/B and C $P < 0.01$). This very important accumulation of Zn in the viscera (see multiplying factors in Table 4)

TABLE 4

Comparison of Multiplication Factors of the Copper and Zinc Concentrations in the Foot and Viscera of *Helix aspersa aspersa* and *Helix aspersa maxima* Sustained with Feeds A and B

Species	Multiplication factor of the concentration: Of copper in snails reared with feed B/in snails fed with feed A		Of zinc in snails reared with feed A/in snails fed with feed B	
H. aspersa maxima	Foot:	×9.7	Foot:	×1
	Viscera:	×8.6	Viscera:	×3.2
H. aspersa aspersa	Foot:	×8.3	Foot:	×1.2
	Viscera:	×21.7	Viscera:	×6.1

with food A is difficult to attribute only to its total metal content in the food. In fact, foods A and D have the same indices of Zn concentration according to the screen proposed by Pihan *et al.* (1994a) with [D] > [A], but the Zn concentrations in the tissues (foot and viscera) of the animals eating food D are lower than the Zn concentrations in the viscera of the snails fed with the other three foods. This is probably due, on the one hand, to the chemical form of the metal incorporation in the food and, on the other hand, to the interactions with the other food constituents. The problem is the bioavailability of the metal.

According to the relationship between the size of the snails and the concentration or content of the metal in the animal described by some authors (Coughtrey and Martin, 1977; Williamson, 1980), comparisons of the concentrations and the total contents in each snail at the same age (presented for five *H a m* fed with D, Figs. 2A and 2B) indicate no clear correlation between these parameters for Cu. For Zn, small increases in the content and in the concentration according to the dry weight are observed. Williamson (1980), however, in *Cepaea*, observed only an increase in the content correlated to the body

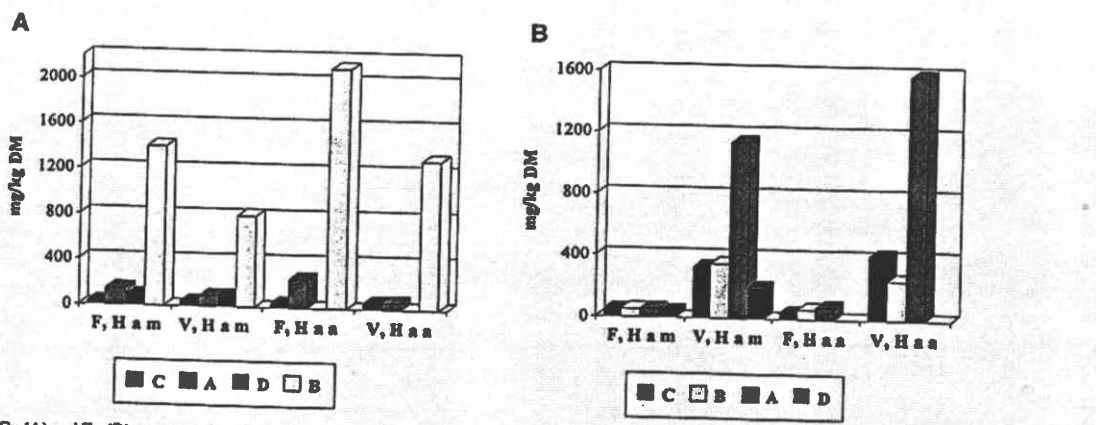


FIG. 1. Cu (A) and Zn (B) concentrations in foot (F) and viscera (V) of 3-month-old *Helix aspersa aspersa* (H a a) and *Helix aspersa maxima* (H a m) reared with four different feeds.

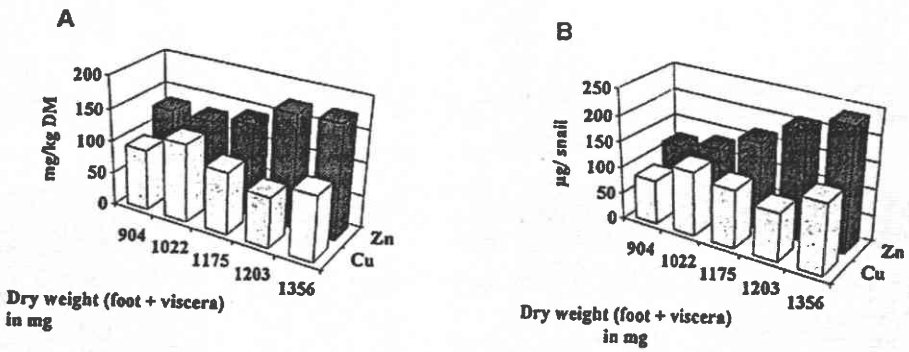


FIG. 2. Cu and Zn in 3-month-old *Helix aspersa maxima* reared with feed D. (A) Concentration in mg/kg dry matter (DM). (B) Body burden in µg per snail.

weight [between 0.05 and 0.3 g dry matter (DM), but an opposite relation for the concentration. These divergent results could be connected with the interspecies differences between *Helix* and *Cepaea*, but could also arise from the fact that the age of the *Cepaea* was not precisely known.

Comparison between H a m *and* H a a

For the three foods tested in the two subspecies, the Cu content in the foot was always higher in *H a a* (Table 3, Fig. 1A), even when the differences did not always have the same significance level (food B, $P < 0.01$ for foot and viscera; food C, $P < 0.05$ for viscera and nonsignificant difference in the foot).

The high accumulation of Cu observed in the foot and in the viscera of *H a m* with food B also occurred in *H a a* (significant difference with regard to the plot of *H a m* food B, $P < 0.01$), but in a much more intense way in the viscera (Table 4).

The Zn contents in the foot are equivalent in both the studied subspecies (Fig. 1B) and, if some weak divergences appears, they vary according to the food considered (e.g., feed B; *H a m* < *H a a*, $P = 0.0283$; and feed C, *H a m* > *H a a*, $P = 0.0143$). The Zn accumulation in the viscera with food A observed in *H a m* is twice as high in *H a a* (Table 4, Fig. 4). For foods B and C the Zn concentrations in the viscera are not significantly different between *H a a* and *H a m* ($P = 0.05$).

The experimental results complete the anterior data concerning the analysis of the foods and of the seven snail from the farm (Table 5). For Zn, foods A, B, and C range between 140 (the highest concentration analyzed in snail farming) and 300 mg/kg. For Cu, food B shows a concentration three times higher than the concentration analyzed in the farming of snail 1, which received the food most enriched in Cu, and foods A, C, and D the Cu contents range from 18 to 80 mg/kg. Taking nine data for Cu (in the range 18 to 240 mg/kg) and seven data for Zn (in the range 80 to 287 mg/kg) allow us to propose, in

TABLE 5
Relation between Copper and Zinc Concentrations in Snail Tissues and Snail Feeds

Species	Food	Copper (mg/kg of dry matter)			Species	Food	Copper (mg/kg of dry matter)		
		Food	Foot	Viscera			Food	Foot	Viscera
Helix aspersa aspersa	A	28	252	60	*Helix aspersa maxima*	A	28	144	93
	B	243	2113	1305		B	243	1262	915
	C	19	43	59		C	19	32	44
	1	80	619	422		D	52	96	98
	2	72	179	157		6	22	147	101
	3	18	237	164		7	19	193	172
		Zinc (mg/kg of dry matter)					Zinc (mg/kg of dry matter)		
	Food	Food	Foot	Viscera		Food	Food	Foot	Viscera
	A	287	80	1580		A	287	55	1142
	B	207	65	255		B	207	58	344
	C	165	45	417		C	165	53	332
	4	103	71	157		6	84	57	199
	5	141	70	259		7	129	59	325

Note. Foods 1 to 7, data from seven different farms of snails.

the scale of analyzed concentrations, equations establishing the linear relation between the concentration in the food and the concentrations in the foot and in the viscera (Fig. 3 and 4), respectively. For the lowest Cu and Zn concentrations in the food, the assimilation of these two essential metals is not accompanied by accumulation, and regulating processes may exist.

Comparison of the bulk Cu and Zn concentrations in snail tissues with the concentration in the food illustrates the similarities in the responses of the two subspecies, with a much higher accumulation of the metals in the viscera of *H a a* than in that of *H a m*.

DISCUSSION

Comparison of the Concentrations of Cu and Zn in H a a *and* H a m *with Those Related in the Literature for Gastropods*

Comparison with an experimental contamination of Helix pomatia (Dallinger and Wieser, 1984a). Experimental contaminations by Zn carried out in adult of *Helix pomatia* for 1 month (Dallinger and Wieser, 1984a,b; see Table 1) have indicated an accumulation level of Zn in viscera similar to that which we obtained after 2 months in *H a a* and *H a m* with food A (Table 2), which contains 2.6 times less Zn than the enriched lettuce (761 mg/kg in Zn) used by these authors.

For Cu, our results agree with those of Dallinger and Wieser (1984a,b). These authors also observe the accumulation of this metal in the foot and viscera of *H. pomatia* fed for 1 month with contaminated lettuce (534 mg/kg DM), but this accumulation (maximum in the mantle, 253 mg/kg DM) is much less (155 and 174 mg/kg DM, respectively, for the foot and the viscera) than that noted in the two subspecies of *H. aspersa* (from 915 to 2113 mg/kg DM) fed for 2 months with food B(243 mg/kg DM).

Several factors can explain the differences noted: the most probable is the existence of interspecific variations of affinity for Cu, as there is between *H a a* and *H a m*. A classification of the ability to bioaccumulate Cu can be proposed: *H a a* > *H a m* ⋙ *H. pomatia*. It also may be possible that the chemical form of Cu in food B ($CuSO_4$) is more readily available for snails than the $CuCl_2$ used by Dallinger and Wieser. It is also possible that the age of the animals may be a factor in the lower accumulation of Cu; indeed, we used young snails (3 months old) in the final phases of growth, while Dallinger and Wieser used adult animals which have a less intense metabolism.

Comparison with other species of gastropods from different origins. The variations in Zn concentrations in the tissues of snails from our farming are of the same order as those in the literature (Table 1). In contrast, it is necessary to emphasize that the Cu contents, which were extremely high in 3-month-old adult *H a a* and *H a m* fed food highly contaminated with Cu (Food B), were higher in the foot and in the viscera than all

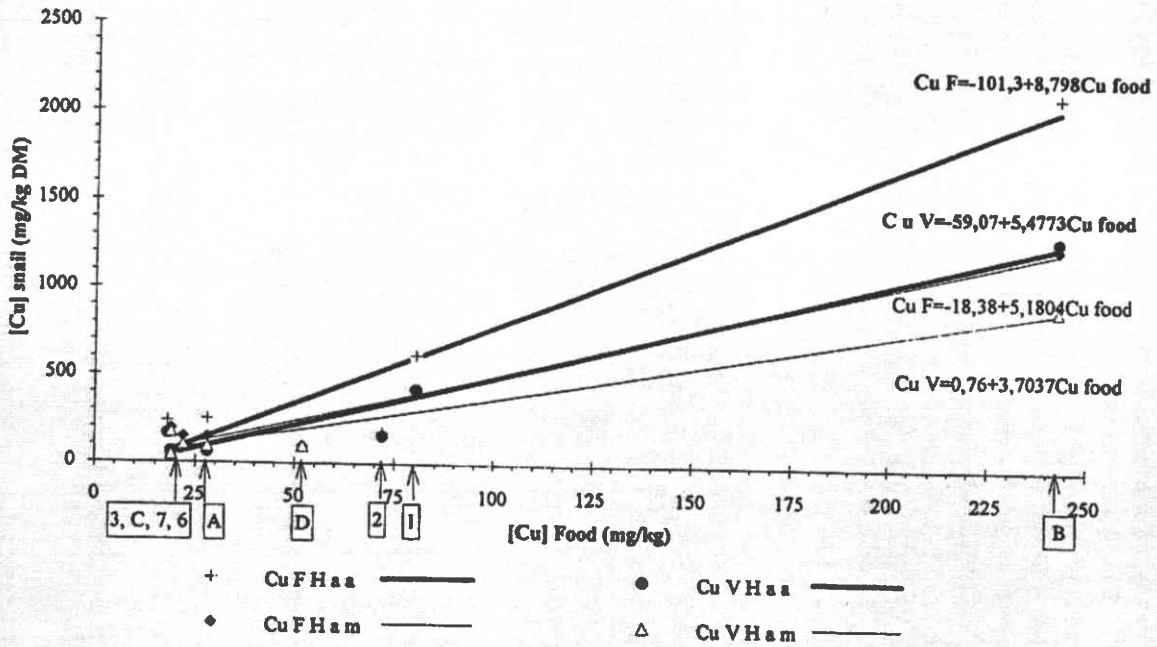


FIG. 3. Relation between copper concentration in foot (F) and in the viscera (V) of the farming snails (H a a and H a m) and the copper concentration of the food.

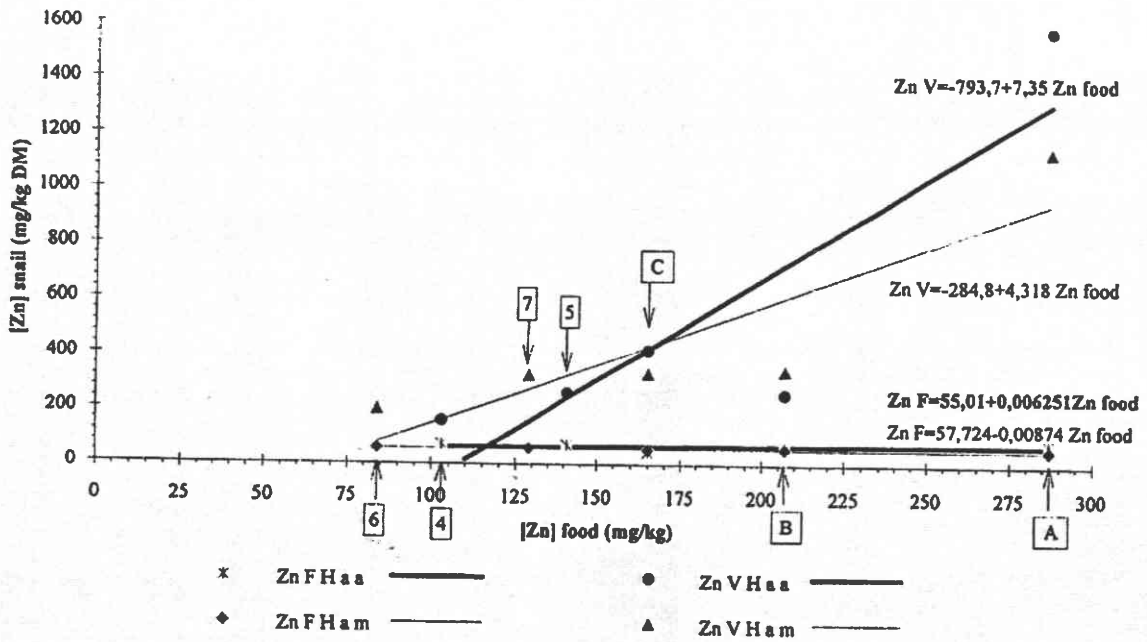


FIG. 4. Relation between zinc concentration in the foot (F) and in the viscera (V) of the farming snails (H a a and H a m) and the zinc concentration of the food.

data reported until now (Table 1). Apparently, there is no study on the accumulation of the metals in animals for which the age was precisely known and that were grown at a rapid rate by a productive farming method (adult height at 3 months against 1 to 4 years in field), expect the study of Pihan *et al.* (1994a). The metabolism, very intense under our farming conditions, can generate the very high contents that we have determined. These results provide support for the use of young snails in the evaluation of the environmental contamination for short terms. This perspective is interesting as a complement to studies carried out with wild animals, which also reveal the field contamination but for longer terms.

Bioaccumulation Factor (BF)–Contamination Factor (CF)

These two factors are interesting to consider because they point out the variable affinities of snails for Cu and Zn (expressed by BF) and the levels of contamination that result from this (expressed by CF). BF is the ratio between the metal concentration in the tissues of the snail (foot and viscera) and the metal concentration in the food.

The contamination factor is the ratio between the concentration in a given animal and the concentration in a reference animal chosen among all the plots as the one showing the lowest concentrations. The CF seems to allow comparisons of the deviations of this factor in different populations of wild snails and our animals farmed under out-of-ground conditions. It is only for *H a a* that Pihan *et al.* (1994b) have proposed reference concentrations (43 and 126 mg/kg DM for Zn, respectively, in P and V; 72 and 62 mg/kg DM for the Cu in the foot and the viscera). For *H a m*, there are not enough data available from wild snails to establish reference values.

Bioaccumulation factors. For Cu in *H a m*, the BF values (Table 6) in the foot with foods A and B are of the same order (from 5.1 to 5.7) whatever the concentration of Cu in the food (28 mg/kg DM in A and 243 mg/kg DM for B). This is also the case for *H a a*, where BF is from 9 to 8.7 for both foods, underlining the still higher affinity of this species for Cu. This result is in line with observations of Moser and Wieser (1979), who proved that the percentage of Cu assimilation in *H. pomatia* increases from 82.5 to 88.5 and 97% when the food concentration (lettuce contaminated with sulfate or copper chloride) is increased from 30 to 230 and 1390 mg/kg DM Cu.

For Zn, in the foot, the BF values are lower than 1. In the viscera, the higher BF are found in *H a a* eating food A. The affinity for Zn seems to be also independent of the dose in the foods, and it is also the strongest in the viscera of *H a a* (max BF, 5.5 with food A). The organotropism of Zn toward the viscera is also clearly demonstrated.

Using an artificial diet contaminated with Cu and Zn as nitrates, Laskowski and Hopkin (1996) showed that these metals accumulated in soft tissue of adults *H a a* in proportion to their concentration in the food. In bulk, we also observed this relation but our results also revealed that the chemical form of metals and the nature of the food may affect their accumulation

in snails. This is particularly clear when the BF values are considered.

Contamination factors. The deviation in CF observed by Pihan *et al.* (1994b) in wild snails are reported in the bottom row of Table 6: the highest CF for Zn in the viscera is found in *H. pomatia*, collected from a class I dumping ground that has received many metallic hydroxides (predominance of Zn and less of Cu) after a treatment of physicochemical precipitation (Pihan *et al.*, 1996).

The CF established in the present study points out the very important contamination by Cu of *H a a* fed with food B, for which the CF is twice the maximum CF found in wild animals in vine-growing soil (Pihan *et al.*, 1994a). For Zn, a higher CF in the viscera than that found in field animals collected on polluted sites is noticed.

The levels of experimental contamination of farming snails can therefore surpass the levels found under field conditions at very contaminated sites. The lack of soil under our out-of-ground farming conditions may explain this result. In fact, under field conditions, the snails eat plants, but also the metals in the soil may be present in a chemical formulation less biodisposable than when they are incorporated in a specific food for the snails in a mineralized and vitaminized compound form.

CONCLUSIONS

The capacity to accumulate Cu and Zn differs in two *Helix* subspecies and varies according to the distributed alimentation. The metal concentration in food varies from one factory to another according to the origin of the raw materials and of the vitaminized compounds of minerals constituting the food, as Pihan *et al.* (1996) have underlined it; it is fitting now to study the effects of the different parameters on the bioaccumulation process, such as age, time of exposure to the contaminant, dose, and chemical form in which the metal is incorporated. These studies represent an important precedent for the use of snails, either as bioindicators under field conditions or as test organisms for the focusing of terrestrial ecotoxicological tests.

Results indicated that growth is not inhibited at a Cu concentration of about 250 mg/kg of food; also, research into doses harmful to the development of snails (with the objective of devising a test) will need to consider higher doses. It is also remarkable that the growth proceeds well at concentrations so different from those of foods C and B (respectively, 29 and 243 mg/kg in Cu).

The increases in the Cu and Zn contents 38 to 48 days after cessation of the alimentary contamination were noticed by Dallinger and Wieser (1984a): Cu, which increases especially in the foot and less in the hepatopancreas, decreases after a break in the contamination, whereas Zn stays at large amounts in the digestive gland. This kind of response indicates a long-term accumulation of the ingested Zn in the digestive gland (this is also the case for Pb and Cd according to these authors). Thus, in the terrestrial gastropods, the digestive gland constitutes the main site of accumulation and detoxification of the metals. However, the possibility of contamination by Pb in the foot has been pointed out in the field (Pihan *et al.*, 1996); it is therefore fitting not to forget analysis of this organ in evaluations of pollutants that can be carried by both digestive and transcutaneous means.

The tolerance of the snails to high doses of metals like Cu and Zn in the organs would be due mainly to the incorporation of the metals in pyrophosphate granules in calcium cells of the hepatopancreas (Dallinger, 1993). The hemocyanine would constitute a transitory storage site for the excess Cu, and a small amount of this metal would probably be associated with

TABLE 6
Bioaccumulation Factor (BF) and Contamination Factor (CF) of 3-month-old Snails Reared for 3 months under Controlled Conditions

Species	Snail feed	Copper				Zinc			
		CF foot	CF viscera	BF foot	BF viscera	CF foot	CF viscera	BF foot	BF viscera
Helix aspersa maxima	A	Undetermined because of lack of reference values in natural snails		5.1	3.3	Undetermined because of lack of reference values in natural snails		0.2	3.9
	B[a]			5.7	3.3			0.25	1.7
	C			1.6	2.3			0.32	2
	D			1.8	1.8			0.14	0.6
Helix aspersa aspersa	A	3.5	0.96	9	2.1	1.86	12.53	0.27	5.5
	B	29.3	21.04	8.7	5.3	1.51	2.02	0.31	1.2
	C	0.59	0.95	2.2	3.1	1.05	3.3	0.27	2.5
Recorded deviations									
Present snail breeding		0.59–29.3	0.95–21.04	1.6–8.7	1.8–5.3	1.05–1.86	2.02–12.53	0.14–0.32	0.6–5.5
Nature[b]		1.06–11.68	1.16–10.08	Undetermined		1.11–2.44	1.15–8	Undetermined	

[a] Mean of the two batches fed with feed B.
[b] From Pihan *et al.* 1994b.

a metallothionein. For the part of Zn not associated with the spherocrystals of the calcium cells, an important part would be bound to a ligand of low molecular weight not actually known (Dallinger, 1993); the other part would be chelated by some metallothioneins. These processes initiate the compartmentation and the isolation of metals that reduce their toxic effects. These different strategies of "resistance" to the toxicity of metal contaminants provide evidence that snails are important organisms to consider as accumulation bioindicators or also as a link in the alimentary chain, with an important role in biomagnification.

The use of the out-of-ground farming technique has made it possible to determine performance foods that allow harmonious and quick development of the snails to gastronomic custom! The results show that it is fitting to monitor the amount of metals in these foods to obtain animals of good quality (without excessive concentration of metals) for human consumption. According to the analysis carried out on numerous plots of *H. aspersa* and *H. pomatia* coming from the field or farming (outside or out of ground), Pihan *et al.* (1994a) suggest quality scales establishing four classes (I to IV by growing contents). According to these scales, for the class I in the viscera, the Cu values are less than 130 mg/kg DM and Zn values less than 150 mg/kg DM.

This innovative method may also be used in developing tests with snails as bioindicators of pollution by measuring factors such as bioaccumulation, effects on growth (Gomot, 1997a,b) and reproduction, modifications of enzymatic activities, and genotoxicity during exposure to pollutants. In the future, these tests could be carried out with standard animals for which the biological past is better known than for those collected in field. Indeed, Beeby and Richmond (1987) have indicated that snails from a contaminated site assimilate less of the lead to which they are exposed at the laboratory than animals collected at a noncontaminated site. This example illustrates one of the risks that binds us to the use of wild animals for experimental studies. This way seems to be promising because there are few standard tests to measure the bioaccumulation and/or the toxic effects on terrestrial invertebrates. Phillips (1993) underlines the importance of this method to support efforts to protect natural resources against pollution.

The differences in bioaccumulation of Cu and Zn, which have been pointed out in *H a a* and *H a m*, particularly in the digestive gland, fed for the same time with the same foods, correspond well with the differences in digestive physiology and cannot be attributed to the differences in the composition of the foods, as indicated by Greville and Morgan (1989).

We have described two subspecies, *H a a* and *H a m*, genetically distinct (Borgo *et al.*, 1995), well adapted to farming, and for which the viscera present a particular sensitivity to Cu and Zn. As a model, they are most suitable for testing "responses" to different toxins. Moreover, their use addresses the genuine interest in the evaluation of field contamination because these two subspecies have different geographical distributions (a wide distribution for *H a a* in temperate zones and a more restricted distribution for *H a m* in hotter climates).

More particularly, this work provides the basis of research complementary to that of authors who used wild snails to study metal biodisposability in order to evaluate ecological risks in the environment (Beeby, 1985; Beeby and Eaves, 1983; Richmond and Beeby, 1992; Dallinger and Berger, 1992; Rabitsch, 1996).

REFERENCES

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

Beeby, A., and Richmond, L. (1987). Adaptation by an urban population of the snail *Helix aspersa* to a diet contaminated with lead. *Environ. Pollut.* **46**, 73–82.

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

Borgo, R., Souty-Grosset, C., and Gomot, L. (1995). Etude de l'ADN mitochondrial d'espèces d'escargots du genre *Helix* par PCR-RFLP. *C. R. Soc. Biol.* **189**, 629–636.

Cluyes, E., and Demeyer, D. (1986). Nutritional quality of snails (*Helix aspersa*). In *32nd European Meating of Meat Research Workers, Proceedings II, Ghent*, pp. 415–418.

Coughtrey, P. J., and 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* **27**, 65–74.

Dallinger, R. (1993). Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates* (R. Dallinger and P. S. Rainbow, Eds.), pp. 245–289. Lewis.

Dallinger, R., and Berger, B. (1992). Bio-monitoring in the urban environment. In *Biological Indicators for Environmental Monitoring* (S. Bonotto, R. Nobili, and R. P. Revoltella, Eds.), pp. 227–242. Ares-Serono Symposia, Rome.

Dallinger, R., and Wieser, W. (1984a). 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*, **79**, 117–124.

Dallinger, R., and Wieser, W. (1984b). Molecular fractionation of Zn, Cu, Cd and Pb in the midgut gland of *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol. C* **79**, 125–129.

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 Doct. Univ. Franche-Comté, No. 398.

Gomot, A. (1997a). 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.

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

Gomot, L., and Deray, A. (1987). Les escargots. *La Recherche* **186**, 302–311.

Greville, R. W., and Morgan, A. J. (1989). 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., and Morgan, A. J. (1990). The influence of size on the accu-

mulated 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.

Ireland, M. P. (1988). A comparative study of the uptake and distribution of silver in a slug *Arion ater* and a snail *Achatina fulica*. *Comp. Biochem. Physiol. C* 90, 189–194.

Ireland, M. P., and Marigomez, I. (1992). The influence of dietary calcium on the tissue distribution of Cu, Zn, Mg, P and histological changes in the digestive gland cells of the snail *Achatina fulica* Bodwich, *J. Moll. Stud.* 58, 157–168.

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

Martin, M. H., and Coughtrey, J. (1982). Use of terrestrial animals as monitors and indicators. In *Biological Monitoring of Heavy Metal Pollution* (K. Mellamby, Eds.), pp. 253–271. Applied Science, London.

Moser, H., and Wieser, W. (1979). Copper and nutrition in *Helix pomatia* (L). *Oecologia (Berl.)* 42, 241–251.

Phillips, D. J. M. (1993). Bioaccumulation. In *Handbook of Ecotoxicology* (P. Calow, Ed), pp. 378–396. Blackwell, Oxford.

Pihan, J. C., Promeyrat, S., and Morhain, E. (1996). Les escargots (*Helix pomatia* L. and *Helix aspersa* M.) comme bioindicateurs du plomb en milieu terrestre. In *Aspects Analytiques du Plomb dans l'Environnement*, pp. 325–344. Tec. Doc., Lavoisier.

Pihan, J. C., Morhain, E., and Pihan, F. (1994a). Recherche des micropolluants métalliques (cuivre et zinc) dans l'escargot en milieu naturel et en élevage. Evaluation du facteur de contamination par la voie alimentaire (Cu, Zn, Cr, Fe, Mn). Journée Nationale Hélicicole, ITAVI, GNPE. Rennes, 1–10.

Pihan, J. C., Morhain, E., and Pihan, F. (1994b). Intérêt de l'utilisation des escargots terrestres comme bioindicateurs de la contamination d'un site par les métaux (Zn et Cu). Proposition d'une grille de qualité. Séminaire I. GELFI, Les sites contaminés. Diagnostic, évaluation des risques, traitement. 22, 29 mars 1994, pp. 87–95. EPML, B.P. 245, 54701 Pont-à-Mousson Cedex.

Popham, J.D., and D'Auria, J. M. (1980). *Arion ater* (mollusca: pulmonata) as an indicator of terrestrial environmental pollution. *Water Air Soil Pollut.* 14, 115–124.

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.

Reineskog, M., and Petersson, L. R. (1990). Aluminum, citrate and shell-repair: Effects on the distribution of metals in the snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol. C* 95, 201–206.

Richmond, L., and Beeby, A. (1992). A comparative study of lead uptake by three populations of snails *Helix aspersa* Müller. *Polish J. Environ. Stud.* 1, 9–13.

Siegel, S. (1956). *The Case of Two Independent Samples in Nonparametric Statistics.* (International Student, Eds.), p. 116. McGraw–Hill, Auckland.

Williamson, P. (1980). Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepaea hortensis* Müller. *Oecologia* 44, 213–220.

Chapitre III : Biosurveillance passive. Etude de la contamination polymétallique de populations autochtones en fonction d'activités anthropiques actuelles ou anciennes

III.1. Biosurveillance en environnement soumis à un trafic automobile

Cette étude s'est développée en environnement soumis à un trafic important : l'autoroute A7 sur l'aire de repos de la Manon vers Salon de Provence et la Nationale 7 entre Antibes et Nice dans le parc de Vaugrenier. Un site de référence, non concerné par le trafic a été retenu pour comparaison sur un site de restanques entre Vallauris et Antibes-lès-Pins (planche III_{1b}, figures 1 à 4 ; pour des études ultérieures).

Planche III_{1a} : Sites de collecte de gastéropodes autochtones

1. à 3 : Site autoroutier A7. Aire de repos la Manon.

- Figure 1 : Direction Salon de Provence, voie de pénétration vers l'aire de repos. Un talus végétalisé sépare l'autoroute de l'aire de repos. Etoile : Lieu de récolte d'espèces autochtones, *Helix aspersa aspersa* (A_{2a} et A_{2b}), *Eobania vermiculata* (A_1), *Pseudotachea splendida* (A_4), *Theba pisana.*
- Figure 2 : Aire de repos aménagée et végétalisée ; à gauche, talus séparant l'aire de l'autoroute.
- Figure 3 : Détail d'un massif de romarin avec escargots en estivation. Lieu de récolte de *Helicopsis striata* (A_3), *Cernuella neglecta* (A_5) et *Trochoïdea scitula.*

4. Site du parc de Vaugrenier bordé à droite par la Nationale 7 Antibes-Nice.

Etoile : lieu de récolte d'espèces autochtones en activité sous le lierre : *Oxychilus draparnaudi.* Sur le sol et dans l'humus : *Chondrina sp.* et *Pomatias elegans. Eobania vermiculata* et *Theba pisana* ont été récolté en état d'estivation sur les troncs et les plantes herbacées.

Planche III_{1a}



1



2



3



4

Planche III_{1b} : Site de collecte de gastéropodes autochtones sur des restanques entre Vallauris et Antibes-lès-Pins

1. **Restanques végétalisées en zone de production florale sous serre. Habitat dispersé**

2. **Gastéropodes autochtones :**

   - ① *Oxychilus draparnaudi* récolté sous le lierre des restanques (figure 3, étoile)
   - ② *Helix aspersa aspersa* (plantes herbacées)
   - ③ *Eobania vermiculata*
   - ④ *Rumina decollata* (pied de restanque)
   - ⑤ *Cernuella neglecta*
   - ⑥ *Theba pisana* en estivation sur aneth
   - ⑦ *Pomatias elegans* (zone humide au pied des restanques)

3. **Vue de l'enrochement d'une restanque avec couverture de lierre, lieu de récolte d'*Oxychilus draparnaudi*.**

   Le pied de restanque est plus humide avec présence de *Rumina decollata* et de *Pomatias elegans*. Au premier plan, aneth avec *Theba pisana* en estivation.

4. **Détail de la situation de *Theba pisana* en estivation sur un rameau d'aneth**

Planche III$_{1b}$



1



3



2



4

III.1.1. Autoroute A7. Aire de repos de la Manon

III.1.1.1. Espèces étudiées

Cinq espèces ont été analysées et numérotées de A_1 à A_5 :

- A_1 : *Eobania vermiculata* (n = 5) ;
- A_{2a} : *Helix aspersa aspersa* (n = 1) ;
- A_{2b} : *Helix aspersa aspersa* (n = 5) ;
- A_3 : *Helicopsis striata* (n = 5 lots de 5 individus);
- A_4 : *Pseudotachea splendida* (n = 5 lots de 2 individus)
- A_5: *Cernuella neglecta* (n = 5 lots de 2 individus)

Les différents individus des espèces A_1, A_3, A_4 et A_5 ont été récoltés sur le talus séparant l'autoroute de l'aire de repos, côté aire de repos, et sur les espaces verts plantés et engazonnés de l'aire de repos. L'individu *Helix aspersa aspersa* A_{2a} a été prélevé dans un regard du réseau d'eaux pluviales de la zone engazonnée. Les individus A_{2b} ont été récoltés sous les arbres, sur le talus bordant la zone de repos. A l'époque de la récolte (fin Août), les animaux sont en estivation (planche III_{1a}, figures 1 à 3).

III.1.1.2. Résultats

La grille étant définie pour la concentration métallique dans la masse viscérale de *Helix aspersa aspersa*, les différentes espèces seront comparées à *Helix aspersa aspersa* (figures 55 et 56).

- *Helix aspersa aspersa* (A_2) présente, pour A_{2a}, la plus faible concentration en cuivre (classe II) et pour A_{2b} une concentration plus élevée (classe III) alors que les autres espèces (A_1, A_3, A_4 et A_5) relèvent de la classe IV ;
- *Helix aspersa aspersa* (A_2) présente, pour A_{2a}, une concentration en fer relevant de la classe III ainsi que *Eobania vermiculata* (A_1). *Helix aspersa aspersa* (A_{2b}), *Helicopsis striata* (A_3) et *Pseudotachea splendida* (A_4) relèvent de la classe II. *Cernuella neglecta* (A_5) relève de la classe I ;
- *Helix aspersa aspersa* (A_2) présente, pour A_{2a}, une concentration en manganèse relevant de la classe III ainsi que *Pseudotachea splendida* (A_4). *Cernuella neglecta* (A_5) relève de la classe II. *Helix aspersa aspersa* (A_{2b}), *Eobania vermiculata* (A_1) et *Helicopsis striata* (A_3) relèvent de la classe I ;
- *Helix aspersa aspersa* (A_2) présente, pour A_{2a}, une concentration en zinc relevant de la classe III ainsi que *Helicopsis striata* (A_3) et *Pseudotachea splendida* (A_4). *Helix aspersa aspersa* (A_{2b}), *Eobania vermiculata* (A_1) et *Cernuella neglecta* (A_5) relèvent de la classe II ;

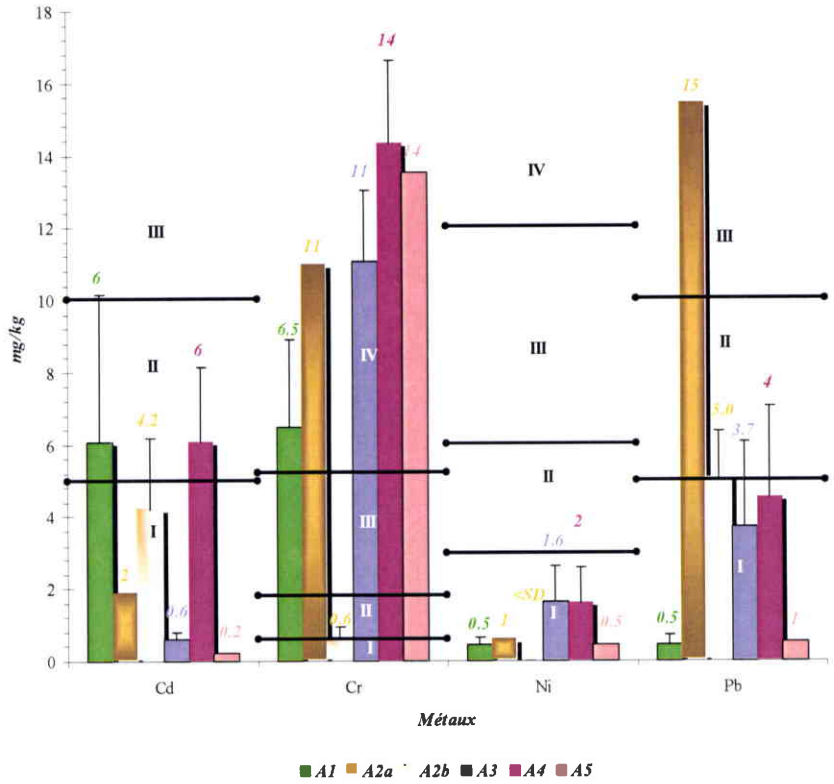


Figure 55 : Concentrations en Cd, Cr, Ni et Pb dans les viscères des escargots prélevés au bord de l'autoroute A7 sur l'aire de la Manon. (<SD : inférieur au seuil de détection)

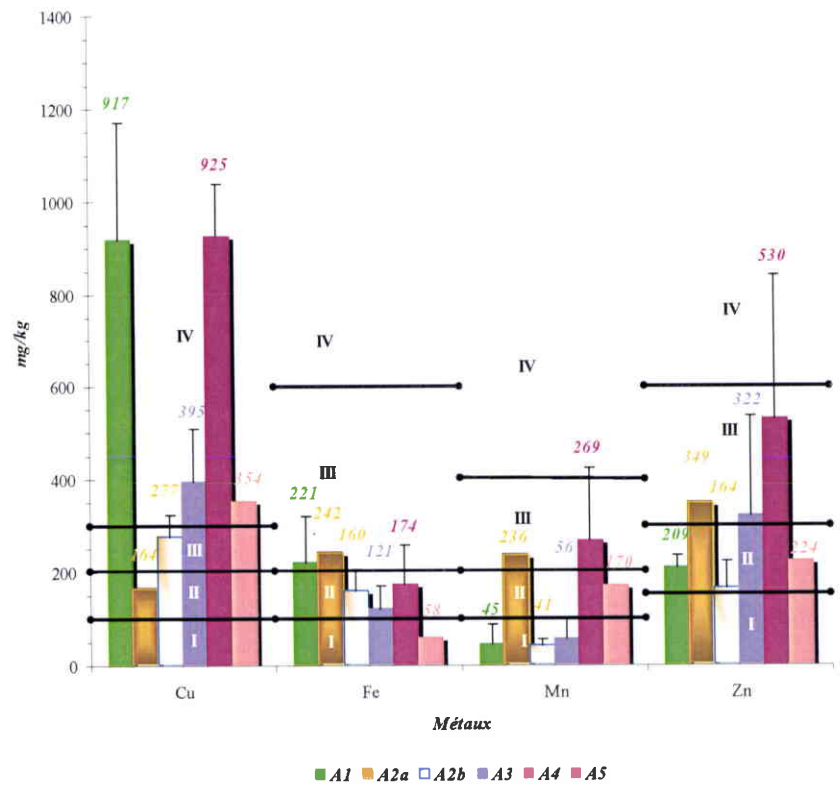


Figure 56 : Concentrations en Cu, Fe, Mn et Zn dans les viscères des escargots prélevés au bord de l'autoroute A7 sur l'aire de la Manon.

- *Helix aspersa aspersa* (A_{2a} et A_{2b}) présente une concentration en cadmium relevant de la classe I ainsi que *Helicopsis striata* (A_3) et *Pseudotachea splendida* (A_4). *Eobania vermiculata* (A_1) et *Cernuella neglecta* (A_5) relèvent de la classe II ;
- *Helix aspersa aspersa* (A_2) présente, pour A_{2a}, une concentration en chrome relevant de la classe IV ainsi que les autres espèces. Par contre, *Helix aspersa aspersa*, pour A_{2b}, relève de la limite inférieure de la classe II ;
- *Helix aspersa aspersa* (A_2) ainsi que les autres espèces (A_1, A_3, A_4 et A_5) présentent une concentration en nickel relevant de la classe I ;
- *Helix aspersa aspersa* (A_2) présente, pour A_{2a}, une concentration en plomb relevant de la classe III alors que *Helix aspersa aspersa* (A_{2b}) relève de la limite inférieure de la classe II et les 4 autres espèces relèvent de la classe I.

La prise en compte de l'indice de contamination polymétallique (ICPM), par sommation des indices inhérents à chaque métal (tableau 27), met en évidence le niveau global de contamination qui est le plus élevé (ICPM = 20) pour *Helix aspersa aspersa* A_{2a} en estivation dans un regard d'eaux pluviales de la zone enherbée avec bioaccumulation de Cr, Fe, Mn, Pb et Zn ; par contre, il est le moins élevé (ICPM = 14) pour la même espèce constituant le lot A_{2b} en estivation parmi les pierres du talus arboré limitant l'aire de repos. Le lieu de prélèvement révèle donc une grande importance et dans le cas présent, le contact avec les eaux du réseau de drainage apparaît comme déterminant. L'abaissement de la concentration en cuivre pour le lot A_{2a} (classe II) par rapport au lot A_{2b} (classe III) pourrait être expliqué par la présence à une concentration élevée des autres métaux, principalement du plomb et du zinc, métaux classiquement présents en environnement autoroutier et que l'espèce *Helix aspersa aspersa* met bien en évidence.

Parmi les autres espèces et en référence à la grille indicielle est établie pour *Helix aspersa aspersa*, *Pseudotachea splendida* (A_4), avec un ICPM également de 20, peut être proposé, dans les sites où l'espèce existe, comme espèce indicatrice en l'absence de *Helix aspersa aspersa*.

La capacité d'élevage d'*Helix aspersa aspersa* reste cependant le critère discriminatoire prépondérant si l'on souhaite utiliser en parallèle les biosurveillances actives et passives. En ce qui concerne les autres espèces, elles indiquent également une contamination biodisponible en chrome, cuivre, zinc, et pour certaines d'entre elles également en fer et en manganèse.

Pour toutes les espèces, il n'y a pas de mise en évidence de contamination du site par le cadmium et le nickel même si des différences inter-espèces dans les capacités de bioaccumulation apparaissent en ce qui concerne le cadmium ; *Helicopsis striata* (A_3) et *Cernuella neglecta* (A_5) présentent en effet des concentrations à la limite du seuil de détection, alors que *Eobania vermiculata* (A_1) et *Pseudotachea splendida* (A_4) présentent des concentrations 10 fois plus élevées.

En ce qui concerne l'origine des métaux, le plomb, détecté par *Helix aspersa aspersa* dans le réseau pluvial et plus faiblement dans la zone boisée, est d'origine automobile ; le chrome, le cuivre, le zinc, le fer et le manganèse ont une origine mixte, à savoir le trafic et la corrosion des structures métalliques nombreuses sur ce site : barrières de sécurité, panneaux de signalisation, portiques, arceaux …

Tableau 27 : Récapitulatif des classes pour les différents métaux des espèces étudiées (aire de La Manon).

	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn	ICPM
A_1	II	IV	IV	III	I	I	I	II	18
A_{2a}	I	IV	II	III	III	I	III	III	20
A_{2b}	I	II	III	II	I	I	II	II	14
A_3	I	IV	IV	II	I	I	I	III	17
A_4	II	IV	IV	II	III	I	I	III	20
A_5	I	IV	IV	I	II	I	I	II	16

A_1 : *Eobania vermiculata* ; $A_{2a\ et\ b}$: *Helix aspersa aspersa* ; A_3 : *Helicopsis striata* ; A_4 : *Pseudotachea splendida* ; A_5 : *Cernuella neglecta.*

III.1.2. Nationale 7. Parc de Vaugrenier

III.1.2.1. Espèces étudiées

Trois espèces ont été analysées et numérotées de V_1 à V_3 :

- V_1 : *Oxychilus draparnaudi* (n = 5) ;
- V_2 : *Eobania vermiculata* (n = 4) ;
- V_3 : *Pomatias* (*Cyclostoma*) *elegans* (n = 5 lots de 5 individus compte tenu de la taille).

Les individus sont récoltés en forêt dans les 40 mètres bordant la Nationale 7. *Oxychilus draparnaudi* (V_1) est en activité dans le lierre de base des arbres ; *Eobania vermiculata* (V_2) est en estivation, fixé en hauteur sur les arbustes ; *Pomatias elegans* est récolté sur le sol, dans l'humus humide (planche III_{1a}, figure 4).

III.1.2.2. Résultats

La grille, précédemment définie par référence à la concentration en métaux dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa*, a été appliquée aux trois espèces les plus courantes du site.

Les figures 57 et 58 mettent en évidence les capacités très différentes des trois espèces vis-à-vis de la bioaccumulation du cuivre et du plomb.

Pour le cuivre, *Oxychilus draparnaudi* (V_1) relève de la classe IV, *Eobania vermiculata* (V_2) relève de la classe III et *Pomatias elegans* (V_3) relève de la classe II.

Pour le plomb, *Oxychilus draparnaudi* (V_1) et *Eobania vermiculata* (V_2) relèvent de la classe II alors que *Pomatias elegans* (V_3) relève de la tranche inférieure de la classe I.

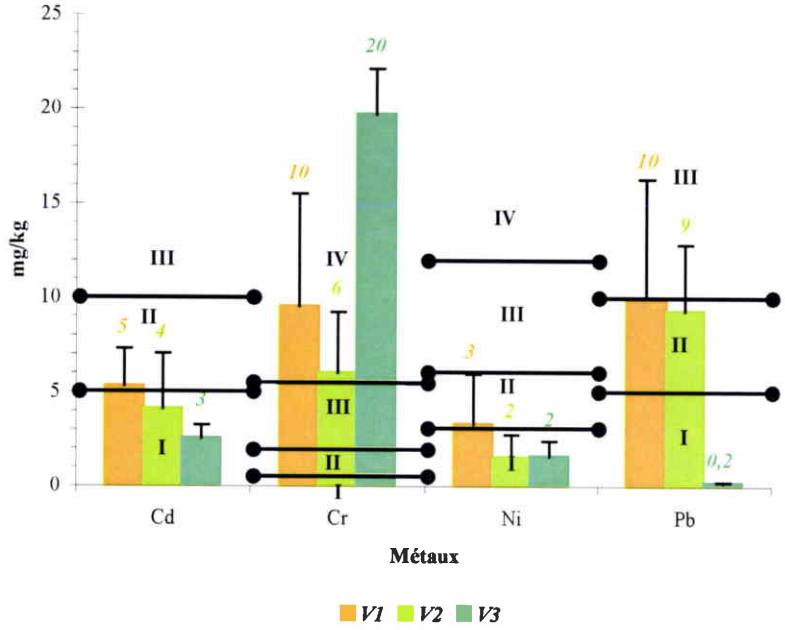


Figure 57 : Concentrations en Cd, Cr, Ni et Pb dans les viscères des escargots prélevés dans le parc de Vaugrenier

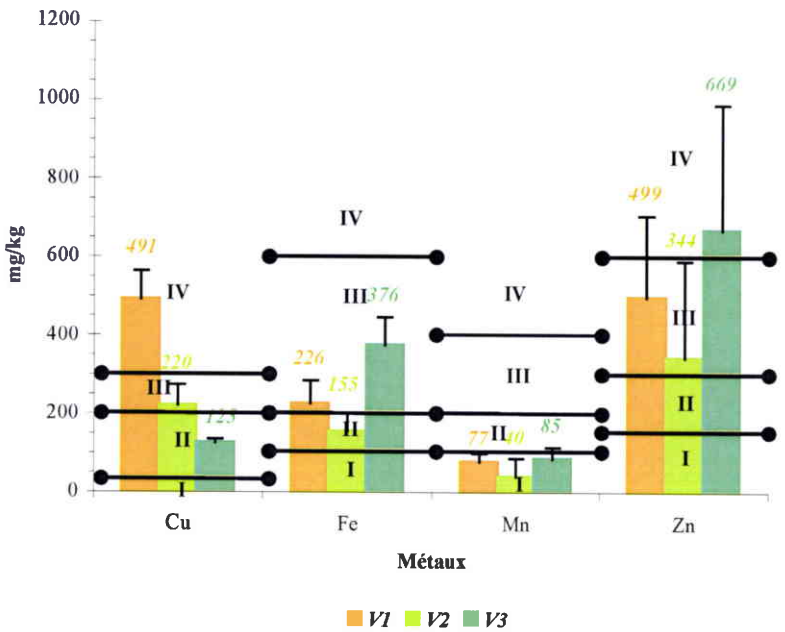


Figure 58 : Concentrations en Cu, Fe, Mn et Zn dans les viscères des escargots prélevés dans le parc de Vaugrenier

La situation de *Pomatias elegans* (V_3) s'inverse par contre vis-à-vis de la bioaccumulation de trois métaux pour lesquels l'espèce présente la concentration moyenne, dans la masse viscérale, la plus élevée. Ceci est très significatif pour le chrome (les trois espèces relevant cependant de la classe IV), le fer (2 espèces étant en classe III : *Pomatias elegans* (V_3) et *Oxychilus draparnaudi* (V_1) et la 3ème, *Eobania vermiculata* (V_2) relève de la classe II), le zinc avec *Pomatias elegans* (V_3) en classe IV, *Oxychilus draparnaudi* (V_1) et *Eobania vermiculata* (V_2) en classe III.

En ce qui concerne le cadmium et le nickel, *Oxychilus draparnaudi* (V_1) relève de la classe II, les deux autres espèces relèvent de la classe I.

Pour le manganèse, il n'y a pas de différence dans le diagnostic de classe à partir des trois espèces qui relèvent toutes de la classe I.

Le calcul de l'indice de contamination polymétallique (ICPM - tableau 28a) montre un niveau global de bioaccumulation plus élevé chez l'espèce carnivore *Oxychilus draparnaudi* (ICPM = 21). Les ICPM des deux autres espèces sont de même niveau (ICPM = 17) mais avec un comportement très différent vis-à-vis du plomb, très peu bioaccumulé, et du cuivre moins accumulé par *Pomatias elegans* (V_3) alors que le fer et le zinc le sont plus. Le biotope de *Pomatias elegans*, en zone humifère, est de fait très différent de celui d'*Eobania vermiculata*.

Tableau 28a : Récapitulatif des classes pour les différents métaux des espèces étudiées (Parc de Vaugrenier).

	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn	ICPM
V1	II	IV	IV	III	I	II	II	III	21
V2	I	IV	III	II	I	I	II	III	17
V3	I	IV	II	III	I	I	I	IV	17

Cette étude permet de souligner la diversité des niveaux de bioaccumulation des métaux entre des espèces de biologie différente.

La même espèce, *Eobania vermiculata*, récoltée sur l'aire de repos de la Manon (lot A_1) et dans le parc de Vaugrenier (lot V_2) montre un profil de contamination polymétallique différent dans les deux sites avec des ICPM très proches (ICPM A_1 = 18 et ICPM V_2 = 17) (tableau 28b).

Tableau 28b : Profil de contamination polymétallique de *Eobania vermiculata* en fonction de leur lieu de récolte.

	Cd	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn	ICPM
A1	II	IV	IV	III	I	I	I	II	18
V2	I	IV	III	II	I	I	II	III	17

Les deux études réalisées sous climat méditerranéen montrent la possibilité d'utiliser d'autres espèces que *Helix aspersa aspersa* pour un diagnostic de niveau de contamination polymétallique. La diversité des espèces permettrait une approche de l'impact de facteurs pouvant expliquer les différences inter-spécifiques (régime alimentaire, contact avec l'humus, rythme d'activité lors de l'estivation.

III.2. Biosurveillance en environnement d'ancienne exploitation minière. Mine de cuivre de Léouvé

III.2.1. La mine de Léouvé

Afin de comprendre les sources multiples de contamination du site industriel, il est utile de fournir les éléments essentiels de la géologie, les technologies mises en œuvre et la composition minéralogique du gisement métallifère exploité.

❖ Cadre géologique

La mine de Léouvé fait partie des anciennes mines de cuivre du Dôme de Barrot qui culmine à 2136 mètres. Ce site se situe au nord-ouest des Alpes Maritimes. Il s'agit d'un bombement à grand rayon de courbure généré par une remonté du soubassement hercynien qui s'est effectué par contrecoup du soulèvement de la chaîne de l'Argentera-Mercantour. Sur ce site les séries permiennes sont particulièrement bien développées (pélites rouges permiennes). Vinchon (1984) définit trois formations de bas en haut de l'échelle stratigraphique :

- formation du Cians (450 à 800 m d'épaisseur).
- formation de la Roudoule (50 m d'épaisseur).
- formation de Léouvé (150 m d'épaisseur).

On observe dans les formations permiennes du Barrot, une évolution depuis un régime alternativement éolien et lacustre peu profond (formation du Cians) vers un système fluviatile (formation de Léouvé). La formation de la Roudoule marque une étape intermédiaire entre ces deux systèmes.

A la périphérie du massif permien, le Trias débute par un ensemble détritique discordant gréso-conglomératique de couleur blanchâtre qui apparaît dans le paysage sous forme de falaise de 15 à 35 m de puissance. Le contact entre le Trias et le Permien est souligné par une décoloration verdâtre du mur permien.

Selon Mari (1992), de nombreux indices métallifères (essentiellement cuprifères) sont connus au sein de la série permo-triasique. En fonction de leur position stratigraphique, ils ont été répartis en quatre groupes :

1. Minéralisations filoniennes sécantes de la formation du Cians ;
2. Minéralisations stratiformes liées au niveau à débris végétaux ;
3. Minéralisations stratiformes au contact du Trias sur le Permien ;
4. Minéralisations uranifères associées aux termes gréso-conglomératiques du Trias détritique.

Dans le cas du Gîte de Léouvé, il s'agit d'une minéralisation stratiforme au contact du Trias sur le Permien. Seules ces formes de minéralisations ont présenté, dans le passé, un intérêt économique.

Selon Mari (1992), la minéralisation cuprifère imprègne à divers niveau les conglomérats, grès blancs et pélites du Trias basal qui couronnent le Permien rouge. La minéralisation présente 75 cm de puissance en moyenne avec des teneurs en cuivre variant de 1 à 5%.

❖ Historique de l'exploitation (figure 59)

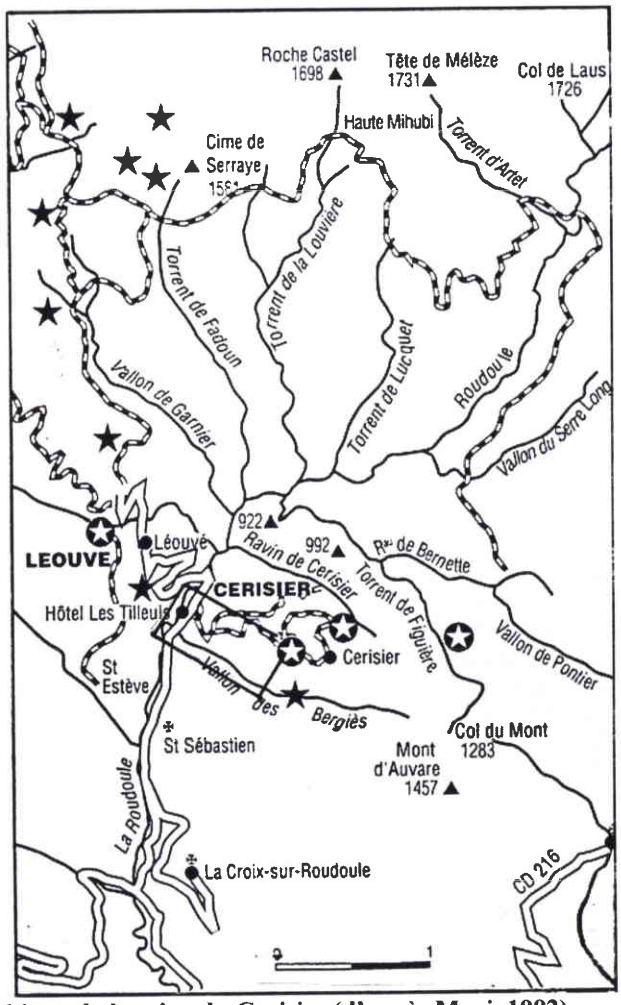


Figure 59 : Situation géographique de la mine du Cerisier (d'après Mari, 1992)

La concession de la mine de Léouvé s'étend sur une superficie de 335 hectares et se situe sur la commune de La Croix. Elle fut accordée à Jean Franzi le 20 Janvier 1875. Entre 1875 et 1878, 530 tonnes de minerai sont extraites de la mine et sont enrichies à 25 % de cuivre à la laverie du Cerisier. En 1878, la concession passe sous le contrôle de la Société Anonyme des Mines du Var et se développe principalement sur le site du Cerisier. En 1882, plusieurs concessions sont réunies et reprises par la Société Française des Mines de Cuivre. La fonderie est située à Léouvé et est commune au Gîte du Cerisier. L'exploitation cesse en 1886 faute de rentabilité.

A partir de 1952, le BRGM et le CEA commencèrent à rechercher des indices d'uranium (uraninite : UO_2). Des galeries furent alors dégagées et réouvertes à Léouvé ainsi qu'au Cerisier mais les recherches furent abandonnées en 1963 du fait de la non rentabilité économique des réserves.

Les minéraux susceptibles d'être échantillonnés en place et sur les haldes sont essentiellement malachite et azurite sous leur aspect habituel d'enduits, croûtes et imprégnations. D'autres minéraux comme la bornite, la chalcocite, la digénite et la chalcopyrite en imprégnations dans les grès sont également visibles à l'œil nu. Au microscope, on peut distinguer cuivre natif, ténorite, cuivre gris et pyrite.

A Léouvé, 1000 mètres de galeries furent exploités contre 8000 mètres au Cerisier. Les ruines de la fonderie qui recevait les minerais extraits des Gîtes de Léouvé et du Cerisier (le coke, provenait de Nice) sont encore visibles à l'entrée de Léouvé sur le versant gauche de la Roudoule, avec de nombreuses scories noires et vitreuses de Litharge de cuivre (planche III_2, figure 3). On peut également observer la cheminée, en cours de consolidation, qui se dresse à l'est de la route (planche III_2, figure 1) ainsi que les galeries de mine dont beaucoup sont inaccessibles. Un musée de la mine a été réalisé à Léouvé.

❖ Le Gîte métallifère du Cerisier ; composition du minerai

La concession est crée en 1860 sur 260 ha et est accordée à la Société des Mines du Var à partir de 1878 puis à la Société Française des Mines de Cuivre. La puissance de la couche métallifère varie de 0,70 m à 1,50 m. Le nombre de mineurs sur cette exploitation fut supérieur à celui du Gîte de Léouvé (70 personnes). Les haldes, encore visibles en bordure de la piste qui mène au Cerisier, proviennent des galeries Cowling (815 m) et Léonie (950 m). En bordure du ravin de Bergiès s'ouvrent les galeries Maurice et Anonyme (300 m) (figure 60). Au total 5000 m de galeries furent percées laissant à leur proximité d'importantes haldes.

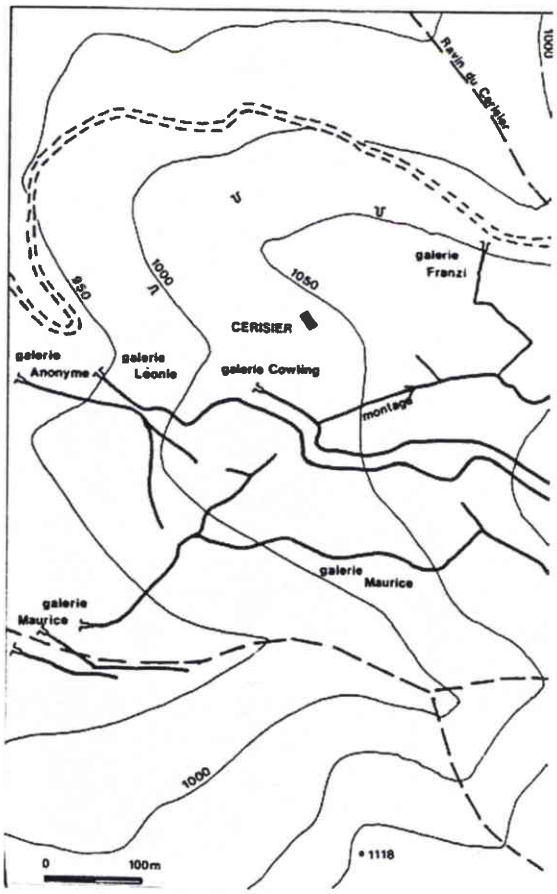


Figure 60 : Plan des travaux miniers sur le site du Cerisier (d'après Mari, 1992)

Le minerai cuprifère est essentiellement de la chalcocite et de la bornite. Ce minerai est concentré dans une couche schistogréseuse de couleur grise à verdâtre située au contact du Permien-Trias.

La richesse du minerai atteignait en moyenne 3.5 à 4% en cuivre et 2kg d'argent par tonne de cuivre. La production totale s'éleva à 100 000 tonnes de tout-venant qui donnèrent de l'ordre de 2 500 tonnes de cuivre métal.

L'accumulation en couche, de plusieurs milliers de tonnes de cuivre métal, soumise à l'action des eaux pendant des millions d'années, fut le siège de remobilisations intenses. Ceci explique l'abondance des croûtes et imprégnations d'azurite et de malachite (planche III_2, figures 2 et 4).

Cette association minérale comporte également de la sidérite, de l'hématite et du quartz.

Selon Mari (1992), un échantillon moyen à la sortie de la mine contenait : Cu (4-5%), Fe (4-6%), Ag (0,01%), Si (68-75%), Al (13-18%), Ca, Mg, Ba (2-3%), K, Na (2-3%), Eau (1%).

Le minerai était trié à la main sur le carreau de la mine (opération de scheidage). Une laverie, avec criblage, alimentée en eau par une dérivation de la Roudoule, permit un certain enrichissement en cuivre (10%) mais les pertes en métal étaient considérables et l'eau nécessaire aux ateliers faisait défaut une partie de l'année. C'est pourquoi, un atelier de préparation mécanique fut exploité sur la rive gauche de la Roudoule afin de transformer le minerai brut en minerai marchand. Le mécanisme comprenait des broyeurs qui étaient actionnées par la force motrice de deux roues hydrauliques à augets de 5 m de diamètre, actionnées par les eaux provenant de la Roudoule. Ce procédé permit d'obtenir un enrichissement du minerai de 20 à 33% en cuivre mais entraîna des pertes de l'ordre de 50% du métal contenu qui se déverse directement dans la Roudoule par l'intermédiaire de matières boueuses issues du lavage du minerai (15 m^3 par jour) et ceci malgré la construction de 8 petits bassins d'épuration (500 m^2 au total).

Le haut fourneau de fusion est construit au Cerisier en 1879. Le lit de fusion est constitué par 80 kg de coke, 200 kg de minerai enrichi et 190 kg de castine (tuf calcaire). Le fer et la matte sont séparés dans des lingotières. Les scories, moulées dans des pots coniques, sont déversées près de la Roudoule. La matte contient un maximum de 50 % de cuivre. Le culot de fer contient des traces de nickel et de cobalt. Parfois, on obtient du cuivre rouge (86 à 88% de cuivre), raffiné par un traitement spécifique donnant : Cu : 96,5% ; Fe : 2,6% ; S : 0,4% ; Ag : 0,3% ; Pb : 0,1% avec, en plus, des métaux traces : Ni, Co, Zn, As et Sb.

De 1882 à 1884 le traitement électrolytique est testé parallèlement à la poursuite du traitement par fusion. En 1886, la mine cesse son activité du fait de sa non rentabilité. La société italienne Ligure Ramifera, dont le siège social est à Gênes, reprend l'ensemble des concessions en 1908 mais suite au décès de son représentant local, Alfonso Lotti, les travaux envisagés ne furent pas entrepris et la société fut mise en liquidation en 1916. En 1930 toutes les concessions revinrent à l'Etat et furent placées dans la situation de gisements ouverts aux recherches.

Quelques milliers de tonnes de cuivre métal demeurent dans l'ancien Gîte du Cerisier et les mesures que nous avons effectuées ont eu pour objectif d'évaluer la biodisponibilité du cuivre et des métaux associés dans cet environnement minier.

❖ Index minéralogique

Minéraux principaux cités des gîtes métallifères de Léouvé et du Cerisier : argent natif (Ag), azurite ($Cu_3(CO_3)_2(OH)_2$), bornite (Cu_5FeS_4), chalcocite (Cu_2S), chalcopyrite ($CuFeS_2$), cuivre natif (Cu), cuivre rouge (Cu_2O), cuivre gris ($(Cu,Fe)_{12}As_4S_{13}$), hématite (Fe_2O_3), malachite ($Cu_2CO_3(OH)_2$), pyrite (FeS_2), sidérite ($FeCO_3$) et ténorite (CuO).

Planche III_2 : Site de Léouvé

1 **Cheminée du haut-fourneau de fusion du minerai de cuivre de la mine du Cerisier.**
Construction : 1879. Notez la couleur (rouge brique du permien).

2 **Sol du fond d'un bassin avec imprégnation de malachite.**
Lieu de récolte de l'individu L_2 d'*Helix pomatia.*

3 **Scories noires et vitreuses, moulées dans un pot conique et déposées au confluent de la Roudoule et du Vallon des Bergiès.**

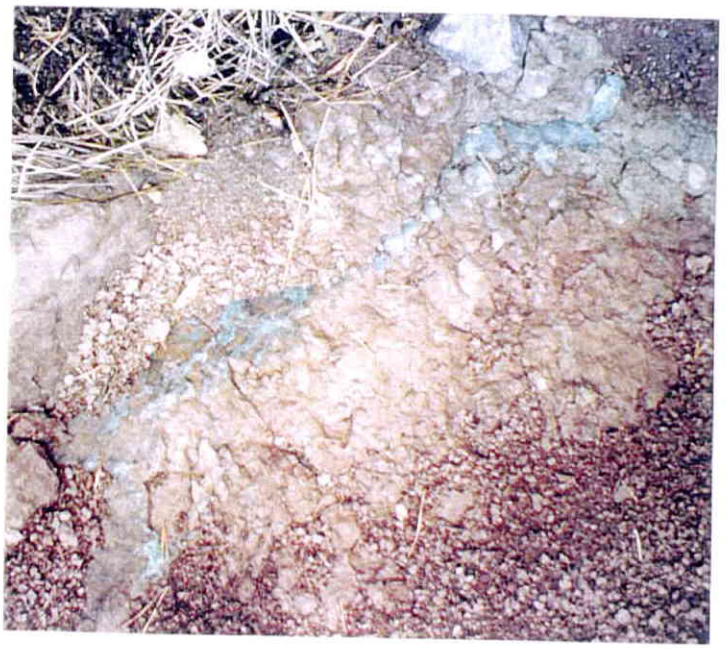
4 **Encroûtement de malachite sur réfractaire.**

Planche III_2

1



2



3



4



III.2.2. Bioaccumulation de métaux par les escargots autochtones

Dans le cadre de cette étude deux campagnes de récoltes ont été effectuées (été 1997 et été 1998). Les escargots prélevés sur le site du Cerisier appartiennent à deux espèces : *Helix pomatia* (en 1997, L_1 : 5 escargots, L_2 : 1 escargot, L_3 : 2 escargots ; en 1998, L_4: 5 escargots ; L_5 : 5 escargots) et *Cepaea nemoralis* (L_6 : 5 escargots en été 1998).

L'analyse est réalisée sur les viscères et les animaux sont regroupés en fonction du site de récolte afin de tenir compte de l'hétérogénéité entre les différents sites (figure 61).

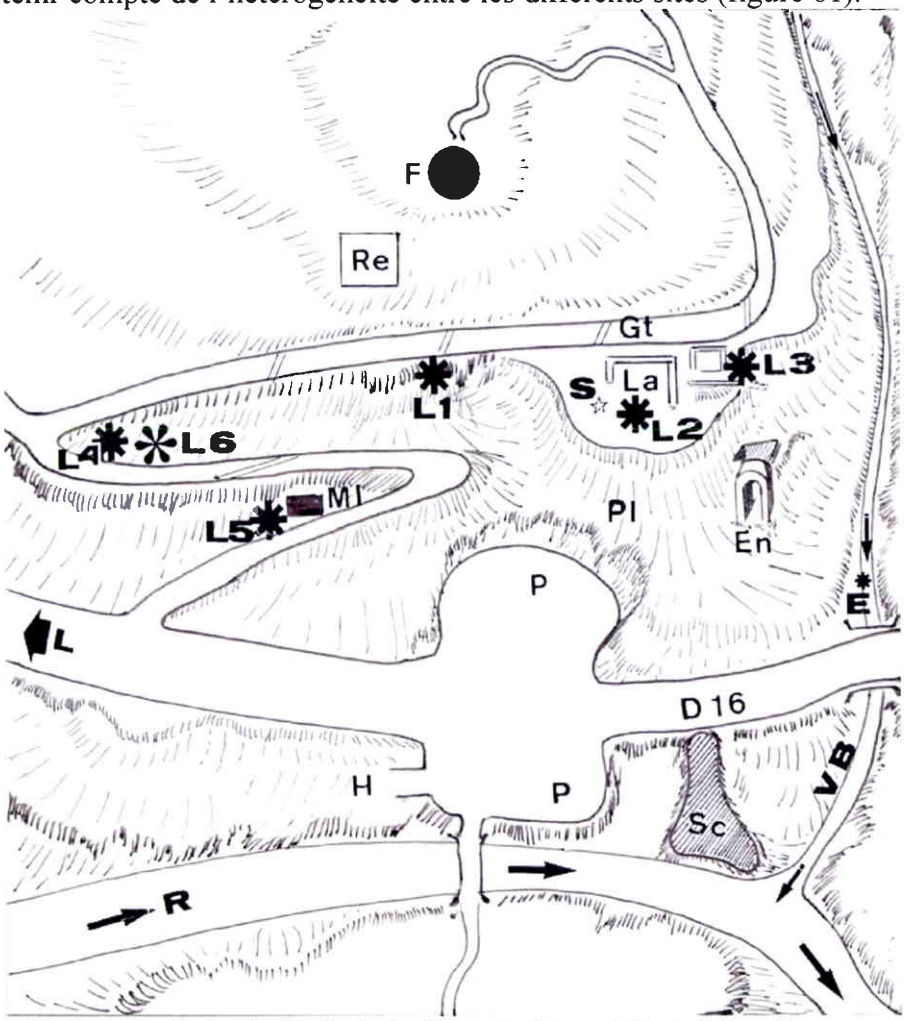


Figure 61 : Reconstitution du site de récolte des individus autochtones (site de Léouvé).
L_1 à L_5 : *Helix pomatia*
L_6 : *Cepaea nemoralis*
Légendes : E : Lieu de prélèvement des échantillons d'eau ; En : Entrée de la mine ; F : Haut fourneau du Cerisier ; Gt : Gouttière en acier de collecte des eaux de ruissellement ; H : Hôtel ; L : Léouvé ; La : Ancien bassin de lavage ; Mi : Maison des ingénieurs de la mine ; P : Parking ; Pi : Pinède ; R : Roudoule ; Re : réserve d'eau ; S : Prélèvement du sol de fond de bassin (planche III_2, figure 2) ; Sc : Dépôt de scories ; VB : Vallon de Bergiès

III.2.2.1. Prélèvements de l'année 1997. Etude des lots L_1, L_2 et L_3

Lors des prélèvements de 1997, les cinq *Helix pomatia* adultes du lot L_1 ont été récoltés en période de pluies orageuses, en activité, en bordure du chemin permettant l'accès à la fonderie et situé au-dessus de la laverie. L'individu adulte du lot L_2 a été récolté sur le remblais de fond d'un ancien bassin de lavage (planche III_2, figure 2). Les deux animaux jeunes constituants le lot L_3 ont été récoltés à proximité du bassin de lavage, mais dans un site plus pierreux et de pente abrupte. Des coquilles vides de *Cepaea nemoralis* ont été observées, mais aucun individu vivant n'a pu être récolté.

On note, pour le cuivre, que les escargots prélevés sur le site se trouvent en classe III pour les lots L_1 et L_2 et en classe IV pour le lot L_3 avec un intervalle allant de 239 à 403 mg/kg selon la grille établie par Pihan *et al.* (1995) Par rapport à la grille de contamination de Berger et Dallinger (1991) qui établissent une classe 3 pour des escargots trouvés sur des sites de mines et de fonderies, les concentrations trouvées dans les viscères des escargots de Léouvé sont largement supérieures. En effet, les concentrations de cette classe 3 sont, en moyenne, de 84 mg/kg avec un intervalle de 45 à 228 mg/kg.

Par rapport à la concentration moyenne de la classe de référence (classe 1 : 84 mg/kg) de Berger et Dallinger (1991), on peut établir un facteur de pollution ou de contamination pour les différents lots : L_1 : 279/84 = 3,32 ; L_2 : 239/84 = 2,85 ; L_3 : 403/84 = 4.8.

Pour le zinc, la grille de Pihan *et al.* (1995) place les escargots du site de Léouvé en classe IV pour les lots L_2 et L_3 et en classe I pour le lot L_1 avec un intervalle des moyennes allant de 105 à 982 mg/kg. Dans ce cas précis une grande hétérogénéité des lots peut être observée.

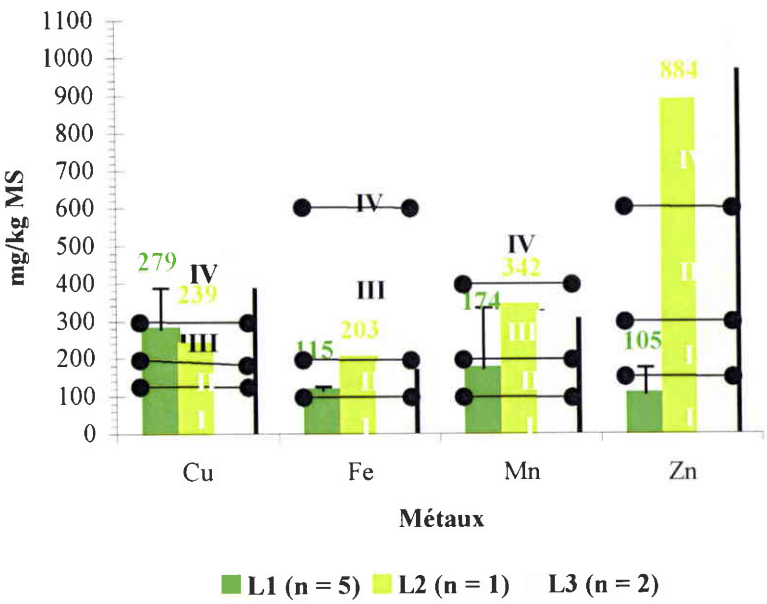


Figure 62 : Concentrations métalliques en mg/kg de MS (Cu, Fe, Mn et Zn) dans les viscères des escargots des Lots L_1, L_2 et L_3 (*Helix pomatia*) – Site de Léouvé.

Les concentrations en zinc trouvées dans les viscères des escargots du site de Léouvé sont inférieures à celles que l'on trouve dans la classe 3 (mines et fonderies) de la grille de Berger et Dallinger (1991) avec une moyenne de 873 mg/kg et un intervalle de 400 à 1868 mg/kg.

Par rapport à la concentration moyenne de la classe de référence (classe 1 : 136 mg/kg) de ces auteurs, on peut établir un facteur de contamination pour les différents lots : L_1 : 105/136 = 0,77 ; L_2 : 884/136 = 6,5 ; L_3 : 982/136 = 7,22.

En ce qui concerne le manganèse, les escargots des lots L_2 et L_3 sont en classe III selon la grille de Pihan *et al.* (1995) et en classe II pour le lot L_1 avec un intervalle des moyennes allant de 174 à 342 mg/kg. Il n'y a pas de comparaison possible avec la grille de contamination de Berger et Dallinger (1991) puisque ces auteurs n'ont pas traité de ce métal.

Pour le chrome, les escargots des lots L_1 et L_3 du site de Léouvé se trouvent en classe III d'après la grille de Pihan *et al.* (1995) et en classe IV pour le lot L_2 avec un intervalle des moyennes allant de 2,5 à 6,2 mg/kg. Pour ce métal, il n'y a pas de comparaison possible avec la grille de Berger et Dallinger (1991) car ils n'ont pas traité le chrome.

En ce qui concerne le fer, l'escargot du lot L_2 se trouve en classe III et ceux des lots L_1 et L_3 en classe II (Pihan *et al.*, 1995), avec un intervalle des moyennes allant de 115 à 203 mg/kg. Il n'y pas non plus de comparaison possible avec la grille de Berger et Dallinger (1991) qui ne traitent pas de ce métal.

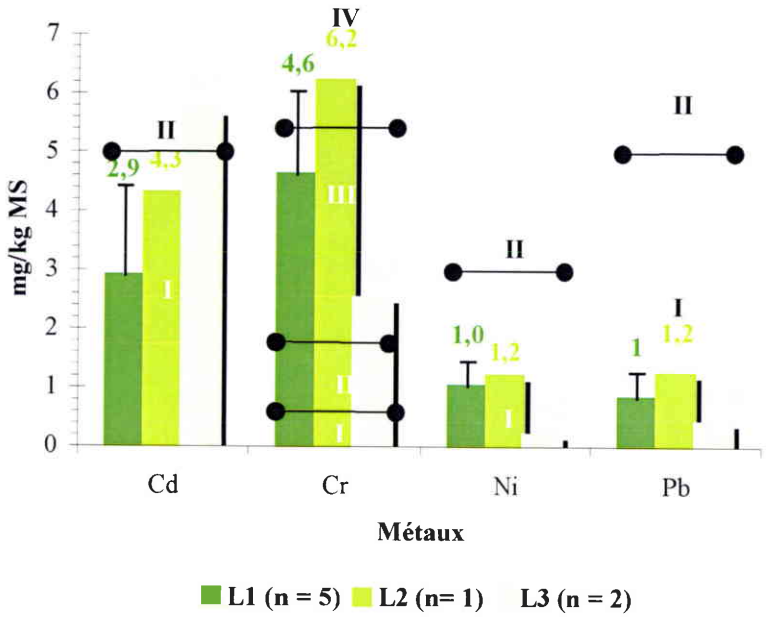


Figure 63 : Concentrations métalliques en mg/kg de MS (Cd, Cr, Ni et Pb) dans les viscères des escargots des Lots L_1, L_2 et L_3 (*Helix pomatia*) – Site de Léouvé

Pour le cadmium, les données minéralogiques ne signalent pas la présence notable de cadmium sur le site de Léouvé. Ceci est corroboré par le fait que les lots L_1 et L_2 se trouvent en classe I et les escargots du lot L_3 se trouvent en classe II avec un intervalle des moyennes allant de 2,9 à 5,7 mg/kg.

Pour le plomb, selon la grille établie par Pihan *et al.* (1995), les escargots des trois lots se trouvent en classe I avec un intervalle des moyennes allant de 0,4 à 1,2.

En comparaison avec la grille de Berger et Dallinger (1993), ces résultats sont inférieurs à ceux du lot de référence dont la moyenne est de 9 mg/kg avec un intervalle des moyennes allant de 4 à 19 mg/kg. Le facteur de contamination est donc inférieur à 1.

Pour le nickel, les escargots se trouvent, pour l'ensemble des trois lots, en classe I avec un intervalle des moyennes allant de 0,2 à 1,2 mg/kg. Aucune comparaison avec la grille de Berger et Dallinger (1993) n'est possible puisque ces derniers ne traitent pas du nickel.

Parallèlement à l'étude des escargots, des dosages ont été effectués sur les eaux du vallon des Bergiès et sur les remblais du fond du bassin de lavage. Ces dosages ont montré que les eaux du vallon des Bergiès étaient contaminées par le cuivre et que les sols présentaient un encroûtement de sels de cuivre. Il y a également, dans l'eau, présence de plomb et des traces de chrome et de cadmium. Dans le sol étudié, il y a présence de fer, de manganèse, de zinc, de plomb, de nickel, de chrome et des traces de cadmium.

Le tableau suivant rassemble les données principales comparatives :

Tableau 29 : Résumé des données de concentrations en métaux obtenues pour le minerai, les haldes, l'eau et les lots L_1, L_2 et L_3
+++ : très abondant ; ++ : abondant ; + : présent ; -: traces ; 0 : non signalé

	Cu	Pb	Fe	Zn	Ni	Mn	Cr	Cd
Minerai	+++	++	+++	++	++	++	0	0
Haldes (1998) Fond de bassin	54,6-251,8 g/kg	11-2 mg/kg	9,2-11,2 g/kg	0,15-0,36 g/kg	15-30 mg/kg	0,41-0,73 g/kg	8-11 mg/kg	0,6-1,3 mg/kg
Eau (µg/l) 1998 Vallon des Bergiès	90	2,7	<50	<50	<1	<20	0,2	0,1
Escargots L_1 à L_3 (mg/kg)	239/403	0,4/1,2	115/203	105/982	0,2/1,2	174/342	2,5/6,2	2,9/5,7
Classe	IV à III	I	III à II	IV à I	I	III à II	IV à III	II à I

D'après les données des escargots prélevés durant l'été 1997, plusieurs observations peuvent être faites. Par rapport au minerai et aux haldes, le cuivre, le zinc, le manganèse, le fer ainsi que le chrome sont biodisponibles et bioaccumulés. Le plomb, le nickel et le cadmium (sauf, en ce qui concerne le cadmium, pour le lot L_3) ne sont pas présents à des teneurs suffisamment importantes pour modifier l'appartenance des escargots à la classe I de Pihan *et al.* (1995) Le chrome, non signalé dans le minerai, est présent dans les haldes, sans doute du fait de la dégradation des parties métalliques de l'exploitation, et d'autres sources anthropiques peuvent exister telles que, récemment, les collecteurs de pluies en acier qui traversent la chaussée.

Tableau 30 : Classes d'appartenance des lots L_1, L_2 et L_3 selon les grilles de Pihan *et al.* (1995) (chiffres romains) et de Berger et Dallinger (1993) (chiffres arabes)

1997	Cu	Zn	Mn	Cr	Fe	Pb	Ni	Cd	ICPM
L1 (n = 5)	III^3	I^1	II^2	III^3	II^2	I^1	I^1	I^1	14
L2 (n = 1)	III^4	IV^4	III^3	IV^3	III/II^2	I^1	I^1	I^2	20/19
L3 (n = 2)	IV^3	IV^4	III^3	III^4	II^2	I^1	I^1	II^1	20

Si l'on considère l'indice de contamination polymétallique (ICPM) obtenu par sommation des classes, l'individu adulte récolté sur le fond du bassin (L_2) présente l'ICPM le plus élevé, avec la présence d'une contamination importante pour le zinc et le chrome, moyenne pour le manganèse, le cuivre et le fer. Le lot L_3 donne sensiblement les mêmes informations avec plus de cuivre et de cadmium ainsi que moins de chrome et de fer. Les individus du lot L_1 présentent l'indice polymétallique le plus faible tout en signalant la présence d'une contamination en cuivre, chrome, manganèse et fer. Le zinc n'étant pas présent à un niveau supérieur à la référence (classe 1). Le diagnostic pour le plomb, le nickel et le cadmium est concordant pour tous les lots, avec une absence de contamination.

Il y a une grande hétérogénéité du site avec corrélativement une variabilité dans la réponse des escargots.

III.2.2.2. Prélèvements de l'année 1998. Etude des lots L_4, L_5 et L_6

Les prélèvements de 1998, par temps sec, n'ont pas permis de récolter des individus exactement sur les mêmes localisations qu'en 1997. Deux espèces sont concernées, *Helix pomatia* (lots L_4 et L_5 ; n = 5) et *Cepaea nemoralis* (lot L_6 ; n = 5)) avec, pour les lots L_4 et L_6, une situation plus éloignée de l'ensemble des bassins de lavage et pour le lot L_5, une situation de bas de pente, à proximité des activités, dites de laboratoire, des ingénieurs de la mine.

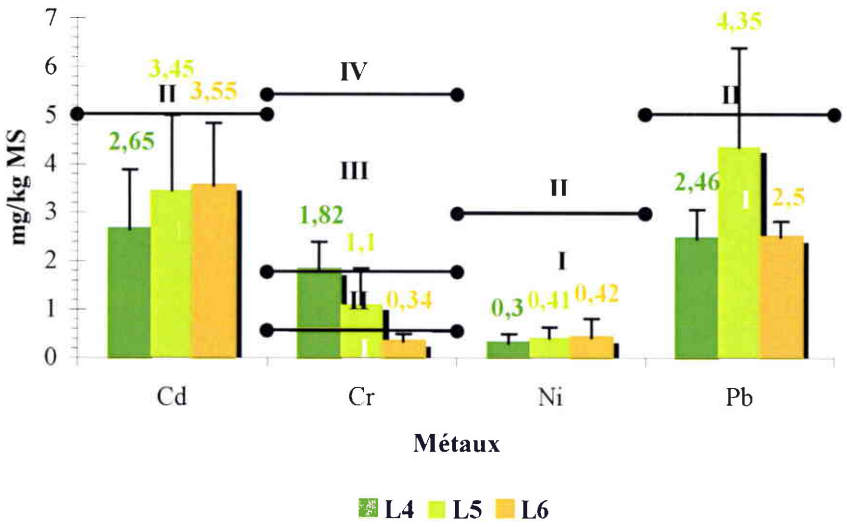


Figure 64 : Concentrations métalliques en mg/kg de MS (Cd, Cr, Ni et Pb) dans les viscères des escargots des Lots L_4, L_5 (*Helix pomatia* ; n = 5) et L_6 (*Cepaea nemoralis* ; n = 5)

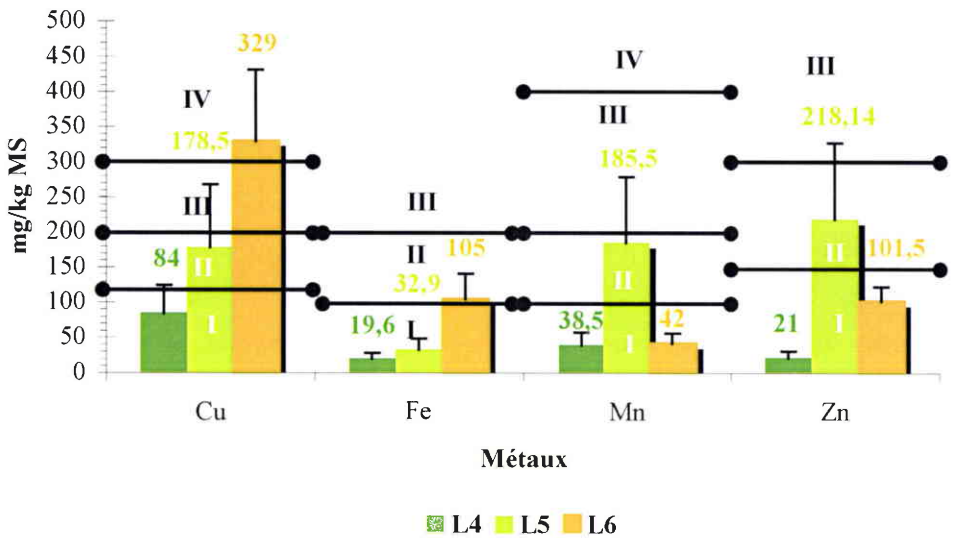


Figure 65 : Concentrations métalliques en mg/kg de MS (Cu, Fe, Mn et Zn) dans les viscères des escargots des Lots L_4, L_5 (*Helix pomatia* ; n = 5) et L_6 (*Cepaea nemoralis* ; n = 5)

Les résultats analytiques de 1998 permettent, d'une part, de comparer, pour *Helix pomatia*, les lots L_4 et L_5 entre eux et avec les lots L_1, L_2 et L_3 de l'année 1997 en les regroupant, et de comparer, d'autre part, pour une même localisation, les capacités bioaccumulatrices des deux espèces *Helix pomatia* et *Cepaea nemoralis* (respectivement lots L_4 et L_6), par référence à la grille établie pour *Helix aspersa aspersa* (Pihan *et al.* 1995).

❖ Comparaison, chez *Helix* pomatia, entre les lots L_4 et L_5 récoltés en estivation

Tableau 31 : Diagnostic des appartenances des lots Léouvé L_1, L_2, L_3, L_4, L_5 (*Helix* pomatia) et L_6 (*Cepaea* nemoralis) à la grille de contamination établie par Pihan *et al.* (1995)

	Cu	Zn	Mn	Cr	Fe	Pb	Ni	Cd	
	8	4	7	6	1	5	3	2	*ICPM*
Helix pomatia (lots L_1, L_2 et L_3, 1997)	IV	IV	III	III	II	I	I	I	*19*
Ecart type	III IV	III IV	II III	III IV	II III	I I	I I	I II	*16/22*
Helix pomatia (L_4, 1998)	I	I	I	III	I	I	I	I	*10*
Ecart type	I II	I I	I I	II III	I I	I I	I I	I I	*9/11*
Helix pomatia (L_5, 1998)	II	II	II	II	I	I	I	I	*12*
Ecart type	I III	I III	I III	I III	I I	I II	I I	I II	*8/18*
Cepaea nemoralis (L_6, 1998)	IV	I	I	I	II	I	I	I	*12*
Ecart type	III IV	I I	I I	I I	I II	I I	I I	I I	*10/12*

Le lot L_5, proche des anciennes activités minières, présente une contamination polymétallique supérieure à celle du lot L_4, plus éloigné de ces activités. Le lot L_5 met en évidence, en référence aux valeurs moyennes, une contamination par le cuivre, le chrome, le manganèse et le zinc avec, en plus, le plomb et le cadmium, si on considère l'écart type. Le lot L_4 met en évidence une contamination par le chrome, si on considère les moyennes avec, en plus, le cuivre, si on considère l'écart type.

❖ Comparaison entre les lots *d'Helix pomatia* L_1 à L_3 récoltés en activité et les lots L_4 et L_5 récoltés en estivation

Si l'on regroupe les données des lots L_1 et L_3 récoltés en activité, leur indice polymétallique est nettement plus élevé (ICPM = 19 avec une variation de 16 à 22) que celui du lot L_5 (ICPM = 12 avec une variation de 8 à 18).

L'information, confirmée pour les deux états différents d'activité, est cependant la même en ce qui concerne un diagnostic de contamination pour le cuivre, le manganèse, le zinc et le chrome, contamination cependant plus importante en période d'activité (lots L_1, L_2 et L_3), par contre, la concentration en fer d'un niveau moyen à notable en période d'activité apparaît revenir au niveau de référence en période d'estivation.

Tableau 32 : Classement des indices de contamination polymétalliques des différents lots par ordre décroissant

ICPM	20/19	20	14	19 (16-22)	12 (8-18)	10 (9-11)
Lots	2 (n=1)	3 (n=2)	1 (n=5)	1, 2 et 3 (n=8)	5 (n = 5)	4 (n = 5)
Localisation	*Bassin de lavage avec incrustation cuprifère*	*Proximité du bassin de lavage*	*Bordure du chemin menant à la laverie*	*Lots récoltés en période d'activité*	*Proximité de la maison des ingénieurs*	*Le plus éloigné des anciennes activités minières*

❖ Comparaison des capacités bioindicatrices des deux espèces *Helix pomatia* (lot L_4) et *Cepaea nemoralis* (lot L_6)

La comparaison des indices de contamination polymétalliques des lots 4 et 6, en période d'estivation, respectivement de 10 et de 12, pour les moyennes, montre une capacité différente des deux espèces dans le niveau de bioaccumulation à partir d'un environnement qui peut-être considéré comme identique. L'espèce *Helix pomatia* présente une capacité bioindicatrice significativement plus élevée pour le chrome, mais significativement moins élevée pour le cuivre et le fer. Les deux espèces donnent la même information en ce qui concerne le zinc, le manganèse, le plomb, le nickel et le cadmium.

III.2.3. Conclusion

Helix pomatia est un bon bioindicateur d'accumulation des métaux. Sur un site minier et en fonction des anciennes activités minières connues il permet un diagnostic assez affiné de la contamination polymétallique de son environnement.

Pour une même localisation, *Cepaea nemoralis* présente des capacités supérieures pour le cuivre et le fer, mais inférieures pour le chrome.

La biosurveillance passive, ayant pour support les espèces autochtones, peut donc être appliquée avec intérêt, tout en tenant compte des multiples facteurs biotiques et abiotiques qui entrent en jeu : choix de l'espèce, état d'activité, régime alimentaire, connaissance des sources de contamination métallique qui sont difficiles à appréhender quand il s'agit d'une activité industrielle arrêtée depuis longtemps.

Chapitre IV : Biosurveillance active. Etude de la contamination polymétallique de lots d'*Helix aspersa aspersa* transférés

IV.1. Biosurveillance en environnement autoroutier (A31). Site de Bouxières-sous-Froidmont

IV.1.1. Le site

Le site choisi se situe sur l'A31 Nancy-Metz à Bouxières-sous-Froidmont dans un secteur en déblai. Le trafic est de 40.000 véhicules/jour.

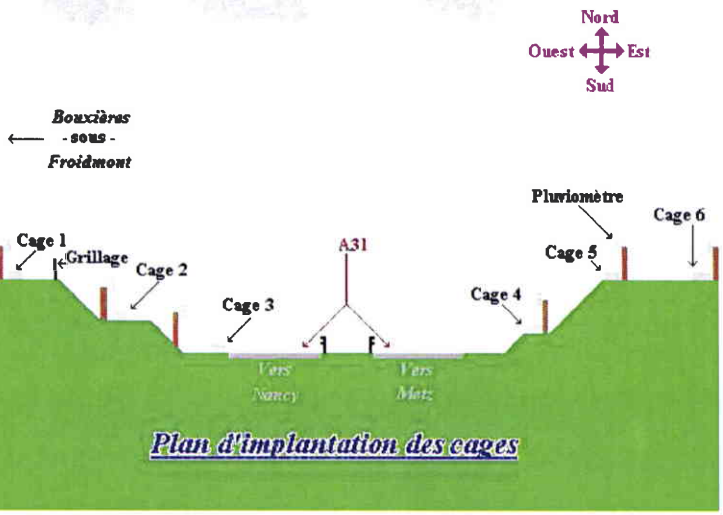


Figure 66 : Schéma représentant le site de Bouxières-sous-Froidmont avec le lieu d'implantation des cages où les *Helix aspersa aspersa* ont été transférés.

IV.1.2. Matériel et méthodes

La méthodologie retenue est celle du monitoring actif.

Un lot d'escargots dont l'origine est connue (élevage) et qui peuvent être considérés comme lot de référence, permettent de montrer la présence ou l'absence de polluants métalliques après transfert durant un temps d'exposition donné sur le site étudié. Une comparaison peut-être également établie avec un lot d'escargots de la nature provenant de la même aire géographique mais sans aucune contamination métallique anthropique, dans le but de prendre en compte le fond pédogéologique régional.

Des lots de dix jeunes escargots, provenant d'un élevage en conditions contrôlées, âgés de deux mois et dont le poids moyen est de 4,6 g (± 0,5) sont transplantés dans des cages implantées à proximité d'une autoroute (A31, près de Pont-à-Mousson, Meurthe-et-Moselle, nord est de la France) source de hauts niveaux de pollution dus à un important trafic (40.000 véhicules/jour).

Trois études ont été mises en œuvre. La première a duré un mois (24/05/96 au 27/06/96) avec l'évaluation de la contamination le long d'un transect de l'autoroute (respectivement à1

Planche III_3 : Implantation de cages selon un transect autoroutier

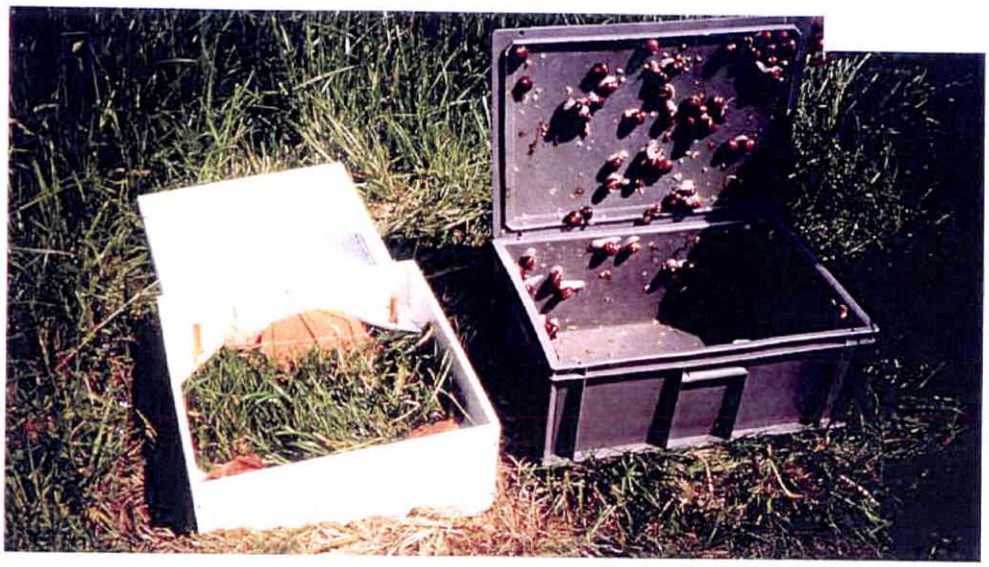
5 Implantation de la cage (blanche) recevant les animaux de un mois transférés.
La végétation naturelle est conservée après enfoncement du cadre de 5 cm.
Dans le casier gris, transport des animaux obtenus en élevage (1 mois) et devant être transférés dans les cages d'un transect.

6 Cage avec son couvercle et informations pour dissuader le vandalisme.

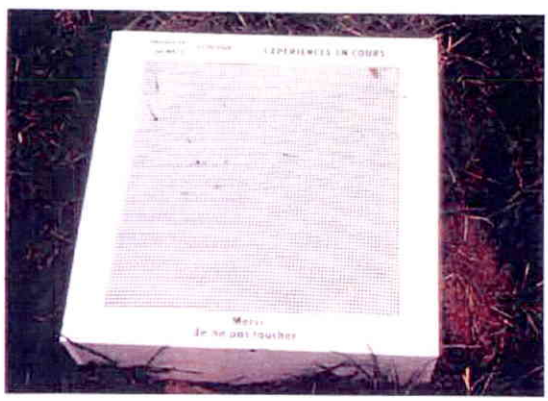
7 Transect de Bouxières-sous-Froidmont.
Autoroute A31 avec en bas, direction de Metz et en haut, direction de Nancy. Flèches : Cages implantées conjointement à des dispositifs de récolte des dépôts atmosphériques.

8 Détail d'une cage (C) repérée par un tuteur avec flamme rouge prévenant le service d'entretien des talus lors de la fauche ; sur le même site, dispositif de récolte des dépôts atmosphériques (D).

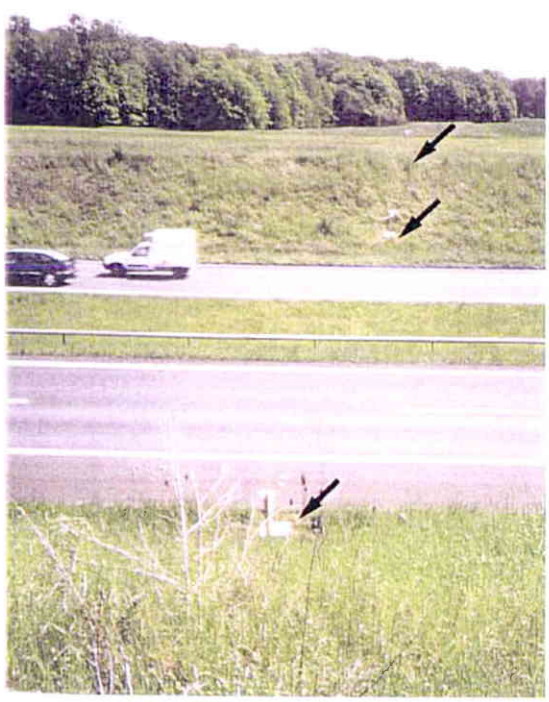
Planche III$_3$



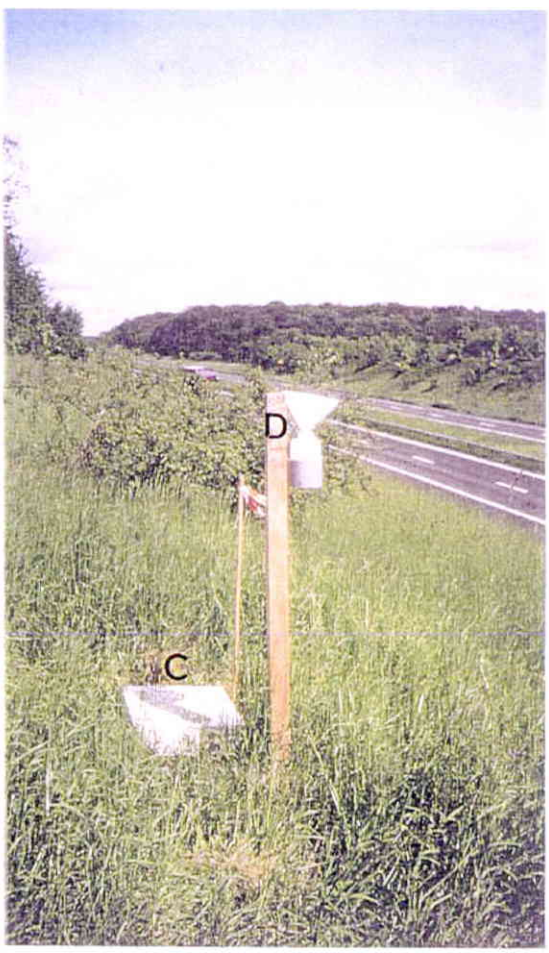
1



2



3



4

ou 5, 20 et 40 mètres) de chaque côté de la limite de la bande d'arrêt d'urgence. Au vu de ces premiers résultats, l'objectif de la seconde étude a été le suivi de la cinétique de contamination sur une période de 1 mois, du 21/09/96 au 22/10/96, afin de fixer la durée optimale d'exposition c'est-à-dire, celle permettant d'obtenir une stabilité du niveau de contamination dans le temps le plus court car de nombreux facteurs peuvent intervenir *in situ* et perturber l'expérience (curiosité des usagers de l'autoroute, stationnement d'urgence sur la partie herbacée (5 premiers mètres ce qui concerne la cage 3 qui a dû être placée à seulement 1 mètre dur bord de la bande d'arrêt d'urgence du fait de la présence d'un fossé de drainage important), entretien de la végétation par fauchage ou intervention de retalutage). La dernière campagne d'expérimentation, avec 5 répétitions (du 4/06/97 au 11/06/97 ; du 13/06/97 au 19/06/97 ; du 04/07/97 au 11/07/97 ; du 24/07/97 au 31/07/97 et du 08/09/97 au 15/09/97), concerne l'étude de la contamination métallique d'escargots implantés à trois distances de part et d'autre de l'autoroute : 5 et 20 mètres puis une autre cage, implantée à 320 mètres, dans le but de discerner les apports propres au bruit de fond pédogéologique associé à des apports éventuels d'origine anthropique autre que l'autoroute. Durant ces différentes études, les escargots se nourrissent de la végétation autochtone et ils sont en contact avec tous les polluants du sol, de la végétation mais aussi de ceux provenant de l'eau météorique et de l'air (aérosols, gaz de combustion).

La référence est constituée par le niveau de contamination d'un lot d'escargots d'élevage au jour de l'implantation sur le site (to).

IV.1.3. Résultats

Dans les conditions définies d'élevage, la nourriture utilisée est un aliment dont la formulation a été établie par Gomot (1994). Cette nourriture, désignée Helixal®, et a été formulée en 1996. Les résultats obtenus (figure 67) montrent que dans les pieds et dans les viscères du lot de référence, il y a une différence importante concernant les teneurs en plomb, avec une accumulation presque exclusive dans les viscères. Les concentrations trouvées dans les viscères placent les escargots en classe I suivant la grille de contamination établie par Pihan et Gomot (2000). Les résultats des analyses de l'aliment montrent que celui-ci contient de faibles quantités de plomb et que les escargots d'élevage sont très faiblement contaminés avec un facteur de bioaccumulation dans les viscères <1.

IV.1.3.1. Analyses des teneurs en plomb dans les pieds et les viscères après une période d'exposition de un mois

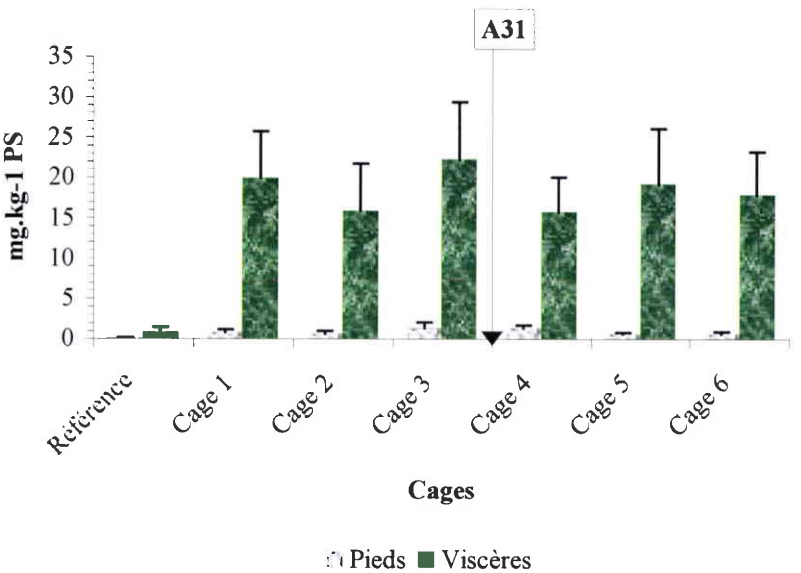


Figure 67 : Valeurs moyennes (n = 9 et écarts types) des concentrations en plomb dans les pieds et les viscères d'H.a.a. un mois après leur transfert en fonction de la distance des cages par rapport à l'autoroute A31 (référence : teneurs en plomb dans les escargots à to ; cages 1 et 6 : 40 mètres ; cages 2 et 5 : 20 mètres ; cage 3 : 1 mètre ; cage 4 : 5 mètres)

Selon la figure 67, plusieurs observations peuvent être faites. D'une part, il y a une différence importante dans les concentrations en plomb entre les pieds et les viscères des escargots. En effet, les concentrations en plomb dans les viscères sont 11 fois supérieures à celles dans les pieds.

D'autre part, la comparaison des concentrations en plomb dans les escargots des cages 1 à 6 avec le lot de référence, montre une différence significative pour les pieds et les viscères (tableaux 32 et 33). Les animaux les plus contaminés sont ceux dont les cages sont les plus proches de l'autoroute : cage 4 pour les pieds et cage 3 pour les viscères.

En ce qui concerne la concentration en plomb dans les viscères des lots 1 à 6, uniquement le lot 3 montre une différence significative avec le lot 4. Ceci s'explique par le fait que la cage 3 est la plus proche du bord de l'autoroute (1 mètre) et est implanté sur une partie horizontale et non en déclivité comme dans le cas de la cage 4. Dans la bande des 40 mètres qui a été étudiée de part et d'autre de l'autoroute, le niveau de contamination détecté par les viscères est sensiblement le même.

Tableau 33a : Résultats du test non-paramétrique de Mann-Whitney concernant la concentration en plomb (mg.kg^{-1}) dans les viscères (s : significatif, P<0,05 ; ns : non-significatif, P>0,05)

	Témoins	Cage 1	Cage 2	Cage 3	Cage 4	Cage 5	Cage 6
Témoins		s	s	s	s	s	s
Cage 1			ns	ns	ns	ns	ns
Cage 2				ns	ns	ns	ns
Cage 3					s	ns	ns
Cage 4						ns	ns
Cage 5							ns
Cage 6							

Tableau 33b : Résultats du test non-paramétrique de Mann-Whitney concernant la concentration en plomb (mg.kg^{-1}) dans les pieds (s : significatif, P<0,05 ; ns : non-significatif, P>0,05)

	Témoins	Cage 1	Cage 2	Cage 3	Cage 4	Cage 5	Cage 6
Témoins		s	s	s	s	s	s
Cage 1			ns	ns	ns	ns	ns
Cage 2				s	ns	ns	ns
Cage 3					ns	s	s
Cage 4						ns	ns
Cage 5							ns
Cage 6							

En ce qui concerne la concentration en plomb dans les pieds, il semble qu'il y ait un gradient décroissant en fonction de l'éloignement de la cage par rapport à la bordure de l'autoroute. Des différences significatives existent entre les cages 2 et 3, les cages 3 et 5 et les cages 3 et 6. Ces différences significatives montrent une relation entre la concentration en plomb dans les pieds et la distance par rapport à l'axe autoroutier, la cage 3 étant la cage la plus proche de cet axe.

IV.1.3.2. Evaluation du contenu en plomb par animal

L'évaluation du contenu en plomb par escargot, c'est-à-dire la quantité de plomb qui est bioaccumulée par animal, montre les différences entre les animaux du lot de référence et les escargots implantés dans les cages situées de part et d'autre de l'autoroute. La contamination n'est pas seulement limitée aux cages 3 et 4 qui sont les plus proches de l'axe autoroutier mais concerne l'ensemble du site étudié dans la bande des 40 mètres. La figure 68 et le tableau 34 montrent clairement une contamination significative par le plomb chez les escargots des cages 1 à 6 en comparaison avec le lot de référence. Les individus des cages 1 à 6 ne sont pas significativement différents les uns par rapport aux autres. Ceci démontre qu'il y a, le long du transect, un impact sensiblement homogène de la contamination en plomb au moins jusqu'à 40 mètres de la bordure de l'autoroute. Le contenu minimum obtenu durant l'expérience est de 0,003 mg/escargot (cage 5) et le contenu maximum est de 0,025 mg/escargot (cage 4). Les animaux de la cage 3 montrent pour six individus sur neuf le maximum obtenu.

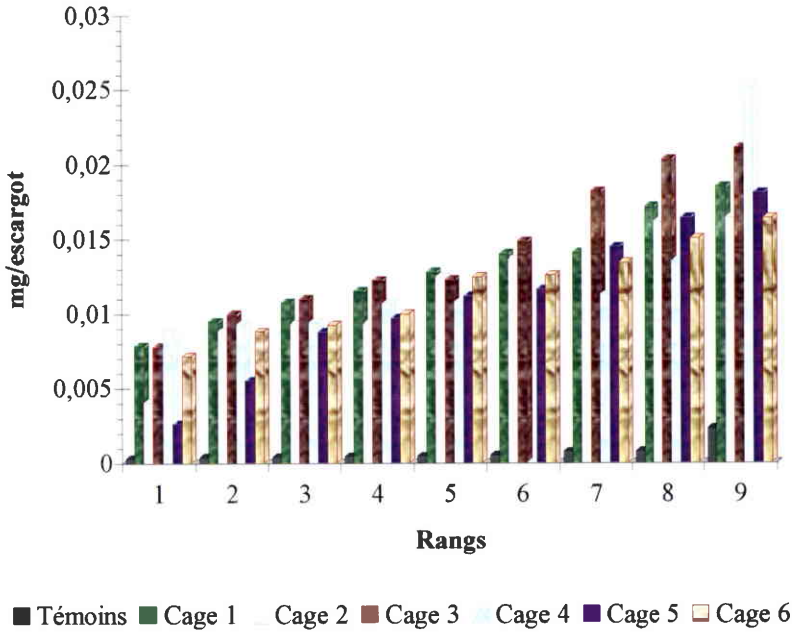


Figure 68 : Contenu en plomb par escargot (mg/escargot ; n = 9) selon un ordre croissant pour l'ensemble des cages et pour le lot témoin (A31)

Tableau 34 : Résultats du test non-paramétrique de Mann-Whitney concernant le contenu en plomb (mg/escargot) (s : significatif, P<0,05 ; ns : non-significatif, P>0,05) – A31

	Témoins	Cage 1	Cage 2	Cage 3	Cage 4	Cage 5	Cage 6
Témoins		s	s	s	s	s	s
Cage 1			ns	ns	ns	ns	ns
Cage 2				ns	ns	ns	ns
Cage 3					ns	ns	ns
Cage 4						ns	ns
Cage 5							ns
Cage 6							

IV.1.3.3. Etude de la cinétique de la contamination par le plomb

Après les premières expériences faites, selon un transect de l'autoroute, avec une exposition durant un mois, une étude de la cinétique de contamination (figure 69), avec une analyse des métaux après 1, 2, 3 et 4 semaines d'exposition, montre qu'un temps d'exposition d'une semaine est suffisant pour atteindre le plateau du niveau de contamination des viscères. Dans le cas des pieds, le maximum est observé après une semaine mais il y a par la suite une décroissance importante. Cette décroissance peut être imputée au fait que dans les pieds, il existe moins de capacité bioaccumulatrice, à long terme, que dans les viscères. L'organotropisme du plomb sera étudié dans le chapitre d'histologie et de microanalyse.

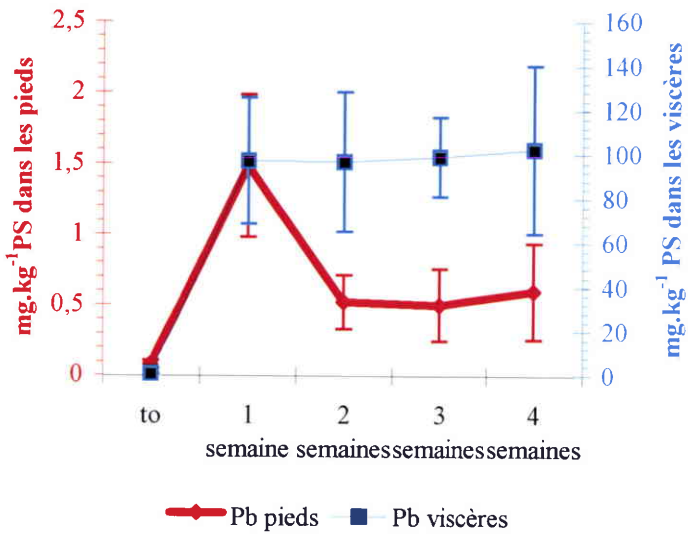


Figure 69 : Evolution des concentrations moyennes en plomb montrant la cinétique de la contamination en plomb dans les pieds et les viscères d'H.a.a. in situ (A31) sur une période de 1 mois (n = 9 ; 05/97)

IV.1.3.4. Analyses des teneurs en plomb dans les viscères après un temps d'exposition d'une semaine

En fonction des résultats de l'étude de la cinétique de la contamination, une autre expérimentation a été faite sur des lots d'escargots implantés pendant 5 périodes différentes d'une semaine, durant la fin du printemps et de l'été 1997 (du 04/06/97 au 15/09/97 ; figure 70).

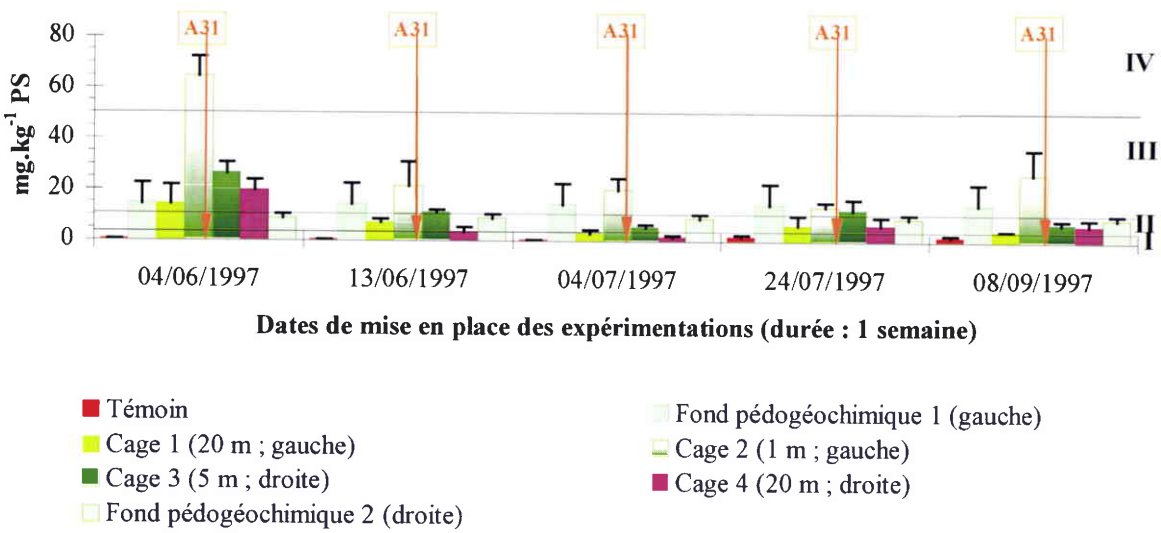


Figure 70 : Concentrations en plomb dans les viscères en fonction de l'éloignement à l'autoroute et après une semaine d'exposition (valeurs moyennes ; n = 5) ; I à IV : classes de contamination selon la grille de contaminations établie (*Cf.* chapitre I.8.1, tableaux 24a et 24b)

Cette étude confirme qu'un temps d'exposition d'une semaine est suffisant pour mettre en évidence une contamination par le plomb en utilisant comme bioindicateur un lot d'escargots élevés en conditions contrôlées. Plus les cages sont proches de l'autoroute, (cage 2 et à un moindre degré cage 3) plus la contamination est importante. Dans tous les cas, la différence est significative par rapport à la référence.

Pour l'expérience du 4 juin, cette différence est plus importante et peut s'expliquer par une activité plus intense des escargots durant cette période ; en effet, au début du mois de juin, le climat est plus approprié au métabolisme des escargots alors en période de reproduction. Les lots des cages 3 et 4 atteignent la classe III et le lot de la cage 2 la classe IV. Durant les autres périodes, alors que la température s'accroît et que l'hygrométrie diminue, l'activité des escargots régresse et le niveau maximum de contamination ne dépasse pas la classe III. Les individus, retirés le 31 juillet, présentent, globalement, une plus importante contamination pour l'ensemble des cages (classes II à III) que ceux des lots du 11 juillet (classes I à III). Ceci s'explique par la date correspondant aux vacances d'été avec un trafic plus intense (jusqu'à 60.000 véhicules par jour).

Par ailleurs, pour chaque transfert, les cages implantées sur le côté gauche de l'autoroute sont toujours plus contaminées que celles implantées sur le côté droit. Ceci est dû aux vents dominants qui vont d'est en ouest dans ce secteur influencé par un relief de côte calcaire. Il y a une exception pour la première implantation (cages 3 et 4) car à cette période les vents soufflaient d'ouest en est (période de pluies). Ces résultats soulignent l'importance du choix du lieu d'implantation des cages sur le site. En effet, les vents dominants, la géomorphologie et la période de l'année pendant laquelle les escargots sont transférés sur le site étudié doivent être pris en compte dans le but d'obtenir une bonne évaluation de l'impact de la pollution d'origine autoroutière dont le volume de trafic est le facteur principal.

Il est également important de prendre en considération le bruit de fond pédogéologique. Sur le site étudié, il est difficile d'obtenir sa bonne évaluation. La contamination s'explique, du côté gauche, par la proximité d'une route secondaire que des camions utilisent, transportant des granulats, et, du côté droit, par une importante activité agricole (maïsiculture). Cette étude confirme l'importance d'utiliser des escargots d'élevage en conditions contrôlées comme référence.

Le chapitre sur les isotopes du plomb montrera l'intérêt de la recherche de la composition isotopique du plomb pour établir les origines possibles de la contamination par ce métal (*Cf.* chapitre V)

IV.1.3.5. Intérêt de l'utilisation d'une nourriture de référence dans le but d'obtenir de bons escargots témoins

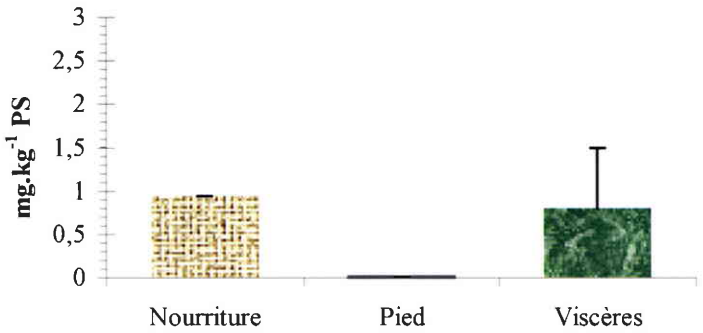


Figure 71 : Concentrations moyennes en plomb (mg/kg de poids sec) dans les pieds et les viscères en comparaison avec la concentration moyenne en plomb dans la nourriture Helixal® formulée en 1996.

La qualité de la nourriture Helixal®, apportée aux escargots durant deux mois d'élevage, est une bonne nourriture de référence permettant d'obtenir des escargots exempts de contamination métallique et présentant une réactivité recherchée dans le cadre du biomonitoring actif.

IV.1.4. Conclusion

En fonction des résultats obtenus, il est démontré que le plomb est principalement accumulé dans les viscères, ce qui corrobore les résultats obtenus par Brooks *et al.* (1992). Les cages les plus contaminées sont celles qui sont les plus proches de l'autoroute qui génère une contamination par le plomb sur une distance d'au moins 40 mètres de part et d'autre de la chaussée. De plus, la période d'implantation des cages est importante comme l'a démontré l'étude. De fait, en fonction du cycle biologique des escargots et du climat, leur activité n'est jamais la même. Il est nécessaire de prendre en compte ces paramètres car ils interfèrent avec les teneurs en métaux bioaccumulés par les escargots et peuvent apporter une mauvaise appréciation de l'impact réel de la contamination d'un site. De plus, il y a une importante influence de la géomorphologie du site et de son exposition aux vents dominants. Ces derniers influent directement sur les niveaux de contamination ; les dépôts métalliques pouvant contaminer les cages, qui sont les plus distantes de l'autoroute, si celles-ci sont sous le vent dominant.

Les différents auteurs avaient déjà démontré qu'il y a une relation entre le niveau de contamination de l'environnement et les teneurs des escargots en ce métal (Pihan *et al.*, 1993 ; Gomot, 1994 ; Pihan *et al.*, 1994 a et b ; Pihan *et al.*, 1995) avec, dans quelques cas, des différences dues à la présence d'espèces chimiques dont la biodisponibilité peut parfois varier (Moser et Wieser, 1979).

Selon les résultats, plusieurs conclusions peuvent être émises. Il est important d'obtenir des animaux de référence (*Helix aspersa aspersa*), sans contamination préalable ou une contamination limitée et contrôlée (escargot d'élevage, Gomot A., Besançon, France). En effet, l'utilisation des ces escargots est intéressante car leur passé, leur âge, la nourriture qu'ils ont ingéré sont connus ainsi ils peuvent être considérés comme référence pour l'étude de

l'impact d'une contamination. De précédentes études ont été faites afin de connaître l'impact du trafic sur l'environnement, mais toutes ces études ont toujours utilisé des individus d'espèces autochtones (*Helix aspersa aspersa*, *Helix pomatia*, *Arantia arbustorum*, ...) (Berger et Dallinger, 1993). Les espèces autres que *Helix aspersa aspersa* sont aussi de bons indicateurs de la contamination mais, en biomonitoring passif, il est difficile de savoir si la contamination des escargots provient exclusivement du trafic et non d'une autre source. En effet, le passé de ces individus n'est pas connu. Les résultats obtenus, dans la présente étude, apportent une nouvelle démarche pour évaluer l'impact de la contamination engendrée par l'activité autoroutière.

Le protocole est particulièrement bien adapté à une étude de la contamination chronique sur une période d'une semaine. Ce temps d'exposition permet de renouveler plusieurs études durant un mois, mais également pendant les printemps, été et automne.

L'étude séparée des pieds et des viscères permet, concernant les pieds, d'obtenir, dans le cas de la première expérience, un diagnostic plus discriminant entre les stations. La troisième expérimentation a démontré que l'étude des viscères est suffisante pour révéler une contamination le long d'une voie de circulation comme dans le cas d'une autoroute. Les niveaux de contamination (première étude) dans les viscères sont de 7 à 30 fois supérieurs à ceux des pieds et montrent, finalement, une contamination jusqu'au moins 40 mètres du bord de l'autoroute. Le contenu en plomb, en mg/escargot, corrobore cette conclusion. Afin de confirmer ces résultats, une extension de la zone d'impact, jusqu'à 320 mètres, a permis de discuter des teneurs en plomb du fond pédogéologique. En effet, le fond pédogéologique doit être pris en compte car une contamination en plomb, éventuellement d'origine naturelle, en plomb ne dois pas être imputée à l'autoroute. L'étude des isotopes du plomb a été réalisée afin de proposer une solution (*Cf.* chapitre V).

IV.2. Biosurveillance en environnement industriel : utilisation de l'escargot comme organisme bioindicateur de la contamination polymétallique d'un centre d'enfouissement technique et de l'efficacité de la remédiation effectuée

IV.2.1. Le site

La décharge, où les escargots ont été collectés ou implantés, est un Centre d'Enfouissement Technique (CET) localisé à Jouy-aux-Arches près de Metz. Par suite de comblement, son activité s'est arrêtée le 21 octobre 1991. Après 18 mois de procédures administratives, la réhabilitation du site a commencé en mars 1993 et s'est achevée en novembre 1994.

Au départ, ce site était une ancienne carrière d'une tuilerie et a été retenu, à la fin des années 70, pour être aménagé en CET en raison de ses qualités géologiques. Ce site a été exploité par la Société France DECHETS selon la technique des alvéoles étanches ; il a reçu, pendant les trois premières années, les résidus admissibles en Classe 1. A partir de 1983, seules les ordures ménagères des communes du Canton et les déchets solides de l'activité de dépollution industrielle de CEDILOR (traitement physico-chimique (CaO) des effluents industriels contenant des métaux lourds), y ont été entreposés. Chaque type de déchets est enfoui dans des alvéoles séparées. Il y a sur le site 41700 tonnes de déchets domestiques, 17935 tonnes de déchets industriels solides et 170 tonnes de boues minérales.

Planche III$_4$: Différents aspects de la remédiation du CET













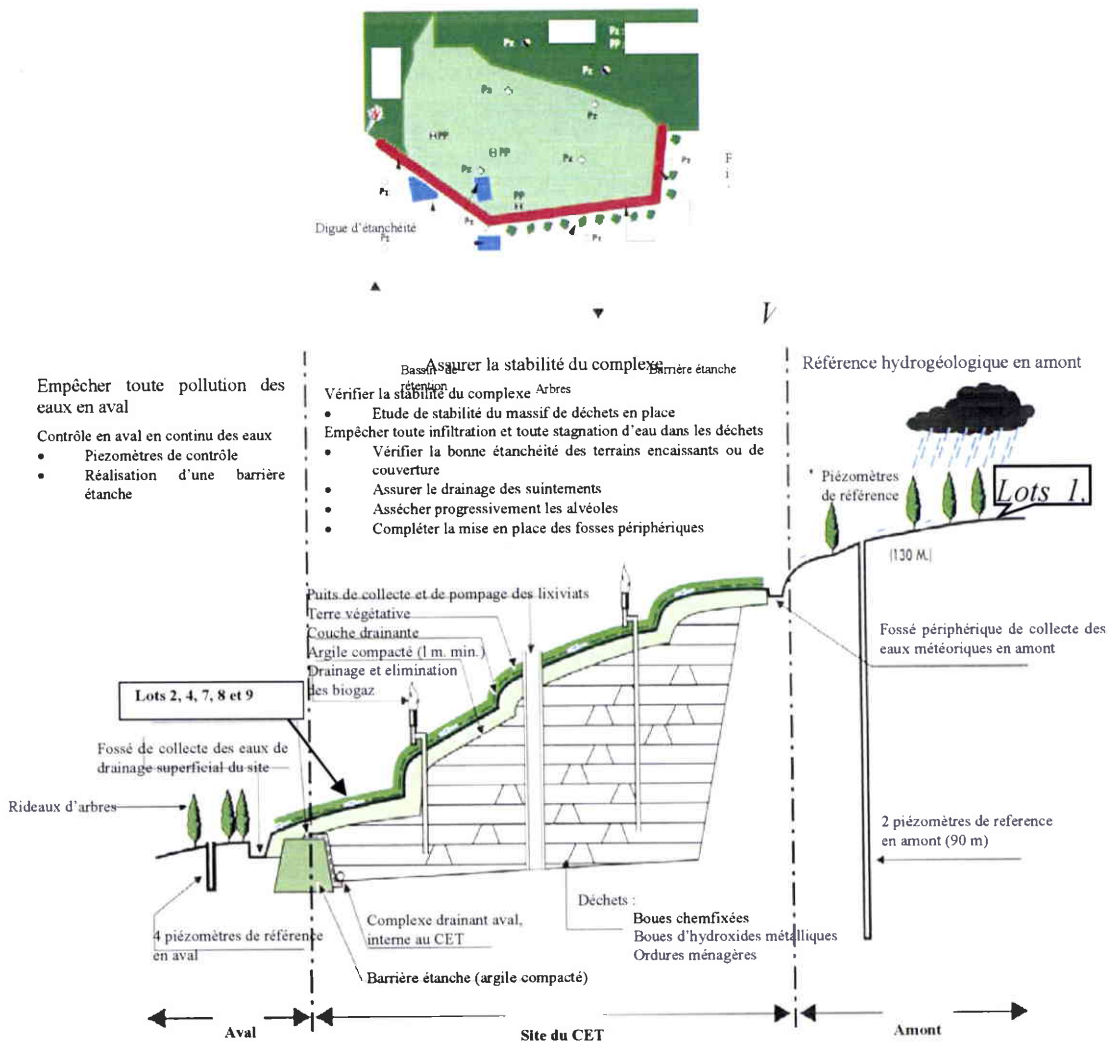






a : CET avant la remédiation (H.p.) ; ***b*** : création du basin des eaux drainées ; ***c*** : mise en place de la digue d'étanchéité ; ***d*** : mise en place de l'argile (1 m d'épaisseur) : ***e*** : déroulage du géotextile de drainage et du grillage plastique sur lequel est déposé le sol végétal ; ***f*** ; mise en place du sol végétal (0,4 m) ; ***g*** : mise en place des drains ; ***h*** : fin de la remédiation ; ***i*** : vue générale du CET 1 ½ après remédiation.

Planche III$_5$: Vue en coupe du CET et vue de dessus avec localisation des différents lots d'escargots



IV.2.2. La remédiation effectuée

La remédiation s'est effectuée en plusieurs étapes selon le principe du confinement avec en aval, une digue d'étanchéité en argile, doublée d'une membrane en polyéthylène, une couverture d'un mètre d'épaisseur en argile compactée avec une membrane draînante recouverte de terre végétale (Planches III_4 et III_5). Les eaux issues des déchets sont collectées, analysées et, si besoin, traitées, ceci jusqu'à assèchement des alvéoles. Les eaux de pluie sont détournées en amont par un fossé de ceinture et sont collectées, en surface du site, dans deux bassins pour des contrôles réguliers. Le biogaz est également collecté et brûlé par des torchères à capteurs solaires. Des piézomètres permettent de contrôler l'étanchéité du site ; des inclinomètres et des bornes topographiques permettent de surveiller la stabilité mécanique du site.

IV.2.3. Résultats

IV.2.3.1. Métaux dans les lixiviats

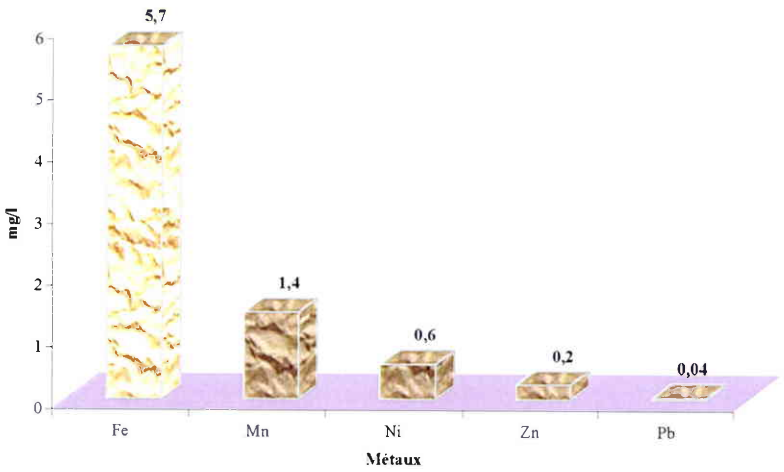


Figure 72 : Concentrations en fer, manganèse, nickel et plomb dans les lixiviats (CET) – Données Cedilor

Les lixiviats des hydroxydes métalliques, provenant du traitement physico-chimique à la chaux des effluents industriels, contiennent des métaux lourds. Le résultat des analyses sur les lixiviats, pour l'année 1994, est représenté sur la figure 72. La mobilité des métaux lourds par ordre d'importance des concentrations est la suivante : fer, manganèse, nickel, zinc et plomb. Ceci signifie que ces métaux peuvent être biodisponibles pour les organismes. En ce qui concerne les autres métaux : le chrome et le cuivre sont uniquement présents sous forme d'éléments traces ; le cadmium n'est pas détectable. L'ensemble de ces huit métaux est concerné par le traitement physico-chimique.

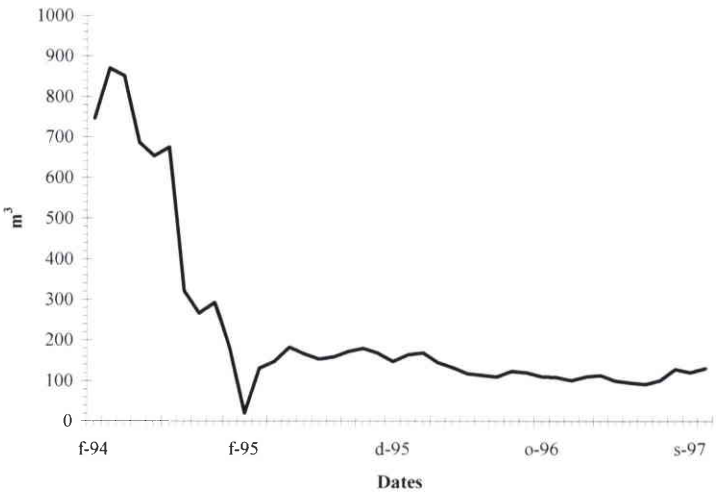


Figure 73 : Débits mensuels des lixiviats (m^3) – CET- Données Cedilor

La mise en place de cages contenants des escargots sur le CET peut apporter des réponses quant à la probabilité d'une éventuelle contamination métallique due à une fraction biodisponible des métaux.

Depuis février 1994, il y a une décroissance des débits de lixiviats (figure 73). Ceci démontre les effets positifs de la remédiation en ce qui concerne l'imperméabilité du site ainsi encapsulé.

IV.2.3.2. Métaux bioaccumulés par les escargots

IV.2.3.2.1. Origine des différents lots d'escargots

a. Les espèces autochtones (*Helix pomatia*, adultes) proviennent d'une part d'un site non-contaminé de référence (lots **1** et **3**) et d'autre part du CET avant la remédiation (lot **2**).
   Le lot **3**, comme le lot **1**, proviennent de la même aire géographique. Le lot **1** a été prélevé, au milieu de la colline, dans une forêt calcaire avec des argiles de décalcification. Le lot **3** vient d'une forêt et d'une clairière en bas de la pente.
   Le lot **4**, *Helix pomatia* de la nature, a été transféré (biomonitoring actif), pendant un mois, un an et demi après la remédiation depuis un site non contaminé (lot **3**) sur le site contaminé.

b. Les espèces non autochtones (*Helix aspersa aspersa*), proviennent d'un élevage en conditions contrôlées. Le lot **5** sert de référence pour la nourriture. Le lot **7** a été transplanté sur le site un an et demi après la remédiation. Les lots **8** et **9** ont été placés sur le site à deux localisations différentes, et durant la même période, deux ans et demi après la remédiation. Le lot **6** (*Helix aspersa aspersa* autochtones) sert de référence pour le fond pédogéologique. L'ensemble de ces lots a été placé sur le site pendant une période de un mois.

La planche III_5 présente une section transversale du CET ainsi que le lieu de mise en place des stations pour le biomonitoring actif.

IV.2.3.2.2. Contamination métallique des escargots avant la remédiation (population autochtone de Helix pomatia)

Les lots d'escargots **1**, **2** et **3** concernent le biomonitoring passif. Les concentrations en métaux dans les lots **1** et **3**, considérés comme référence du fond pédogéologique, (Tableau 35) varient selon le lieu de prélèvement. Les différents états physiologiques doivent également être pris en compte.

Le lot **1** présente des concentrations significativement plus élevées que celles du lot **3** pour le fer, le plomb, le cadmium et le manganèse ; supérieures pour le zinc et le cuivre ; significativement inférieures pour le chrome et inférieures pour le nickel. La recherche des causes a mis en évidence une importante fréquentation humaine du site où les escargots du lot **1** ont été collectés (forêt avec exploitation du bois et promeneurs). De plus, ce lot provient d'un endroit plus riche en roches calcaires présentant des cristallisations de manganèse. Le lieu où les escargots du lot **2** ont été prélevés est moins fréquenté, à l'écart du circuit pédestre, mais il montre cependant une contamination en chrome et en nickel. Une étude plus approfondie a démontré la présence à proximité d'une décharge sauvage d'objets encombrants. Ainsi, sur les deux sites de prélèvement **1** et **2**, les escargots ont pu, pendant leurs déplacements, être en contact avec une contamination d'origine mixte (naturelle et anthropique).

Tableau 35 : Comparaisons des teneurs en métaux dans le lot 1/lot 3, lot 2/lot 1 et lot 2/lot 3 ; rappel des métaux présents ou non dans les lixiviats
Animaux : ↗ : croissance significative ($P < 0.05$) ; ↗ : croissance non-significative ($P > 0.05$) ; ↘ : décroissance significative ($P < 0.05$) ; ↘: décroissance non-significative ($P > 0.05$)
Lixiviats : x : présence ; traces : < 0.04 mg.l^{-1} ; Abs. : absence

	Ni	Fe	Pb	Cr	Zn	Cd	Mn	Cu
Lot 1/lot 3	↘	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↗
Lot 2/lot 1	↗	↗	↗	↗	↗	↗	↘	↘
Lot 2/lot 3	↗	↗	↗	↘	↗	↗	↗	↘
Lixiviats	x	x	x	traces	x	Abs.	x	traces

La comparaison du lot **2** provenant du CET avec les lots de référence **1** et **3** permet de montrer un niveau de contamination supérieur pour le lot du CET avec une significativité qui dépend de la référence au lot **1** ou au lot **3** en excluant dans le lot **1** le manganèse et dans le lot **3**, le chrome et le nickel : ces trois métaux étant présents à des concentrations trop élevées pour être pris en compte en tant que référence.

L'accroissement de la contamination du CET est significativement plus élevé pour le fer, le plomb, le zinc, le cadmium et le manganèse, plus élevée pour le nickel et le chrome. Il n'y a pas de contamination par le cuivre.

En comparaison avec les informations apportées par les lixiviats sur le contenu métallique du CET, il y a une biodisponibilité de six métaux : nickel, fer, plomb, zinc, chrome et manganèse. Par contre, le cadmium, qui n'est pas détecté dans les analyses des lixiviats, est mis en évidence par l'escargot. Le site ne présente pas de problème pour le cuivre.

IV.2.3.2.3. Contamination métallique des escargots après la remédiation

a. Contamination métallique un an et demi après la remédiation (*Helix pomatia*)

Les animaux du lot **4**, transplantés sur le CET (biomonitoring actif), montrent, en comparaison avec le lot de référence (lot **3**), une décroissance significative des teneurs en nickel, un accroissement significatif des teneurs en fer, plomb et chrome et un accroissement non-significatif des teneurs en zinc, manganèse, cuivre et cadmium (Tableau 36).

La comparaison des lots **4** et **2** (CET avant et après la remédiation, tableau 36) montre une décroissance significative pour le cadmium, le nickel, le plomb et le zinc, une décroissance non-significative pour le fer et le manganèse. Par contre, le chrome présente une teneur très significativement supérieure à celle observée avant la remédiation. L'augmentation de la concentration en cuivre n'est pas significative.

Ainsi, après la remédiation, il y a une nouvelle origine de métaux lourds. Ceux-ci sont apportés par le sol utilisé pour recouvrir le CET avec des conséquences, sur la bioaccumulation moindres que celles des hydroxydes métalliques du CET sauf pour le chrome.

b. Contamination métallique un an et demi après la remédiation (*Helix aspersa aspersa*)

✓ Contamination des animaux d'élevage avant leur transfert (lot **5**) et comparaison avec des animaux de référence du fond pédogéologique (lot **6**)

Le contrôle des constituants de la nourriture d'élevage (lot **5**) permet de garantir un niveau de contamination stable en métaux lourds même si pour certains métaux, le niveau de contamination reste encore plus élevé que celui des animaux provenant de la même région géographique (site non contaminé) que celle du site de transfert (lot **6**, tableau 36).

Pour le lot d'élevage (lot **5**, figures 74a, 74d et 74f), il n'y a pas de contamination concernant le cadmium, le plomb et le manganèse avec une teneur significativement inférieure à celle du fond pédogéologique (lot **6**). Pour le nickel (figure 74b), les teneurs sont les mêmes dans les deux lots. Pour le chrome, le cuivre et le zinc (figures 74e, 74g et 74h), les teneurs du lot **5** sont significativement supérieures à celles du lot **6**. Pour le fer, les concentrations du lot **5** sont très faiblement supérieures à celles du lot **6**.

L'utilisation d'escargots d'élevage permet donc, dans de bonnes conditions, de suivre l'évolution de la contamination métallique après exposition à des teneurs en cadmium, plomb, manganèse, nickel et fer (figures 74a, 74d, 74f, 74b et 74c) ; dans des conditions acceptables l'exposition à des teneurs en cuivre (figure 74g) et dans des conditions limites l'exposition à des teneurs en zinc (figure 74h) et spécialement en chrome (figure 74e). Quelques modifications dans les constituants de la nourriture pourraient permettre d'améliorer l'utilisation des animaux d'élevage.

✓ Comparaison entre le lot transféré (lot **7**) et les lots d'élevage (lot **5**, tableau 36)

L'étude comparative, entre les lots **7** et **5**, montre des concentrations dans le lot **7** significativement supérieures au lot **5** pour le cadmium, le plomb et le manganèse (figures 74a, 74d et 74f), des concentrations identiques pour le fer (figure 74c) et des concentrations significativement inférieures pour le chrome (figure 74e), bien que celles-ci soient à un niveau important, ce qui montre la présence de chrome. Il y a une décroissance non significative de la

teneur en zinc (figure 74h) et une croissance non significative des teneurs en nickel et en cuivre (figures 74b et 74g).

Le diagnostic, un an et demi après la remédiation, est résumé dans le tableau 36. Le sens des déviations est dépendant des teneurs de référence des lots **3** (référence des *Helix pomatia* de la nature), **5** (référence des *Helix aspersa aspersa* d'élevage) et **6** (référence des *Helix aspersa aspersa* de la nature).

Tableau 36 : Comparaison des diagnostics obtenus avec les deux espèces *Helix pomatia* (H.p.) et *Helix aspersa aspersa* (H.a.a.) dans deux situations différentes : l'utilisation d'animaux de la nature pour H.p. et des animaux d'élevage pour H.a.a.
↗↗ : croissance significative (P < 0.05) ; ↗ : croissance non significative (P > 0.05)
= : similaire
↘↘ : décroissance significative (P < 0.05) ; ↘: décroissance non significative (P > 0.05)

	Ni	Fe	Pb	Cr	Zn	Cd	Mn	Cu
H.p. lot 4/lot 3	↘↘	↗↗	↗↗	↗↗	↗	↗	↗	↗
H.a.a. lot 5/lot 6	=	↗	↘↘	↗↗	↗↗	↘↘	↘↘	↗↗
H.a.a. lot 7/lot 5	↗	=	↗↗	↘↘	↘	↗↗	↗↗	↗
H.a.a. lot 7/lot 6	↗	↗	↗↗	↗↗	↗↗	↗↗	↘	↗↗

✓ Comparaison entre les lots **7** (transférés) et **6**

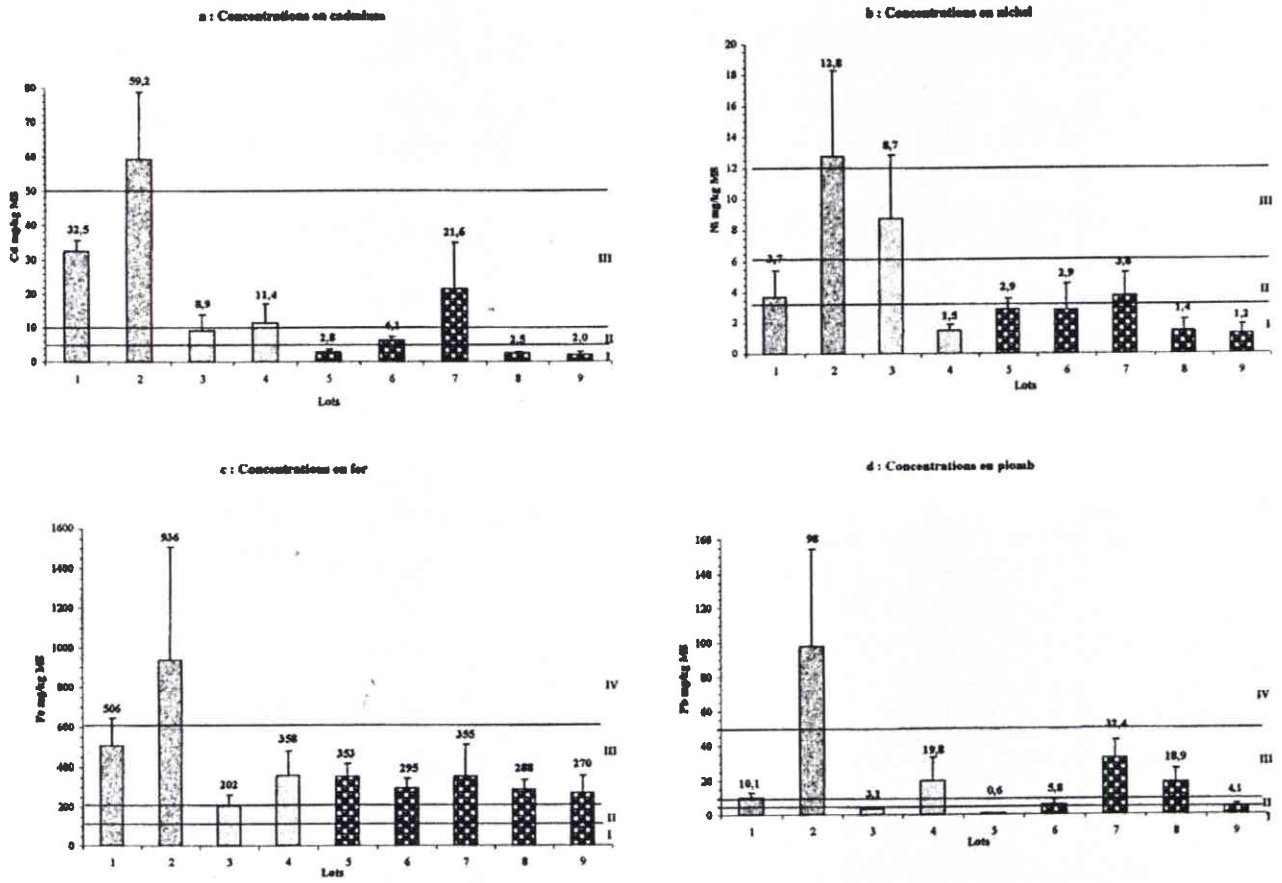
L'étude comparative entre les lots **7** et **6** (tableau 36) montre une contamination significative du CET en plomb, chrome, zinc, cadmium et cuivre (figures 74d, 74e, 74h, 74a et 74g). Il y a une tendance à l'accroissement pour le nickel et le fer (figures 74b et 74c) et une tendance à la décroissance pour le manganèse (figure 74f).

La synthèse des résultats des comparaisons entre les lots **7** et **5** d'une part et des lots **7** et **6** d'autre part, permet de conclure qu'il y a une contamination du CET par le plomb, le chrome, le zinc, le cadmium, le manganèse et le cuivre (figures 74d, 74e, 74h, 74a, 74f et 74g), et une absence d'une contamination significative par le nickel et le fer (figures 74b et 74c).

✓ Comparaison entre les lots de *Helix aspersa aspersa* transférés (lots **4** et **7**) et le lot autochtone de *Helix pomatia* avant remédiation (lot **2**)

La comparaison des teneurs en métaux, chez *Helix aspersa aspersa* (lot **7**), avec celles de *Helix pomatia* (lot **2**), est réalisée en tenant compte de leur appartenance au même genre *Helix* et de l'absence de différences significatives entre les lots **7** et **4** transférés sur le même site dans les mêmes conditions expérimentales.

Le tableau 37 donne un diagnostic de l'effet de la remédiation un an et demi après celle-ci en comparant les lots **4** et **7** avec le lot **2**. Un effet très favorable et une décroissance significative sont à noter pour le nickel, le plomb, le zinc et le cadmium (figures 74b, 74d, 74h et 74a). Il y a un effet favorable avec une décroissance non significative pour le fer (74c). En ce qui concerne le manganèse (figure 74f), il y a un effet variable selon l'espèce considérée. Pour le cuivre et le chrome (figures 74g et 74e), l'effet est respectivement défavorable et très significativement défavorable.



1 : *Helix pomatia* (site de référence 1)
2 : *Helix pomatia* (CET autochtones)
3 : *Helix pomatia* (site de référence 2)
4 : *Helix pomatia* transférés du site 3 sur le CET 1,5 ans après la remédiation
5 : *Helix aspersa aspersa* (escargot d'élevage de référence)
6 : *Helix aspersa aspersa* (référence pédogéologique)
7 : *Helix aspersa aspersa* transférés 1,5 ans après la remédiation
8 et 9 : *Helix aspersa aspersa* transférés 2,5 ans après la remédiation

Figure 74-1: Concentrations en cadmium (a), nickel (b), fer (c) et plomb (d) dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* et d'*Helix pomatia*

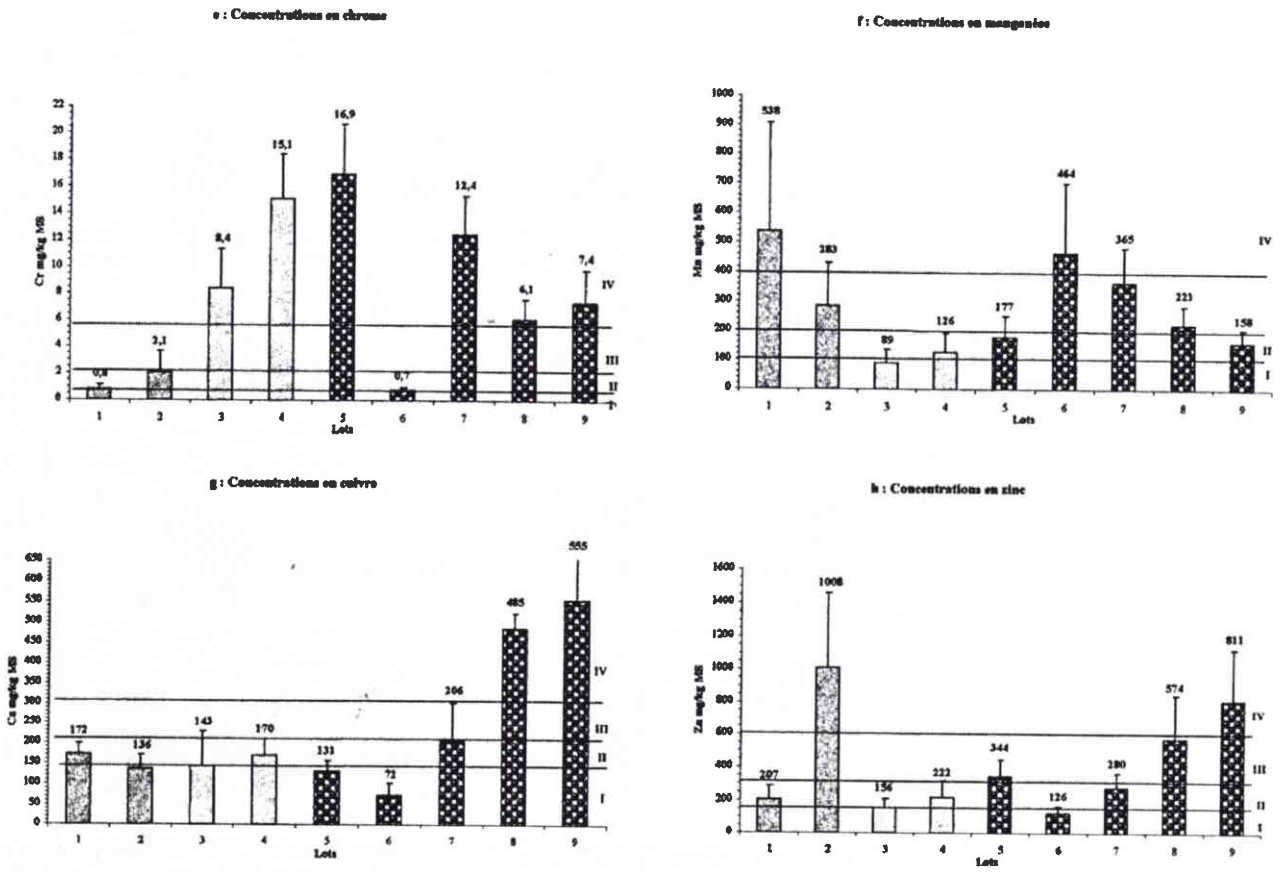


Figure 74-2 : Concentrations en chrome (e), manganèse (f), cuivre(g) et zinc (h) dans les viscères d'*Helix aspersa aspersa* et d'*Helix pomatia*

Tableau 37 : Situation de la contamination métallique 18 mois après la remédiation de CET
↗ : croissance significative (P < 0.05) ; ↗ : croissance non significative (P > 0.05)
↘ : décroissance significative (P < 0.05) ; ↘: décroissance non significative (P > 0.05
++ : effet très favorable ; + : effet favorable ; - : effet défavorable ; -- : effet très défavorable

	Ni	Fe	Pb	Cr	Zn	Cd	Mn	Cu
H.p. lot 4/lot 2	↘++	↘+	↘++	↗--	↘++	↘++	↘+	↗-
H.a.a. lot 7/lot 2	↘++	↘++	↘++	↗--	↘++	↘++	↗-	↗-

c. Contamination métallique deux ans et demi après la remédiation (*Helix aspersa aspersa*, lots **8** et **9**)

Les lots **8** et **9** montrent quelques différences qui sont liées à l'hétérogénéité du site qui a reçu des déchets domestiques et des déchets industriels après traitement. Seul le plomb (figure 74d) est significativement en concentration supérieure dans le lot **8** par rapport au lot **9**.

Le lot de référence est également le lot **5** en raison la stabilité de l'élevage. La comparaison avec le lot **7** permet de déterminer l'évolution au cours du temps (tableau 38) c'est-à-dire entre un an et demi et deux ans et demi après la remédiation.

Pour le nickel et le chrome (figures 74b et 74e), il y a une décroissance significative entre les lots **8** et **9** et les lots **5** et **7**, et il y a une décroissance non significative pour le fer (figure 74c). Au contraire, pour le cuivre (figure 74g), il y a une croissance significative. Pour le cadmium (figure 74a), la situation deux ans et demi après la remédiation, présente une décroissance significative entre les lots **8** et **9** et le lot **7**. En ce qui concerne le plomb (figure 74d), il y a un accroissement significatif entre les lots **8** et **9** et le lot **5** même s'il y a une décroissance significative entre ces deux lots et le lot **7**. Pour le zinc (figure 74h), il y a un accroissement non significatif pour le lot **8** en comparaison avec les lots **5** et **7** et un accroissement significatif pour le lot **9**. En ce qui concerne le manganèse (figure 74f), le lot **8** montre une croissance non significative en comparaison avec le lot **5** même s'il présente une décroissance non significative en comparaison avec le lot **7**. Le lot **9** montre une décroissance non significative avec le lot **5** et une décroissance significative avec le lot **7**.

Tableau 38 : Comparaison entre les deux sites du CET (lots 8 et 9) où les escargots ont été transférés et la référence (lot 5). Comparaison entre les résultats à deux périodes différentes après la remédiation (1,5 ans : lot 7 ; 2,5 ans : lots 8 et 9)
↗ : croissance significative (P < 0.05) ; ↗ : croissance non significative (P > 0.05)
↘ : décroissance significative (P < 0.05) ; ↘: décroissance non significative (P > 0.05)

	Ni	Fe	Pb	Cr	Zn	Cd	Mn	Cu
Plot 8/plot 7	↘	↘	↘	↘	↗	↘	↘	↗
Plot 9/plot 7	↘	↘	↘	↘	↗	↘	↘	↗
Plot 8/plot 5	↘	↘	↗	↘	↗	↘	↗	↗
Plot 9/plot 5	↘	↘	↗	↘	↗	↘	↘	↗

Tableau 39 : Situation deux ans et demi après la remédiation du CET
↗ : croissance significative (P < 0.05) ; ↗ : croissance non significative (P > 0.05)
↘ : décroissance significative (P < 0.05) ; ↘: décroissance non significative (P > 0.05
++ : effet très favorable ; + : effet favorable ; - : effet défavorable ; -- : effet très défavorable

	Ni	*Fe*	*Pb*	*Cr*	*Zn*	*Cd*	*Mn*	*Cu*
Plot 8/plot 2	↘++	↘++	↘++	↗--	↘+	↘++	↘+	↗--
Plot 9/plot 2	↘++	↘++	↘++	↗--	↘+	↘++	↘+	↗--

Ainsi, deux ans et demi après la remédiation, le bioindicateur montre que les problèmes vis à vis du nickel, du fer, du plomb et du cadmium (figures 74b, 74c, 74d et 74a) sont résolus. Pour le manganèse (figure 74f), l'évolution durant la seconde année est favorable avec une décroissance significative pour le lot **9**. D'un autre côté, l'argile et/ou le sol végétal utilisés ont apporté une contamination, nouvelle et immédiate par le chrome (figure 74e), nouvelle et progressive par le cuivre et le zinc (figures 74g et 74h) avec une tendance à la décroissance avec le temps pour le chrome et à l'accroissement pour le cuivre et le zinc.

IV.2.4. Discussion

Le bilan global peut être réalisé en se référant à la grille de contamination proposée par Pihan *et al.* (1995-1996) pour le plomb et étendu aux autres métaux selon les limites de classes qui prennent en compte les multiples observations sur un grand nombre de sites (*Cf.* chapitre I). Les différentes classes permettent d'établir le tableau 40 :

Tableau 40 : Synthèse des résultats analytiques avant et après remédiation pour les huit métaux étudiés. H.p. : *Helix pomatia* ; H.a.a. : *Helix aspersa aspersa*.

		Fe	Mn	Ni	Zn	Pb	Cr	Cu	Cd	Lots
CET avant remédiation	Lixiviats						*Traces*	*Traces*	*Abs.*	
	H.p. aut.									2
CET après remédiation	H.p. + 1,5 ans									4
	H.a. + 1,5 ans									7
	H.a. + 2,5 ans									8
	H.a. + 2,5 ans									9
	H.a. élevage	F			F		F			5
	H.a. geoch.									6
Références			*Fe*	*Mn*						
	Hp								H	1
	Hp			H			H			3

Lixiviats

Escargots

Contamination des lixiviats par les métaux

Classe I

Classe II

Classe III

Classe IV

F : métal apporté par la nourriture

H : contamination anthropique

Abs. : absence

Une comparaison avec la classification de Berger et Dallinger (1993), concernant *Arianta arbustorum* peut être faite. Ces classes ont été établies selon différentes origines de pollution (tableau 41).

Tableau 41 : Classification des lots du CET selon la grille de Berger et Dallinger (1993). Les teneurs sont exprimées en $mg.kg^{-1}$ de poids sec
Classe 1 : référence
Classe 2 : circulation et villes
Classe 3 : fonderies et mines

	Classe	Variation	Moyenne	Avant la remédiation Helix pomatia	Après la remédiation 1,5 ans H.p.	1,5 ans H.a.a.	2,5 ans H.a.a.
Cuivre	1	46-104	84				
	2	30-408	188				
	3	45-228	84				
Zinc	1	86-212	136				
	2	144-1480	310				
	3	400-1868	873				
Cadmium	1	1-9	5				
	2	8-24	13				
	3	29-139	70				
Plomb	1	4-19	9				
	2	14-160	41				
	3	28-365	141				

Selon Berger et Dallinger (1993), le site du CET est en classe 3 pour les quatre métaux avant la remédiation, ceci est en accord avec les activités industrielles à l'origine des déchets traités.

Un an et demi après la remédiation, les teneurs en zinc, en cadmium, et en plomb sont en classe 2. Le cuivre est en classe 2 ou 3 en fonction de l'espèce considérée.

Deux ans et demi après la remédiation, le cadmium et le plomb sont en classe 1 (référence), le cuivre est en classe 2 et le zinc en classe 3.

Il est possible d'ajouter une nouvelle classe à celles proposées par Berger et Dallinger (1993). Cette classe serait la classe 4 et concernerait les activités liées à l'agriculture. En effet, la contamination du sol utilisé pour la remédiation est liée à l'exploitation d'une ancienne pépinière, il contient probablement des métaux liés aux techniques horticoles utilisant des engrais et des sels de métaux lourds ($CuSO_4$).

IV.2.5. Conclusion

Selon l'ensemble de ces résultats, les escargots peuvent être considérés comme de bons organismes pour le biomonitoring actif et passif. En comparaison avec les teneurs en métaux chez *Helix aspersa aspersa* et *Helix pomatia* un an et demi après la remédiation, *Helix aspersa aspersa* accumule plus qu'*Helix pomatia* en ce qui concerne le cadmium, le cuivre, le manganèse, le nickel, le plomb et le zinc et, à un niveau équivalent, le chrome et le fer.

La référence au fond pédogéologique est difficile à établir en raison de la variabilité des sols dans la même aire géographique mais également en raison de l'activité humaine.

L'utilisation d'*Helix aspersa aspersa* provenant d'un élevage en conditions contrôlées représente une bonne solution. Néanmoins, dans le cas présent, il a été démontré une contamination significative par le fer, le chrome et le zinc. Ces métaux sont apportés par la nourriture donnée aux animaux. La recherche d'une amélioration par une modification des ingrédients entrant dans la composition de la nourriture et par le contrôle de la fabrication de la farine est en cours.

L'application du biomonitoring utilisant les escargots dans l'évaluation des effets de la remédiation a montré la bonne efficacité de la technique employée, à savoir l'encapsulation du CET. L'engazonnement est satisfaisant avec une intégration dans le paysage. L'assèchement se poursuit. Le recouvrement emprisonne les métaux comme le cadmium, le plomb et le nickel. En comparaison avec les métaux mis en évidence dans les lixiviats, les escargots ont montré la présence des même métaux (Fe, Mn, Zn, Pb, Ni),une meilleure mise en évidence du chrome et du cuivre, mais aussi la présence de cadmium qui n'avait pas été détecté dans les lixiviats.

Il est important de vérifier la qualité des matériaux utilisés durant la remédiation, car une nouvelle contamination par le chrome, le cuivre et le zinc a été démontrée. Il faut également prendre en compte le temps : par exemple, le chrome et le manganèse, présents un an et demi après la remédiation, décroissent après deux ans et demi.

Ce chapitre fait l'objet de la publication :

Pihan F. and de Vaufleury A., 2000 : The snail as a target organism for the evaluation of industrial waste damps contamination and the efficiency of its remediation. Ecotoxicology and Environmental Safety 46, 137-147.

IV.3. Biosurveillance en environnement anthropisé.

La même méthodologie de monitoring actif avec transfert que celle appliquée sur le site de Cedilor a été réalisée en partenariat avec Besançon sur un deuxième centre d'enfouissement de Franche-Comté (Centre de Vaivre). Les microcosmes ont été installés sur deux alvéoles comblées, l'une depuis 1984 (THC-a), l'autre depuis 1992 (THC-b), le reste du site étant toujours en exploitation. La référence est un site forestier (site de Gy) sans activité humaine proche. Enfin, dans l'objectif de croiser les informations avec la classification de Berger et Dallinger (1993) selon les activités humaine, un site urbain a été choisi dans Besançon, à proximité d'un carrefour important (place Leclerc).

Cette étude a donné lieu à une publication :

Gomot de Vaufleury A. and Pihan F., 2000 : Growing snails used as sentinel for the evaluation of terrestrial environment contamination by trace elements. Chemosphere 20 (3), 275-284.

La partie expérimentale a été réalisée à Besançon et les analyses de métaux à Metz.

Cette publication constitue ce chapitre.

PERGAMON

Chemosphere 40 (2000) 275–284

CHEMOSPHERE

Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements

A. Gomot de Vaufleury[a,b,*], F. Pihan[c]

[a] *Laboratoire de Biologie et Ecophysiologie- U.F.R. des Sciences et Techniques- place Leclerc- 25030, Besançon Cedex, France*
[b] *Department Hygiène Sécurité Environnement, IUT de Vesoul, B.P. 179, 70003 France*
[c] *UPRES-EBSE- C.R.E.U.M- Laboratoire d'Ecotoxicologie- Université de Metz-1, rue des Récollets- B.P. 4116-57040 Metz Cedex 01- France*

Received 19 April 1999; accepted 31 May 1999

Abstract

Young garden snails (*Helix aspersa*) reared in standard conditions (aged two months, mean weight 4.6 ± 0.5 g) set as sentinels in cages laid on the soil for four weeks, give data for biomonitoring the environmental impact of chemicals on soil ecosystems in the field. The survival and the growth of the snails are influenced by the nature of the biotope and the level of the pollutants. Assay of cadmium, copper, lead and zinc bioaccumulated in the tissues of the sentinel snails provides information on the bioavailability of metals in the environment. The encagement model, little used for terrestrial species, can be useful in monitoring (specific and global endpoints) metal pollution of the environment in reference to the trophic level of the primary consumers. Active biomonitoring is positively compared with the passive biomonitoring. © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The impact of contamination of the terrestrial environment by metallic trace elements is difficult to evaluate because of the complexity of soil ecosystems and high soil variability. Chemical analysis methods provide fractionated indications concerning either physical components (soil, air, pore water...) or living organisms (flora, fauna, micro-organisms) but they do not allow the ecological effects of the pollution to be measured. Information can be obtained on the consequences of contamination by studying the modifications of the biocenosis but this particularly interesting approach is labour-intensive and need mid and long terms observations with necessary floristic and faunistic reference inventories, which is not the case in general. Therefore, to obtain data more quickly, tests are done in the laboratory and in situ. These methods do not reproduce all the complexity of what it happens in nature, but they do give short term indications on the impact of the contaminants on key species which have an important function in the ecosystems due to their biology and distribution but also to the ease with which they can be bred for experiment.

For surveillance of terrestrial environments, the tests mainly use vascular plants, only three official laboratory tests using invertebrates (Keddy et al., 1994). Two tests: ISO/DIS 112 68-1 (1994) and ISO/DIS 112 68-2 (1994) use the earthworm *Eisenia foetida* and test ISO/TC 190 SC4WG (1994) uses the collembola *Folsomia candida*. In addition to these standard tests, over the last few years there has been an increasing use of microcosm and mesocosm techniques because these allow data to be obtained in situations that simulate field conditions. To predict the environmental impact of chemicals on soil ecosystems in the field, a laboratory microcosm must offer characteristics comparable to those of a typical field soil and provide easily interpretable data. However, the microcosms so far used for ecotoxicological

* Corresponding author.

0045-6535/00/$ - see front matter © 1999 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.
PII: S0045-6535(99)00246-5

studies have caused problems of reproducibility and the information is always difficult to extrapolate to terrestrial ecosystems (Edwards et al., 1996). In addition, single-species animals tests mainly use decomposers (such as nematodes, earthworms and arthropods). So, the reaction to the pollutions of the largest possible number of biocenosis key-species (NRC-CNRC, 1995) should be studied to enable a more precise evaluation of the intensity and diversity of the toxic effects of the pollution.

Because of this situation and the need for relevant tests, we propose the use of land snails as metal pollution bioindicators for the assessment of the bioavailability of metals in their environment. In earlier reports we have shown that in laboratory conditions the growth of the snails is dose-dependently inhibited by cadmium in the food (Gomot, 1997). This constitutes a simple biological test to measure the sublethal toxicity of this dangerous metal. Snails collected in the vicinity of polluted zones such as near mines or automobile traffic, or where fertilisers have been used show high heavy metal concentrations in their organs (Beeby and Eaves, 1983; Hopkin, 1989; Berger and Dallinger, 1993).

Considering the methods commonly used to assess water quality by animals such as lamellibranch molluscs (used in the Mussel Watch) or fish (Goldberg, 1986; Rivière, 1998; Lafaurie, 1998) we placed young garden snails, reared in standard conditions, as 'sentinels' in enclosures on the ground in various biotopes, both contaminated and not. We used three endpoints to assay pollution: mortality, growth rates and metal bioaccumulation. The data collected give an indication of the repercussions of the pollution on these primary consumers (phyto- and saprophagous which also ingest certain quantities of soil).

2. Materials and methods

2.1. Animals

For the present study, the young garden snails (*Helix aspersa* Müller) came from a laboratory reared strain, collected in a non-polluted area near Cavaillon (France). The way they were reared has been described in earlier report (Gomot, 1994). The optimum conditions for growth are: temperature: 20 ± 2°C; photoperiod: 18 h L/ 6h D; relative humidity: 80–90%, food: meal for snails (Helixal R, Ets Lépine, Clairvaux-les-Lacs, 39130, France).

Wild snails of the same species were also collected on one of the sites (autoch TCH-b) to compare their trace elements content to that of sentinel snails.

2.2. Aim of the method

Groups of 30 young snails aged two months with an average weight of 4.6 ± 0.5 g were transferred to cages set up on the sites for which we wanted to detect the presence of pollution, and possibly assay it. The bottomless cages were square (0.5 m sides and 0.2 m high), made of rigid plastic (PVC) suitable for contact with food and had a plastic mesh (5 mm) cover which let through light, air and rain but did not allow the snails to escape. During the experiment (four weeks in June 1995), the snails received food (soil and vegetation) from the place where the cages were set up and were in contact with all the soil and vegetation pollution but also that of the rain and air.

2.3. Experimental follow-up

The parameters determined during the experiment were of two types: (i) the survival and growth of the animals and also the ratio of soft tissue to shell which can reveal biological disturbances from readily available parameters. (ii) The bioaccumulation of metals in snail organs in order to evaluate the bioavailability of the trace elements in the environment.

To be sure of the validity of the method, cages were set up in four different sites in Franche–Comté (France): one site in natural forest far from human activities (Gy, 70700; Fig. 1; batch: Trans Gy); one on grass in an urban site near a cross-roads with heavy traffic (Place Leclerc, Besançon 25030; Fig. 2; batch Trans Lecl); two on zones of the Technical Hiding Centre at Vaivre (70410; Figs. 3 and 4; batches: Trans THC-a and Trans THC-b; THC-a : active from 1975 to 1984; THC-b : active from 1990 to 1992).

2.4. Growth analysis

In order to evaluate the impact on growth, the snails were weighed on transfer to the site and then after four weeks in their cage. Mean snail weight in the different test groups and in lab-reared controls were compared. The snails were then removed from their shells and the shell, foot and viscera weighed after being fully dried in an oven at 60°C.

2.5. Metal analysis

The concentrations of cadmium, copper, lead and zinc in the foot and viscera were obtained after mineralisation of the tissues of five snails from each group and analysis by atomic absorption spectrophotometry as previously described (Gomot and Pihan, 1997). The same measurements were also made on two- and three-



Fig. 1. Cage with sentinel snails transplanted to a natural control site (Gy forest). We placed a plastic fence around the cage to prevent penetration of predators (rodents, etc.).

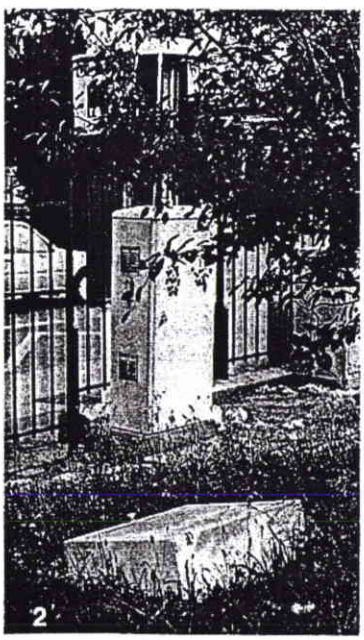


Fig. 2. Cage placed on grass in Besançon Botanical Gardens a few feet away from the device used to monitor the atmospheric lead concentration by the side of a busy road.

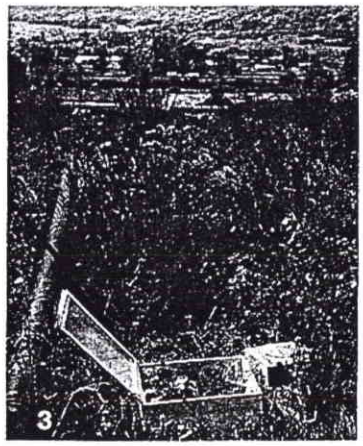


Fig. 3. Cage placed at the industrial waste disposal dump (Technical Hiding Center : THC) at Vaivre which was in operation from 1990 to 1992 with waste of classes I and II.

months-old lab-reared snails (Lab 2; Lab 3) to follow the metal concentrations in snails kept for the four test weeks in controlled conditions (comparison Lab 2/Lab 3). A PPA 60 sensor from Environment, was used to measure the ambient lead concentration in the air in the vicinity of the urban study site.

2.6. Statistical analysis

Comparisons between the average weights of the organs and the metal concentrations in the different groups were made with a non-parametric Mann–Withney U test.



Fig. 4. Close-up of the inside of the cage (THC-b) showing how the cage was held down with four wooden pegs, two pieces of terra-cotta roof tile act as shelters, vegetation is the natural spontaneous ground cover.

3. Results and discussion

3.1. Mortality

During the four weeks of the experiment, mortality was nil in the laboratory and low at the Gy Forest reference site of (10.7%). Mortality was high at the THC sites: 17.8% on THC-b and 21.4% on THC-a; 47.61% was reached near the urban site. This shows that the environmental conditions of the four sites were not equivalent for the snail survival and that the urban site was more lethal for the lab-reared animals, not adapted to polluted environments like those of the same species occuring in the yards and gardens in the town. Mortality can be considered as a first pollution alarm that can be refined by studying the impact of the environment on growth and metal bioaccumulation of the surviving individuals.

3.2. Growth

The average weights of the snails in the different groups after four weeks are shown in Table 1.

The data in Table 1 call for two main remarks. First, the snails reared in optimum conditions in the laboratory were heavier. This is due to the quality of their food and to the constant humidity which kept them in activity whereas snails outdoors had to withstand periodical drying out causing bouts of inactivity.

Concerning the animals placed as sentinels in the four plots in the same general area (at most 60 km apart) with a similar lowland climate, all continued to grow but those on the reference site, far from the urban activity (Gy forest), became significantly heavier than those transferred to the roadside site (Trans Lecl) or to industrial sites (Trans THC-a and Trans THC-b).

Shell weight was affected more in the snails on the THC sites than in those near the urban cross-roads. The weight differences of the snails overall were due to dry weight differences of the viscera and the foot and not to their water content.

These observations indicate that in situ encagement can be applied to land animals and that snails are particularly suited to this kind of test; they can continue their growth at the test site, consuming the vegetation and the soil of their new biotope. The differences can have several origins; they can result from differences in the soil composition, which is known to influence snail growth (Gomot et al., 1989; Elmslie, 1998), and/or for the type of vegetation on the site as well as the type and intensity of the pollution. The main fact is that these animals can give a global response to the environmental pollution, however complex the situation may be, and without any human intervention, because the plants continue to grow, the snail's excreta are recycled by the local flora and fauna (earthworms, arthropods, snails), i.e., the environment evolves naturally due to fact that the biocenosis is conserved.

3.3. Metal's bioaccumulation

The metal concentrations in the foot and in the viscera of the different groups are reported in Table 2 and Fig. 5.

Pairwise comparisons of these values were made and the significant differences between the groups are presented in Table 3.

Even though the same food (Helixal®) and the same environmental conditions were maintained throughout the study, the zinc and the cadmium concentrations in the viscera and the lead concentration in the foot and in the viscera decreased significantly during the third month in the lab-reared snails illustrating the utility of following a group in a controlled environment. This can be compared to the slight decrease of metal concentrations with time in growing mussels (*Mytilus edulis*) (Amiard et al., 1986) or *Mytilus galloprovincialis* (Regoli and Orlando, 1994) used as bioindicators in a marine environment.

When metal concentrations in snails transferred to Gy forest are compared with those of snails of the same age reared in the laboratory (Trans Gy/Lab 3) (Table 2), a small increase is seen in Cu in the viscera and a significant increase in Zn and Pb in both the foot and in viscera. However, contamination of the snails at this forest site was low compared to scale of contamination established from the viscera of snails from different areas (Pihan et al., 1995). The average metal content of snail viscera from the Gy site was in class I of this scale for Cd and class II for Cu, Zn and Pb whereas the Lab 3 snails were in class I for all the metals. Snails transferred to the THC (THC-b) or kept in the vicinity of the urban cross-roads, bioaccumulated high levels of Zn in the viscera: class III (300–600 mg kg^{-1}) for the urban and THC-a sites and class IV (>600 mg kg^{-1}) for THC-b. Bioaccumulation of Pb was class IV (>50 mg kg^{-1}) for THC-a, THC-b and urban site.

Compared to the control snails at Gy forest, contamination of viscera in snails at the THC and the urban square were several times higher for Pb and a little less for Zn (Table 4); for Cu and Cd, the contamination differences were low.

If the metal concentrations in the viscera of the snails transferred to the wild are compared to those of the snails reared in laboratory (Table 5) the metal contamination appear even more clearly.

Tables 4 and 5 show that if no reference unpolluted site is available, laboratory reference snails should be used. The snails transferred to the Gy forest site far from human activity did receive atmospheric pollution (from the air, rain, dust, etc.) but also elements from the pedogeochemical background. This diffuse pollution

Table 2
Concentrations of copper, cadmium, zinc and lead in the different snails groups. F: foot, V: viscera; Lab 2: two-months-old lab-reared snails; Lab 3: three-months-old snails lab-reared snails, Trans Gy: sentinel snails (four weeks at Gy forest site); Trans Lecl: sentinel snails (four weeks at cross-roads site, Place Leclerc); Trans THC: sentinel snails (four weeks at THC site); Autochthonous wild snails from THC-b

	Dry weight (mg kg^{-1})							
Groups	Cu in F	Cu in V	Zn in F	Zn in V	Cd in F	Cd in V	Pb in F	Pb in V
Lab 2	124 ± 14	83 ± 11	86 ± 8	296 ± 69	0.02 ± 0.02	0.41 ± 0.09	0.35 ± 0.33	12 ± 1
Lab 3	169 ± 51	88 ± 28	65 ± 13	120 ± 39	0.01 ± 0.01	0.25 ± 0.04	0.06 ± 0.03	5 ± 3
Trans Gy	123 ± 29	138 ± 27	90 ± 9	253 ± 71	0.02 ± 0.02	0.42 ± 0.21	0.99 ± 0.46	12 ± 3
Trans Lecl	189 ± 31	205 ± 38	103 ± 3	415 ± 114	0.03 ± 0.01	0.49 ± 0.08	1.48 ± 0.33	74 ± 24
Trans THC-a	139 ± 44	114 ± 47	87 ± 13	489 ± 82	0.02 ± 0.01	0.23 ± 0.06	1.18 ± 0.34	65 ± 14
Trans THC-b	171 ± 60	143 ± 37	101 ± 12	646 ± 157	0.02 ± 0.01	0.49 ± 0.08	1.17 ± 0.44	77 ± 13
Autochthonous THC-b	272 ± 136	201 ± 118	85 ± 30	1098 ± 256	0.14 ± 0.06	1.6 ± 0.36	1.09 ± 0.70	8 ± 5

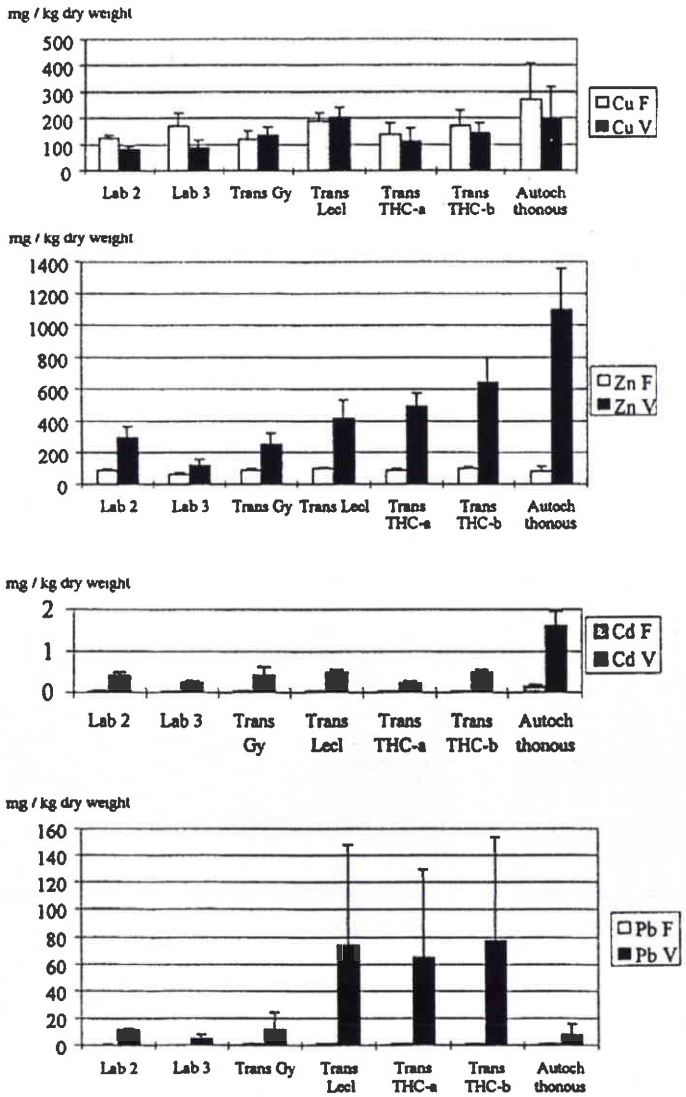


Fig. 5. Copper, zinc, cadmium and lead concentrations in the foot (F) and in the viscera (V) of snail groups.

Table 1
Average total body, shell, foot and viscera weight of 'sentinel' snails in the four tested biotopes. The controls (Lab 3) were grown in the laboratory during the same period of four weeks. Significant difference in comparison with the snails of Gy forest

Group	Total fresh weight (g)	Shell weight (g)	Shell/total (%)	Foot			Viscera		
				Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Water (%)	Fresh weight (g)	Dry weight (g)	Water (%)
Controls:	10.64	1.25	11.76	3.373	0.550	85.01	4.603	1.128	75.62
Lab 3	±1.31	±0.16	±0.93	±0.958	±0.103	±1.89	±0.455	±0.234	±3.52
Trans Gy	7.27	0.67	9.14	2.402	0.243	89.90	3.586	0.354	89.92
	± 0.78	±0.15	±1.49	±0.421	±0.047	±0.46	±0.741	±0.053	±1.74
Trans Lecl.	5.65	0.56	9.95	1.710	0.176	89.64	2.723	0.242	91.02
	±0.69*	±0.13	±2.11	±0.267**	±0.022*	±0.89	±0.838**	±0.068*	±0.74
Trans THC-a	5.27	0.45	8.68	1.859	0.167	90.93	1.982	0.185	90.63
	±0.37*	±0.06*	±1.55	±0.259**	±0.010*	±0.89	±0.162*	±0.008*	±0.51
Trans THC-b	5.54	0.47	8.47	2.095	0.183	91.15	2.000	0.196	90.19
	±0.19*	±0.03*	±0.84	±0.276	±0.013*	±1.17**	±0.111*	±0.013*	±0.69

* $P < 0.01$.
** $P < 0.05$.

Table 3
Statistical comparisons between different groups

Comparison of groups	Cu		Zn		Cd		Pb	
	Foot	Viscera	Foot	Viscera	Foot	Viscera	Foot	Viscera
Lab 2/Lab 3	0.1172	0.4647	0.0163*	0.009**	0.4189	0.0259*	0.0082**	0.009**
Lab 3/Trans Gy	0.1745	0.0283*	0.0163*	0.0163*	0.4189	0.2933	0.0082**	0.0163*
Lab 3/Trans Lecl	0.6015	0.009**	0.009**	0.009**	0.0201*	0.0088**	0.0082**	0.009**
Lab 3/Trans THC-a	0.2506	0.4647	0.0472	0.009**	0.0758	0.6654	0.0082**	0.009**
Lab 3/Trans THC-b	0.754	0.0163*	0.009**	0.009**	0.1172	0.0086**	0.0082**	0.009**
Trans Gy/Trans Lecl	0.0283*	0.0283*	0.0593	0.0472*	0.2282	0.754	0.0758	0.009**
Trans Gy/Trans THC-a	0.3472	0.3472	0.754	0.009**	0.4083	0.2073	0.4647	0.009**
Trans Gy/Trans THC-b	0.1172	0.754	0.0472*	0.009**	0.5186	0.597	0.2506	0.009**
Trans Lecl/Trans THC-a	0.0758	0.0163*	0.0163*	0.2506	0.4028	0.0088**	0.2506	0.6015
Trans Lecl/Trans THC-b	0.2506	0.0283*	0.754	0.0472*	0.1172	0.9168	0.1172	0.754
Trans THC-b/Trans THC-a	0.4647	0.3472	0.1172	0.0758	0.3173	0.0086**	0.9168	0.1172
Trans THC-b/ Autochtonous THC-b	0.2506	0.6015	0.4647	0.009**	0.009**	0.0088**	0.4647	0.009**

*Significant differences at 95%.
**Significant differences at 99%.

Table 4
Ratios of the Cu, Zn, Cd and Pb concentrations in the viscera of *Helix aspersa* of the test sites to those of the reference forest site at Gy

	THC-a/Gy	THC-b/Gy	Lecl/Gy
Cu	0.8	1	1.5
Zn	1.9	2.5	1.6
Cd	0.5	1.1	1.1
Pb	5.4	6.4	6.2

Table 5
Ratios of the Cu, Zn, Cd and Pb concentrations in the viscera of test snails to those of snails reared in the laboratory

	Gy/Lab 3	THC-a/ Lab 3	THC-b/ Lab 3	Lec/Lab 3
Cu	1.6	1.6	1.6	2.3
Zn	2.1	4	5.4	3.4
Cd	1.7	0.9	1.9	1.9
Pb	2.4	13	15.4	14.8

was not insignificant because the snails at the Gy site had over twice the concentration for Pb and Zn and about 1.6-fold for Cu and Cd. However, it is the high concentrations of Pb and Zn at the two sites characterised by human activities that are most striking. The urban roadside site, with its heavy traffic, showed high levels of Pb contamination (74 mg kg^{-1}) in the snail viscera even though the atmospheric Pb analyser gave an average values of 0.09–0.1 μg m^{-3}, respectively for the months May and June 1995. So, in spite of the fact that the ambient Pb concentration in the air at Place Leclerc was lower than the tolerated maximum (2 μg m^{-3}: maximum annual average in the European Directive), Pb pollution effect is certainly underestimated. Pb can be bioaccumulated in the food chains to induce indirect effects through different components of the environment. Physical measurements of the ambient air concentrations must be completed by epidemiological studies (Krzyzanowski, 1997) but also by the use of biological exposure indicators such as snails, which were quick to point out the presence of a risk in the present study.

Metal bioaccumulation in the sentinel snails on the two localities on the THC, showed a more higher bioavailability of Zn, Pb and Cd at site-b than at site-a where the activity had stopped since 1984. Site-b was only buried in 1992 and was near a pit which was still being filled with waste. On both sides, the topsoil used to bury the waste was colonised by self-sown vegetation but still received dust fallout from waste lorries unloading in the active part of the THC. Concerning the levels of contamination in the viscera a classification can be established for each metal.

- *Copper*: Trans Lecl > Trans THC-a, Trans THC-b, Autochthonous, Trans Gy > Lab 3.
- *Zinc*: Autochthonous > Trans THC-b, Trans THC-a > Trans Lecl > Trans Gy > Lab 3.
- *Cadmium*: Autochthonous > Trans THC-b, Trans Lecl, Trans Gy > Lab 3, Trans THC-a.
- *Lead*: Trans THC-b, Trans Lecl, Trans THC-a > Trans Gy > Autochthonous, Lab 3.

Note that the adult autochthonous wild snails of the same species but of unknown age (average weight 7.86 ± 1.79 g), collected on the THC-b site, had a very high Zn concentration in their viscera, while the Pb concentration was an order of magnitude smaller (ten times less) than that of the snails placed as sentinels on the same site for four weeks (Table 2). This is very instructive and stresses the utility of the snail as bioindi-

cator. The interpretation of these differences should take into consideration the fact that bioaccumulation is not the same for each metal and the regulation or adaptation abilities of the species. In snails, bioaccumulation of Zn must depend on the exposure time, meaning that wild snails subjected to Zn pollution throughout their lives present much higher levels than snails exposed to Zn for only four weeks. For Pb, this is a new example of the situation reported in England, on sites heavily polluted with Pb, where the snails that were used to the lead accumulated less than those from an unpolluted area (Richmond and Beeby, 1992). So, sentinel snails, naïve to all prior exposure and hence adaptation, constitute relevant and sensitive indicators. The exposure time of four weeks brings out any harmful effects and shows how bioaccumulation is modulated according to the type of pollution. It is possible that shorter exposures could be enough for bioaccumulation to be detectable and it is likely that it will be possible to detect the biomarkers (such as metallothioneins (Berger et al., 1995), detoxification enzymes, etc.) involved in the biological processes that allow the snails to resist, and sometimes to adapt to the presence heavy metals. Moreover, the methodology presented here to study heavy metal pollution is only a first step towards the detection of many other types of pollution (pesticides and fertiliser residues, HAP, etc.) which certainly affect the action of heavy metals and contribute to the mortality noted on the industrial and urban sites.

4. Conclusion

The usefulness of young garden snails as bioindicators for the detection of metal pollution at the soil, air, water, vegetation interface is demonstrated. The use of standard snails (known stage of development, weight and age) allowed the pollution to be studied through the modification of two sets of complementary parameters: biological parameters (overall growth and relative weight of the organs) and chemical parameters (metal bioaccumulation).

The metal concentrations in the different snail test groups showed that snails accumulate certain metals (Zn, Pb and Cd) and that this bioaccumulation occurs more in the viscera than in the foot, underlining the utility of analysing foot and viscera separately. In the viscera, metal concentrations were two-fold higher for Pb and Zn and 1.6-fold higher for Cu and Cd illustrating the greater suitability of the viscera to reveal the bioavailability of metals in the environment. Moreover, risks for predators can be more accurately determined when it is known whether they eat the whole snail (man, blackbirds, thrush, hedgehog, etc.) or only the viscera (dormouse).

Statistical comparison of the metal concentrations in the tissues of the different snail groups (Table 3) demonstrates numerous differences indicating the sensitivity of the method and the diversity of the contamination from site to site.

Berger and Dallinger (1993) established a three-level system to classify contamination intensity using the species *Arianta arbustorum*; our results are expressed using their system in Table 6.

The use of homogenous groups of lab-reared animals avoids the variability of wild populations. The metal bioaccumulation properties of these populations were known (Coughtrey and Martin, 1976) but the relationship between the metal concentration in the body and the animals' weight is not a meaningful criterion because local variations occur in growth rate so wild snails of a same weight may present large age differences (Coughtrey and Martin, 1977).

Table 6
Classification of the different plots using the contamination scale of Berger and Dallinger (1993)

	Class 1: *Controls*	Class 2: *Traffic and cities*	Class 3: *Smelters and mines*
Lead	Lab 3	Trans Lecl	
	Autochthonous THC-b	Trans THC-b	
	Trans Gy	Trans THC-a	
Copper		Trans Gy	
		Autochtonous THC-b	
	Lab 3	Trans THC-b	
		Trans THC-c	
		Trans Lecl	
Zinc		Trans Gy	Trans THC-b
	Lab 3	Trans Lecl	
		Trans THC-a	Autochthonous THC-b
Cadmium	All groups		

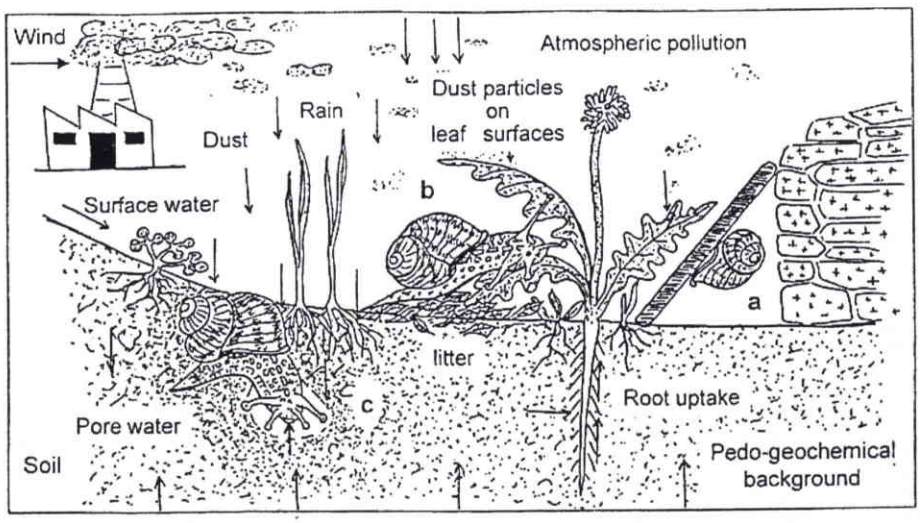


Fig. 6. Possible routes of direct and indirect exposure of land snails to contaminants: (a) contamination by breathing air; (b) contamination at soil surface by eating plants, soil contact, breathing air, rain and surface water contact; (c) contamination in the soil by swallowing soil particles, soil contact and interstitial air and pore water.

The system of sentinel snails provide a homogenous biological alarm which is easy to use and which accounts for the overall consequences of their exposure to a polluted environment (soil, air, water, vegetation). In fact, they express contamination as a whole through ingestion of polluted food such as live plants, plant debris, microorganisms, soil, water but also through cutaneous contact (foot and tegument covered by mucus) and from the polluted air they breathe (Fig. 6). Our primary aim was not to study the different routes of exposure but to estimate the overall intake of trace element so as to assess their toxic effects.

Used as sentinels, snails are representative primary consumers in a terrestrial ecosystem (Naeem et al., 1994) and should be studied to assess the transfer of pollutants from soil and producers to the next trophic levels.

The fact that snails are easy to rear, their size, handlability, and wide geographical distribution in diverse terrestrial ecosystems make these invertebrates key indicator species to evaluate the potential environmental impact of chemicals reaching the land. The proposed model satisfies all the recommendations for the development of testing strategies and procedures for effect assessments of chemicals in the terrestrial environment (Samsøe-Petersen and Pedersen, 1995).

Acknowledgements

This work was supported by the ADEME (Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie) contract no. 9693019.

References

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Métayer, C., 1986. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. I Field Study. Mar. Biol. 90, 425–431.

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

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

Berger, B., Dallinger, R., Thomaser, A., 1995. Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods. Environ. Toxicol. Chem. 14, 781–791.

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.

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

Elmslie, L., 1998. Humic acid: a growth factor for *Helix aspersa* Müller (Gastropoda: Pulmonata). J. Moll. Stud. 64, 400–401.

Goldberg, E.D., 1986. The mussel watch concept. Environ. Monit Assess. 7, 91–103.

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 neuroendocrine, Thesis, Université de Franche Comté, No. 398.

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

Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., Bruckert, S., 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of the absorption route for the stimulating factors. J. Moll. Stud. 55, 1–8.

Hopkin, S.P. (Ed.), 1989. Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invertebrates, 366. Elsevier, New York.

ISO/DIS 112 68-1, 1994. Soil quality: Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 1. Determination of acute toxicity using artificial soil substrats. International Standardisation Organisation.

ISO/DIS 112 68-2, 1994. Soil quality: Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2. Method for the determination of effects on reproduction. International Standardisation Organisation.

ISO/TC 190 SC_4 WG, 1994. Soil quality: Effects of soils pollutants on collembola (*Folsomia candida*). Method for the determination of effects on reproduction. International Standardisation Organisation.

Keddy, C., Greene, J.C., Bonnel, M.A., 1994. A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment, and freshwater in Canada, p 139. Etude No. 198, Série Scientifique, Environnement Canada, Ottawa, Ontario.

Krzyzanowski, M., 1997. Methods for assessing the extent of exposure and effects of air pollution. Occup. Environ. Med. 54, 145–151.

Lafaurie, M., 1998. Biomarqueurs: les pollutions sous surveillance. Biofutur 179, 79–81.

Naeem, S., Thompson, L.J., Lawler, S.P., Lawton, J.H., Woodfin, R.M., 1994. Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. Nature 368, 734–737.

NRC-CNRC, 1995.Toxicity testing applied to soil ecotoxicology, *Workshop Proceedings*, p 36 Montréal Quebec (28–29 November 1995).

Pihan, J.C., Morhain, E., Promeyrat, S., Pihan, F., 1995. Contamination métallique des escargots d' élevage et de la nature. Proposition de grilles de qualité (Cu, Zn, Fe, Mn, Cr, Pb). Journée Nationale Hélicicole, ITAVI-GNPE, Lyon (6 February 1995).

Regoli, F., Orlando, E., 1994. Seasonal variation of trace metal concentrations in the digestive gland of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis*: Comparison betwen a polluted and a non-polluted site. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 27, 36–43.

Richmond, L., Beeby, A., 1992. A comparative study of lead uptake by three populations of the snails *Helix aspersa* Müller. Polish J. Environ. Stud. 1, 9–13.

Rivière, J.L. (Ed.), 1998. Evaluation du risque écologique des sols pollués, 230. Tec. & Doc, Lavoisier, Paris.

Samsoe-Petersen, L., Pedersen, F., 1995. Development of guidance for terrestrial effects assessment. Arch Toxicol. Suppl. 17, 406–419.

IV.4. Biosurveillance en environnement industriel. Application de la bioindication par les gastéropodes sur un site sidérurgique (pour des raisons de confidentialité, la société n'est pas nommée ni localisée) et la friche industrielle associée

IV.4.1. Introduction

Le choix d'un site industriel comme celui d'une aciérie s'est imposé en raison de l'importance que ce type d'industrie a jouée durant tout le 19ème siècle et au début du 20ème siècle dans la région Lorraine. L'économie reposait en grande partie sur cette industrie. Ce type d'activité étant très polluant, la pollution persiste dans les sols après la fermeture de nombreux sites. La remédiation est en cours et nécessite, entre autres, la mise en œuvre de procédés de diagnostic du niveau de contamination.

Le site sidérurgique choisi a été ouvert le 1er mars 1872. Il a, par le passé, été le lieu d'implantation de hauts fourneaux et d'une cokerie. La société, après de nombreuses évolutions, fabrique actuellement du fil pour treillis soudés et du fil crénelé qui entre dans la fabrication de panneaux de treillis soudés, de pièces de différentes formes pour l'ancrage et le scellement dans le béton dans les domaines de la construction, du transport, de l'adduction et du stockage.

L'originalité de l'organisation de cette industrie tient dans la séparation marquée en deux unités : l'aciérie et le train continu à fil. Chacune de ces deux unités peut-être considérée comme une entité à part entière ; elles sont néanmoins liées car c'est la production de billettes de l'Aciérie qui devient matière première du train à fil.

L'usine se compose de plusieurs outils : le parc à ferrailles, le four électrique, le traitement en poche, la coulée continue de l'aciérie et le train continu à fil.

IV.4.2. Caractérisation des rejets atmosphériques de l'aciérie

Tableau 42 : Teneurs en métaux dans les poussières de l'aciérie (four électrique)

Métaux	Analyses durant l'étude (g/kg)	Moyenne 1996 (g/kg)
Zinc	351	340,86
Fer	215	210,26
Plomb	52	50,11
Manganèse	19	15,78
Chrome	3,5	2,78
Cuivre	2,8	2,48
Cadmium	0,64	0,52
Nickel	0,24	0,24
Arsenic		0,02
Total	***644,18***	***623,05***

Les poussières, récoltées sur les électrofiltres, sont stockées dans des alvéoles sur le crassier ou parc à cendres. Les métaux les plus abondants sont le zinc, le fer et le plomb. Le manganèse, le chrome et le cuivre sont significativement présents alors que le cadmium et le nickel sont à l'état de traces. D'autres poussières, provenant du parc à réfractaires, sont issues de la destruction des réfractaires et sont constituées d'alumine, de magnésie et de dolomie.

IV.4.3. Liste des stations et localisation

Sept stations ont été choisies (figure 75 et planches III_5 à III_8) en fonction de la connaissance de l'occupation ancienne ou récente du site industriel. :

- St_1 : Bordure ouest du four électrique sur ancienne plate-forme de hauts fourneaux (planche III_5, figure 1)
- St_2 : Bordure nord du four électrique sur ancienne zone d'épandage de boues près du parc à réfractaires (planche III_5, figures 2 et 3) et de la coulée continue
- St_3 : Bordure sud du four électrique, à proximité de l'unité de traitement des poussières du four électrique (planche III_6, figure 2)
- St_{4a} : Bordure ouest du train continu à fil, à proximité de la voie de passage (planche III_6, figure 1)
- St_{4b} : Bordure ouest du train continu à fil, mais en situation plus centrale sur la friche de l'ancien laminoir
- St_5 : Bordure nord du train continu à fil, ancienne plate-forme de la cokerie (planche III_5, figure 4 ; planche III_6, figure 3)
- St_6 : Parc à cendres
  - $St_{6.0}$: surface d'une ancienne alvéole (alvéole A), non recouverte (planche III_8, figure 1)
  - $St_{6.1}$: Ancienne zone d'épandage des boues (planche III_7, figure 1)
  - $St_{6.2}$: Talus d'une alvéole récente recouverte (alvéole B) (planche III_7, figure 2 ; planche III_8, figure 2)
  - $St_{6.3}$: Bordure d'une ancienne alvéole (alvéole A) (planche III_7, figure 3)
- St_7 : jardins ouvriers à proximité et en dénivellation par rapport au parc à cendres (planche III_8, figure 3)

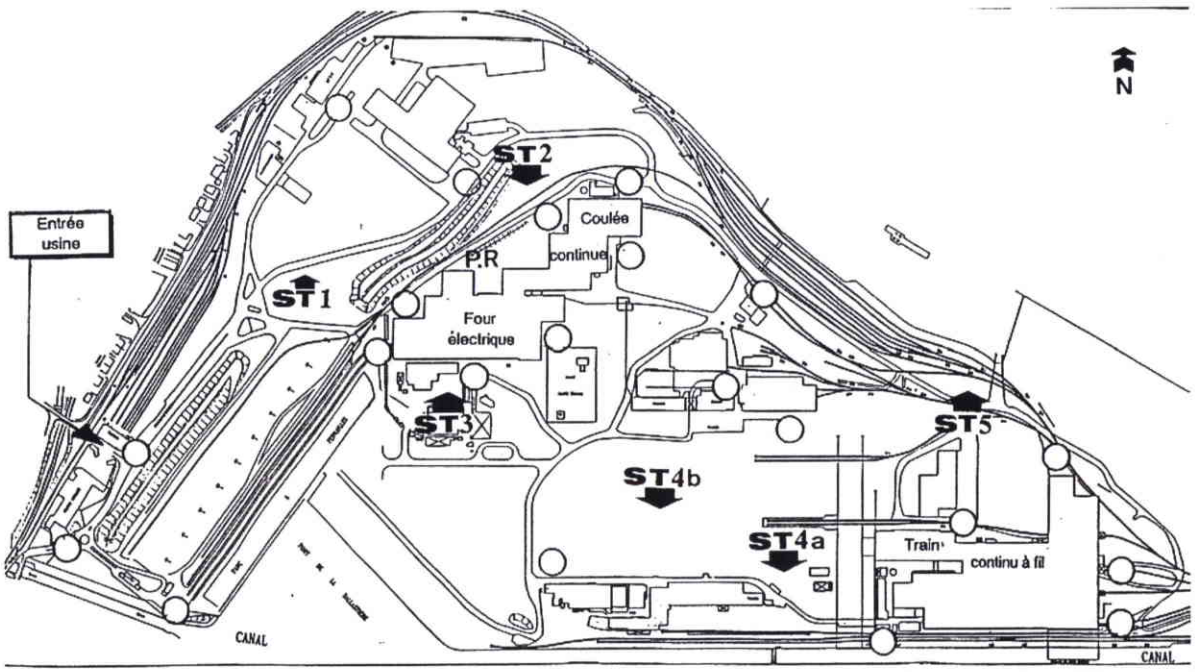


Figure 75a : Plan de l'aciérie et localisation des 5 stations proches des activités de production. PR : parc à réfractaires

Nota : les stations St_6 et St_7 se situent sur et à proximité du parc à cendres non figuré (Cf. planches III_7 et III_8).

IV.4.4. Réalisation des transferts de *Helix aspersa aspersa* et récoltes d'individus autochtones

Une première campagne s'est déroulée du 25/09/97 au 13/10/97 avec transfert, soit d'animaux (*Helix aspersa aspersa*) provenant d'un élevage en conditions contrôlées (lot T_1), soit d'animaux (*Helix aspersa aspersa*) provenant de la même zone géographique considérés comme référence (lots T_2 et T_3). Des cages ont été installées aux stations 1, 2, 3, 4a, 5 et 6.0. Lors de leur retrait, les jardins ouvriers situés en aval du parc à cendres ont été prospectés afin de récolter des individus autochtones (St_7).

Le nombre d'individus témoins analysés ainsi que le nombre d'individus récoltés en fin d'expérience est indiqué dans le tableau 43 :

Tableau 43 : Désignation des lots du site aciérie avec, entre parenthèse, l'origine des individus (E : élevage ; tr : transféré ; A : autochtone), le nombre d'individus et l'espèce (Ha.a. : *Helix aspersa aspersa* ; H.p. : *Helix pomatia* : C.n. : *Cepaea nemoralis*)

Date de prélèvements	Lots	Nombre d'individus	Espèces
25/09/97	T_1 (E)	5 adultes	H.a.a.
25/09/97	T_2 (A) T_3 (A)	1 adulte 5 jeunes	H.a.a.
25/06/98	T_4 (E)	5 adultes	H.a.a.
13/10/97	St_1 (T_2, T_3, tr)	5 adultes	H.a.a.
13/10/97	$St_{1'}$ (T_1, tr)	5 adultes	H.a.a.
13/10/97	*St_2 (T_1, tr)*	*Cage disparue (prélèvement d'autochtones) H.a.a.*	
13/10/97	St_{2a} (A)	5 adultes	H.a.a.
13/10/97	$St_{2'}$ (A)	5 adultes	C.n.
13/07/98	St_{2b} (T_4, tr)	5 adultes	H.a.a.
13/10/97	St_3 (T_1, tr)	5 adultes	H.a.a.
13/10/97	*St_{4a} (tr)*	*Cage disparue (prélèvement d'autochtones) H.a.a.*	
13/10/97	St_{4a} (A)	1 adulte	H.a.a.
13/07/98	St_{4b} (T_4, tr)	5 adultes	H.a.a.
13/10/97	St_5 (A)	2 adultes	C.n.
13/10/97	$St_{5'}$ (T_1, tr)	5 adultes	H.a.a.
13/10/97	$St_{6.0}$ (T_1, tr)	2 escargots	H.a.a.
13/10/97	$St_{6'.0}$ (T_2, T_3, tr)	2 escargots	H.a.a.
13/07/98	$St_{6.1}$ (T_4, t_r)	5 escargots	H.a.a.
13/07/98	$St_{6.2}$ (T_4, t_r)	5 escargots	H.a.a.
13/07/98	$St_{6.3}$ (T_4, t_r)	5 escargots	H.a.a. (comparé avec 6.0 et 6'.0)
13/10/97	St_7 (A)	2 escargots	H.p.
13/10/97	$St_{7'}$ (A)	5 escargots	C.n.

Une deuxième campagne s'est déroulée du 25 juin au 13 juillet 1998 avec un prélèvement de témoins (T_4) dans l'élevage et la mise en place de cages aux stations 2b (poussières de réfractaires et ancienne zone d'épandage de boues de coulée continue), 4b (nouvel emplacement à l'ouest du train continu à fil) et 6.1, 6.2 et 6.3 au niveau du parc à cendres.

La station 6.0, qui était en surface de l'alvéole A, a été déplacée en 6.3, à proximité des dépôts, mais en fait sur le remblai végétalisé, à proximité d'un bosquet de Renouée du Japon.

IV.4.5. Résultats

IV.4.5.1. Contamination par le zinc

IV.4.5.1.1. *Helix aspersa aspersa* : *Classement des stations par référence à la grille établie au chapitre I et nouvelle proposition*

Le tableau 44 et la figure 75 A donnent le classement des différents lots dans l'ordre croissant de contamination en retenant la concentration moyenne en zinc. Les individus transférés appartenant au lot T_4 à t_0 (classe I) présentent une augmentation significative de la concentration moyenne en zinc pour toutes les stations sauf le lot St_{4b} qui présente une augmentation non significative

Tableau 44 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le zinc ; a classes proposées au chapitre I et b, nouvelle proposition.

Lots	a :Classe	Regroupement par classe	Concentration en zinc (mg/kg de MS)
T_4	I	I	$Zn \leq 150$
St_{4b}	II	II	$150 < Zn \leq 300$
St_{2b}	II		
St_{4a}	III	III	$300 < Zn \leq 600$
T_3	III		
T_1	III		
St_1	III		
$St_{5'}$	IV	IV	$600 < Zn \leq 1.200$
St_{2a}	IV		
St_3	IV		
$St_{1'}$	IV		
$St_{6.3}$	IV	V b	Nouvelle proposition (classe V) si [Zn] > 1.200
$St_{6.2}$	IV		
$St_{6'.0}$	IV		
$St_{6.0}$	IV		
$St_{6.1}$	IV		

Les différentes stations du site relèvent des classes II à IV de la grille établie au chapitre I avec la mise en évidence d'une contamination plus élevée au niveau du parc à cendres (St_6). Il est fondé de proposer une cinquième classe de contamination par le zinc lorsque la concentration moyenne en zinc dépasse 1.200 mg/kg de MS.

C'est le lot transféré sur les boues de coulée continue qui présente la concentration moyenne significativement la plus élevée en zinc ($St_{6.1}$). Les lots en présence des poussières d'aciérie ($St_{6.0}$, $St_{6'.0}$, $St_{6.2}$ et $St_{6.3}$) présentent une concentration moyenne moindre mais toujours supérieure à 1.200 mg/kg de MS et significativement supérieure à celle des autres stations mis à part $St_{1'}$.

Les lots $St_{1'}$, St_3 et $St_{5'}$ relèvent de la classe IV, sans cependant de différences significatives avec le lot d'origine T_1 (classe III). Il y a une contamination assez générale du site de l'usine par le zinc. Le niveau de contamination des individus, au début du transfert, influence le niveau final de contamination après transfert. C'est ainsi que les individus du lot d'élevage T_1 présentant une concentration moyenne en zinc supérieure à celle du lot de référence T_3 donnent lieu, après transfert, à une concentration en zinc dans le lot $St_{1'}$ supérieure à celle du lot St_1 dont les individus proviennent du lot T_3 ; les différences ne sont cependant pas significatives. Le lot autochtone St_{2a} relève de la classe IV et renforce le diagnostic de contamination.

Ce sont les lots St_{4b} et St_{2b} qui, pour le site, sont les moins contaminés avec, toutefois, un changement de classe par rapport à leur lot d'origine T_4 (classe II au lieu de classe I) avec une différence significative pour St_{2b} et non significative pour St_{4b}.

Le secteur de friche, correspondant à la station St_4, se situant plus loin de la zone d'activité de l'aciérie, apparaît ainsi comme moins contaminé. Ce jugement est renforcé par l'étude d'individus d'*Helix aspersa aspersa* autochtones. En effet, le lot St_{2a} (classe IV) récolté prés de l'usine est, par exemple, plus contaminé que l'individu de St_{4a} (classe III).

Planche III_{6a} : Site sidérurgique. Unités de production.

Figure 1 : Emplacement du microcosme en station 1 (St_1)

Bordure ouest du four électrique sur l'ancienne plate-forme de hauts fourneaux. En perspective, vue sur le pont roulant du parc à ferrailles (livraison par voie ferrée et voie d'eau). Les wagons passent sous un portique de détection de radioactivité.

Figure 2 : Emplacement du microcosme en station 2 (St_2)

Bordure nord du four électrique sur une ancienne zone d'épandage de boues de coulée continue. Zone végétalisée et plantée.

Figure 3 : Vue du parc à réfractaires à partir de la station 2

Environnement très empoussiéré.

Figure 4 : Emplacement du microcosme en station 5 (St_5)

Bordure nord du train continu à fil et des parcs de stockage avant expédition, sur une ancienne plate-forme de cokerie.

Planche III_{6a}

1



2





3



4

Planche III_{6b} : Site sidérurgique. Unité de production.

Figure 1 : Emplacement du microcosme en station 4 (St_4)

Bordure ouest du train continu à fil et sur la friche de l'ancien laminoir.

Figure 2 : Emplacement du microcosme en station 3 (St_3)

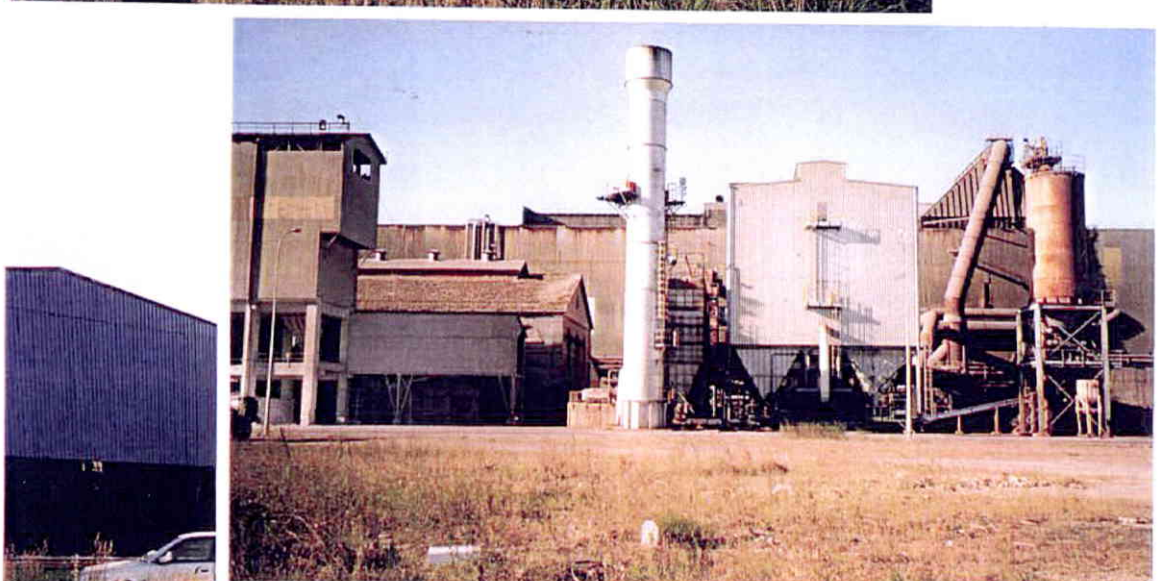
Bordure sud du four électrique et à proximité de l'unité de traitement des poussières de celui-ci.

Figure 3 : Vue rapprochée de l'emplacement de la station 5 (St_5) en zone végétalisée

Planche III$_{6b}$



1



2



3

Planche III_7 : Site sidérurgique. Parc à cendres.

Figure 1 : Emplacement du microcosme en station 6.1 ($St_{6.1}$)

Cuvette ayant reçu l'épandage récent de boues de coulée continue. Remarquez la présence de fente de dessication et la couleur noire des boues. La végétalisation est en cours.

Figure 2 : Emplacement du microcosme en station 6.2 ($St_{6.2}$)

Au pied du talus de l'alvéole B récente, recouverte et végétalisée (voir aussi planche III_8, figure 2). Remarquez l'érosion du talus par le ruissellement.

Figure 3 : Emplacement du microcosme en station 6.3 ($St_{6.3}$)

Sur le merlon de l'alvéole ancienne A, non recouverte ni végétalisée. La cage est implantée à proximité d'un bouquet de Renouée du Japon. Flèche blanche : emplacement du microcosme $St_{6.0}$ lors d'une expérience antérieure. Notez la couleur rouille foncée des dépôts. (voir également la planche III_8)

Planche III$_7$



1



3



2

Planche III_8 : Site sidérurgique. Parc à cendres.

Figure 1 : Vue panoramique de 3 alvéoles

- Alvéole A : ancienne non recouverte et non végétalisée
  - ❖ Flèche blanche : emplacement du microcosme $St_{6.0}$
  - ❖ Flèche noire : emplacement du microcosme $St_{6.3}$ (*Cf.* photo planche III_7, figure 3)
- Alvéole B : alvéole comblée, recouverte et végétalisée
  - ❖ Flèche noire : emplacement du microcosme $St_{6.2}$ (*Cf.* planche III_7, figure 2)
- Alvéole C : alvéole en cours d'exploitation et étanchéifiée.

Figure 2 : Vue à partir de la station 6.1 ($St_{6.1}$)

Flèche noire : emplacement du microcosme en $St_{6.2}$. La végétation ne se développe pas rapidement en surface de l'alvéole B.

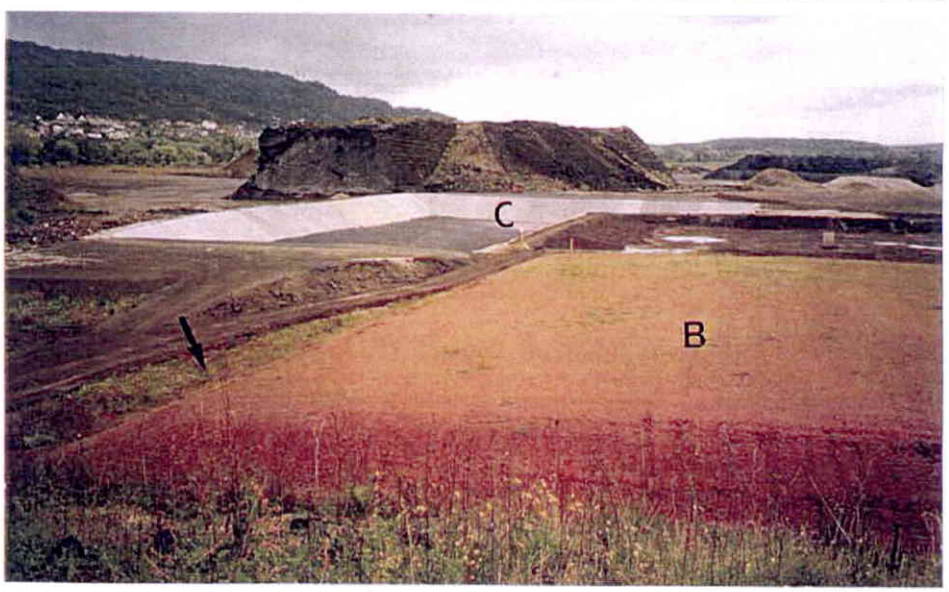
Figure 3 : vue panoramique des jardins ouvriers situés en dessous du parc à cendres entre ceux-ci et une rivière.

Flèche noire : emplacement de la récolte des individus autochtones de *Cepaea nemoralis* et *Helix pomatia*.

Planche III$_8$



1



2



3

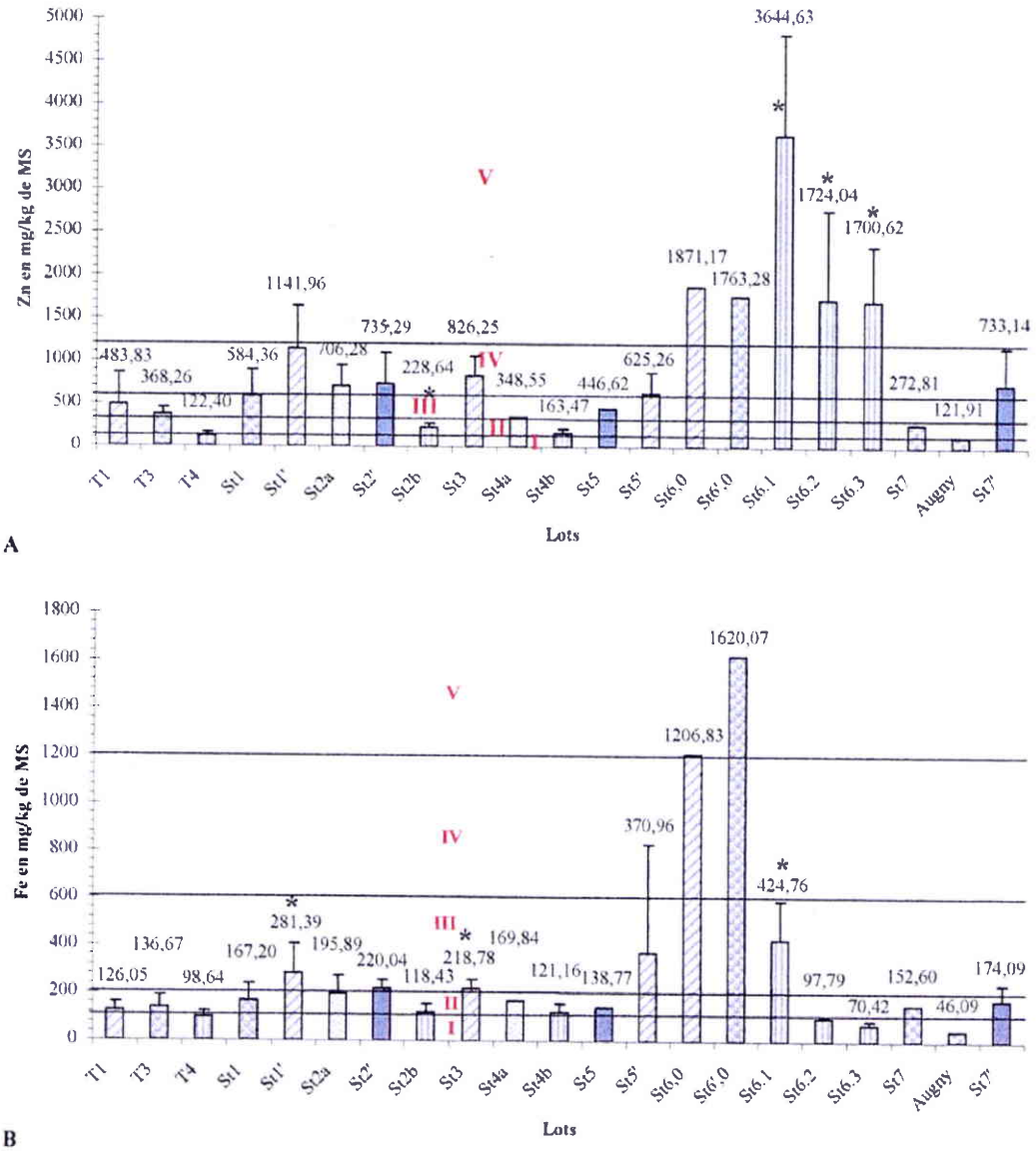


Figure 75b : Concentrations en métaux dans les différents lots d'escargots autochtones ou transférés (A : Zn, B : Fe, C : Pb, D : Mn, E : Cr, F : Cu, G : Cd, H : Ni) ; *différence significative avec le lot d'origine

IV.4.5.1.2. Autres espèces (autochtones)

a. *Cepaea nemoralis*

Les individus de cette espèce, récoltés en station St_2 (lot $St_{2'}$), présentent une concentration moyenne en zinc non significativement différente de celle des individus autochtones d'*Helix aspersa aspersa* du lot St_{2a} et relèvent de la classe IV.

Le lot St_5 appartient à la classe III sans différence significative avec le lot d'*Helix aspersa aspersa* $St_{5'}$ classé en classe IV du fait d'une concentration moyenne supérieure.

Le lot $St_{7'}$ des jardins ouvriers présente une concentration moyenne sans différence significative avec le lot $St_{2'}$ et appartient comme celui-ci à la classe IV alors qu'il est éloigné du site industriel de production mais proche du parc à cendres.

b. *Helix pomatia*

Les deux individus récoltés dans les jardins ouvriers (lot St_7) présentent une concentration moyenne en zinc inférieure à celle des individus de l'espèce *Cepaea nemoralis* (lot $St_{7'}$) et relèvent de la classe II. Par contre, par rapport à une référence régionale de la même espèce (lot d'*Helix pomatia* Augny) qui se situe en classe I, il y a une tendance à la contamination. Le petit nombre d'individus du lot St_7 ne permet cependant pas de se prononcer sur la significativité des différences.

IV.4.5.1.3. Conclusion sur le niveau de contamination par le zinc

La prise en compte de toutes les données obtenues à partir des individus d'*Helix aspersa aspersa* transférés et des individus autochtones des trois espèces permet d'établir un classement progressif de contamination croissante par le zinc selon l'ordre :

$T_4 < St_4(4a) < T_1$ et $T_3 < St_5(5'), St_2(2a), St_7(7')$ et $St_3 < St_1(1') < St_{6.3}, St_{6.2}$ et $St_{6.0} < St_{6.1}$

| I | III | IV | V |

L'espèce *Cepaea nemoralis* peut être utilisée en appliquant la grille établie pour *Helix aspersa aspersa*. Le nombre d'*Helix pomatia* récolté est insuffisant pour conclure, en ce qui concerne ce site, sur l'application de la même grille mais les données obtenues peuvent être comparées à celles d'un lot de référence en milieu naturel avec indication d'une tendance.

IV.4.5.2. Contamination par le fer

IV.4.5.2.1. *Helix aspersa aspersa. Classement par référence à la grille établie au chapitre I et nouvelle proposition*

Le tableau 45 et la figure 75 B donne le classement des différents lots dans l'ordre croissant de contamination en retenant la concentration moyenne en fer. Les individus transférés issus des lots T_4 à t_0 (classe I) présentent une évolution différente selon les stations avec une plus grande diversification de la réponse vis à vis du fer par rapport au zinc.

Tableau 45 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le fer ; a classes proposées au chapitre I ; b nouvelle proposition.

Lots	a :Classe	Regroupement par classe	Concentration en fer (mg/kg de MS)
$St_{6.3}$	I	I	Fe ≤ 100
T_4	I		
$St_{6.2}$	I		
St_{2b}	II	II	100 < Fe ≤ 200
St_{4b}	II		
T_1	II		
T_3	II		
St_1	II		
St_{4a}	II		
St_{2a}	II		
St_3	III	III	200 < Fe ≤ 600
$St_{1'}$	III		
$St_{5'}$	III		
$St_{6.1}$	III		
$St_{6.0}$	IV	V b	Classe IV si 600 < Fe ≤ 1.200 et nouvelle proposition Classe V si [Fe] > 1.200
$St_{6'.0}$	IV		

Les différentes stations du site relèvent des classes I à IV de la grille établie au chapitre I avec la mise en évidence d'une tendance à une contamination plus élevée au niveau de la surface du parc à cendres A ($St_{6.0}$ et $St_{6'.0}$). De même que pour le zinc, il est fondé de proposer une cinquième classe de contamination lorsque la concentration moyenne en fer dépasse 1.200 mg/kg de MS.

Les autres lots du parc à cendres montrent un niveau de contamination très variable en fonction des stations : le lot $St_{6.1}$, transféré sur les boues de coulée continue, relève de la classe III avec une augmentation significative par rapport au lot d'origine T_4, par contre, les lots $St_{6.2}$ et $St_{6.3}$ ne présentent aucune contamination par le fer par rapport au même lot d'origine. Ces lots sont situés au pied ou sur les remblais d'alvéoles récentes ou anciennes. La pollution atmosphérique, avec dépôts de poussières chargées en fer, est présente, mais il n'y a pas biodisponibilité vis-à-vis de l'escargot pour le temps d'exposition choisi (1 mois).

Sur le site de l'aciérie, certains lots des stations St_1, St_3 et St_5 (lots $St_{1'}$, St_3 et $St_{5'}$) relèvent nettement de la classe III avec une augmentation significative pour $St_{1'}$ et St_3 par rapport aux individus d'élevage T_1 qui relèvent de la classe II et dont ils sont issus. Tous ces lots classés en III ne présentent aucune différence significative entre eux.

L'origine des animaux transférés influe sur le classement. La concentration moyenne du lot St_1 augmente par rapport à celle des individus de provenance (T_3) mais reste en classe II sans différence significative. Ceci met en évidence l'importance de l'obtention d'individus de référence en élevage contrôlé ayant un indice de contamination le plus faible possible.

Les lots de la station St_2 présentent également une contamination par le fer avec, pour le lot St_{2b}, une appartenance à la classe II mais sans différence significative avec les individus d'élevage (T_4) qui relèvent de la classe I. Cette appartenance de la station St_2 à la classe II est cependant renforcée par le fait que les individus autochtones (St_{2a}) présentent une concentration moyenne à la limite de la classe III et significativement supérieure à celle des individus T_4. Le facteur temps d'exposition intervient dans le niveau de bioaccumulation.

Les lots de la station St_4 (lots St_{4a} et St_{4b}) relèvent également de la classe II avec, pour l'individu autochtone (St_{4a}), une concentration moyenne relevant du milieu de gamme de concentration de la classe II. Malgré l'augmentation de la concentration moyenne en fer, il n'y a pas de différence significative entre le lot St_{4b} et le lot T_4 dont il est issu. La friche de la

station St_4 se révèle ainsi, comme pour le zinc, la station du site de l'aciérie la moins contaminée par le fer.

IV.4.5.2.2. Autres espèces (autochtones)

a. *Cepaea nemoralis*

Les individus de cette espèce, récoltés en station St_2 (lot $St_{2'}$), présentent une concentration moyenne en fer relevant de la classe III ce qui renforce l'interprétation basée sur l'étude du lot d'*Helix aspersa aspersa* (St_{2a}) autochtones et selon laquelle la station St_2 relève d'une classification limite entre la classe II et la classe III sans différence significative entre les deux lots de deux espèces différentes.

Le lot St_5 relève de la classe II et sa concentration en fer est comprise dans l'écart type important de la moyenne du lot $St_{5'}$ classé en III. Le nombre d'individus ne permet pas de conclure sur la significativité de la différence.

Le lot $St_{7'}$, des jardins ouvriers, présente une contamination moyenne relevant de la classe II sans différence significative avec le lot $St_{2'}$.

b. *Helix pomatia*

Les deux individus d'*Helix pomatia*, récoltés dans les jardins ouvriers, présentent une concentration moyenne en fer relevant de la classe II et supérieure à celle du lot de référence (Augny) qui relève de la classe I mais la différence n'est pas significative.

IV.4.5.2.3. Conclusion sur le niveau de contamination par le fer

La prise en compte de toutes les données obtenues, à partir des individus d'*Helix aspersa aspersa* transférés et des individus autochtones des trois espèces, permet d'établir un classement progressif de contamination croissante pour le fer selon l'ordre :

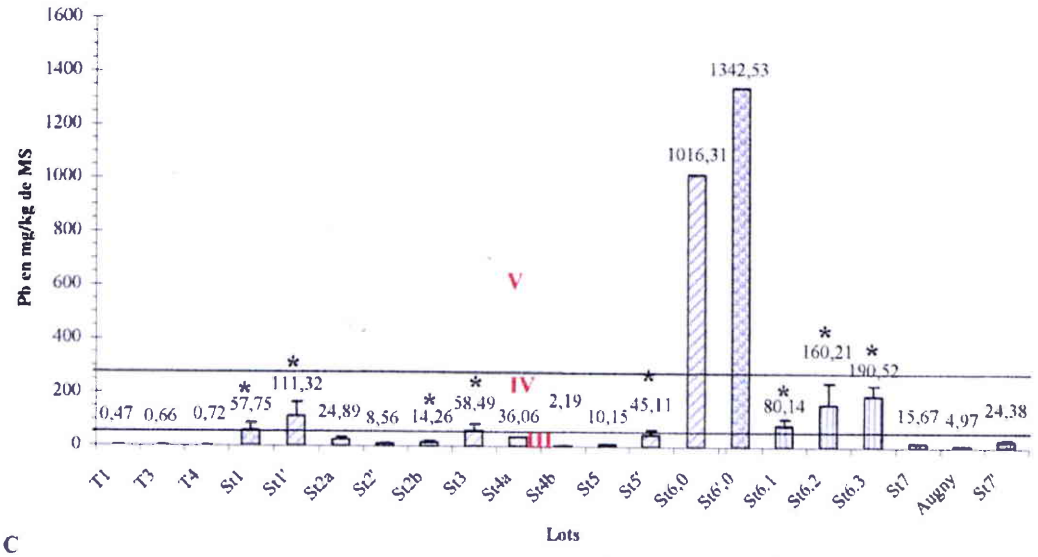
$$\underset{\text{I}}{T_4,\ St_{6.3} \text{ et } St_{6.2}} < \underset{\text{II}}{T_1,\ T_3,\ St_4 \text{ et } St_7(7') < St_2(2a)} < \underset{\text{III}}{St_3 < St_1(1') < St_5(5')} < \underset{\text{V}}{St_{6.1} < St_{6.0}}$$

La comparaison, en une même station, du niveau de contamination par le fer des individus autochtones et des individus transférés pendant 1 mois met en évidence qu'une tendance peut être détectée mais que la significativité ne peut être démontrée que chez les autochtones ayant un temps de présence sur le site très supérieur à celui des transférés. Par ailleurs, le biotope prospecté par les individus autochtones est nettement supérieur en surface à celui du microcosme.

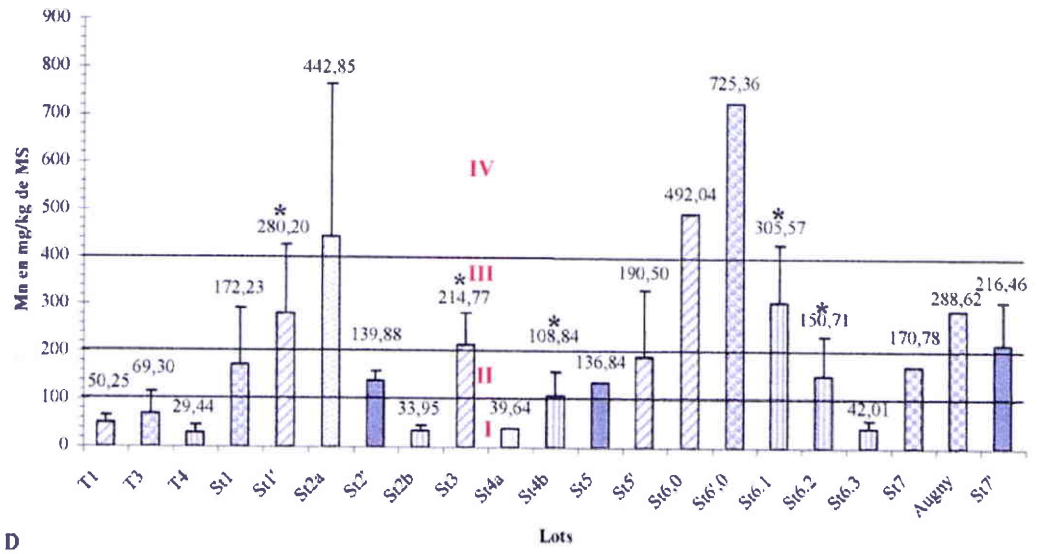
IV.4.5.3.Contamination par le plomb

IV.5.3.1. Helix aspersa aspersa. Classement par référence à la grille établie au chapitre I et nouvelle proposition

Le tableau 46 et la figure 75 C donnent le classement des différents lots dans l'ordre croissant de contamination en retenant la concentration moyenne en plomb.



C



D

Figure 75b (suite) : Concentrations en métaux dans les différents lots d'escargots autochtones ou transférés (A : Zn, B : Fe, C : Pb, D : Mn, E : Cr, F : Cu, G : Cd, H : Ni) ; *différence significative avec le lot d'origine

Tableau 46 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le plomb ; a classes proposées au chapitre I ; b nouvelle proposition.

Lots	a :Classe	Regroupement par classe	Concentration en plomb (mg/kg de MS)
T_1	I	I	Pb ≤ 5
T_3	I		
T_4	I		
St_{4b}	I		
	II	II	5 < Pb ≤ 10
St_{2b}	III	III	10 < Pb ≤ 50
St_{2a}	III		
St_{4a}	III		
$St_{5'}$	III		
St_1	IV	IV	50 < Pb ≤ 250
St_3	IV		
$St_{6.1}$	IV		
$St_{1'}$	IV		
$St_{6.2}$	IV		
$St_{6.3}$	IV		
$St_{6.0}$	IV	V b	Nouvelle proposition Classe V si Pb > 250
$St_{6'.0}$	IV		

Les différentes stations du site relèvent des classes I à IV avec la mise en évidence d'une contamination nettement plus élevée au niveau de la surface du parc à cendres A ($St_{6.0}$ et $St_{6'.0}$). En fonction de cette contamination, une cinquième classe de contamination (classe V) est proposée lorsque la concentration moyenne en plomb dépasse 250 mg/kg de MS.

Les autres lots du parc à cendres montrent un niveau de contamination élevé de classe IV, significativement supérieure à celle du lot de provenance T_4, avec une augmentation significative de la concentration moyenne en plomb entre le lot $St_{6.1}$ et les lots $St_{6.2}$ et $St_{6.3}$ qui ne présentent pas de différence significative entre eux.

Sur le site de l'aciérie, les lots des stations St_1 et St_3, sans différence significative entre eux, relèvent de la classe IV avec une augmentation significative par rapport aux individus du site de provenance (T_3) ou d'élevage (T_1) qui relèvent de la classe I sans différence significative entre eux.

Au niveau de la station St_1, les lots St_1 et $St_{1'}$, qui ne présentent pas de différence significative entre eux et relèvent de la classe IV, se différencient par rapport aux lots des stations St_6 relevant de la même classe IV. Le lot St_1 n'est pas significativement différent du lot $St_{6.1}$ mais significativement moins contaminé que les lots $St_{6.2}$ et $St_{6.3}$. Le lot $St_{1'}$ n'est pas significativement différent des trois lots St_6 ($St_{6.1}$ à $St_{6.3}$).

Les lots des stations St_5 ($St_{5'}$), St_4 (St_{4a}) et St_2 (St_{2a} et St_{2b}) relèvent de la classe III avec une augmentation significative par rapport aux lots de provenance T_1 pour $St_{5'}$ et T_4 pour St_{2b} qui relèvent de la classe I.

Les individus autochtones présentent une concentration moyenne en plomb supérieure à celle des individus transférés : $St_{2a} > St_{2\,b}$ mais la différence n'est pas significative. La friche qui correspond à la station St_4 est hétérogène en ce qui concerne le plomb puisque les animaux transférés (St_{4b}) présentent une augmentation de la concentration moyenne en plomb tout en restant en classe I sans différence significative avec leur témoin (T_4) alors que l'individu autochtone (St_{4a}) relève de la classe III. Il faut également prendre en considération le fait que l'individu autochtone prospecte une surface bien supérieure à celle du microcosme et pendant une durée très supérieure.

IV.4.5.3.2. Autres espèces (autochtones)

a. *Cepaea nemoralis*

Les individus autochtones de cette espèce, récoltés en station St_2 (lot $St_{2'}$) et en station St_5 (lot St_5) présentent une concentration moyenne en plomb relevant de la classe II à la limite de la classe III, inférieure à celle des *Helix aspersa aspersa* des lots St_{2b} et $St_{5'}$ qui relèvent de la classe III mais sans différence significative.

Le lot $St_{7'}$, des jardins ouvriers, présente une concentration moyenne en plomb relevant de la classe III avec un niveau de contamination équivalent à celui du lot d'*Helix aspersa aspersa* autochtone St_{2a} (différence non significative) mais significativement supérieure à celui du lot $St_{2'}$.

b. *Helix pomatia*

Les deux individus récoltés dans les jardins ouvriers (lot St_7) présentent une concentration moyenne relevant de la classe III soit une classe équivalente à celle indiquée par l'espèce *Cepaea nemoralis* et environ 3 fois supérieure à celle de la référence « Augny ».

IV.4.5.3.3. Conclusion sur le niveau de contamination par le plomb

La prise en compte de toutes les données obtenues à partir des individus d'*Helix aspersa aspersa* transférés et des individus autochtones des trois espèces permet d'établir un classement progressif de contamination croissante pour le plomb selon l'ordre suivant :

T_1, T_3 et $T_4 < St_4$ (4b) $< St_2 < St_7 < St_5$ (5') $< St_3 < St_{6.1} < St_1$ (1') $< St_{6.2} < St_{6..3} < St_{6.0}$

| **I** | **III** | **IV** | **V** |

IV.4.5.4. Contamination par le manganèse

IV.4.5.4.1. Helix aspersa aspersa. Classement par référence à la grille établie au chapitre I

Le tableau 47 et la figure 75 D donnent le classement des lots dans l'ordre de contamination croissante en retenant la concentration moyenne en manganèse.

Tableau 47 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination pour le manganèse ; a classes proposées au chapitre I.

Lots	a :Classe	Regroupement par classe	Concentration en manganèse (mg/kg de MS)
T_4	I	I	Mn ≤ 100
St_{2b}	I		
St_{4a}	I		
$St_{6.3}$	I		
T_1	I		
T_3	I		
St_{4b}	II	II	100 < Mn ≤ 200
$St_{6.2}$	II		
St_1	II		
$St_{5'}$	II		
St_3	III	III	200 < Mn ≤ 400
$St_{1'}$	III		
$St_{6.1}$	III		
St_{2a}	IV	IV	Mn > 400
$St_{6.0}$	IV		
$St_{6'.0}$	IV		

Les différentes stations du site relèvent des classes I à IV de la grille établie au chapitre I avec la mise en évidence de la contamination la plus élevée au niveau des stations $St_{6.0}$ et $St_{6'.0}$ du parc à cendres, en surface de l'alvéole A non végétalisée.

Les individus autochtones de la station St_2 (lot St_{2a}) présentent également une concentration moyenne très élevée de classe IV. La comparaison avec le lot St_{2b} transféré en microcosme sur la même station met en évidence une très nette différence significative puisque la concentration moyenne en manganèse de ce dernier lot relève de la classe I sans différence significative avec le lot d'élevage T_4 dont il provient. Les individus autochtones prospectent une surface plus importante et pendant plus de temps que ceux du microcosme. De plus, dans ce secteur, influencé plus ou moins par la proximité avec le parc à réfractaires, l'hétérogénéité est importante du fait d'un transport aléatoire des poussières.

Un niveau de classe IV, dans le secteur de la station St_2, correspondant à l'épandage ancien des boues de coulée continue peut être retenu car le lot du parc à cendres, transféré sur la station $St_{6.1}$, ayant reçu également des boues de coulée continue, se classe au milieu de la gamme de concentration de la classe III avec une augmentation significative par rapport au lot de provenance T_4.

La station St_1 se classe selon le lot soit en classe II (lot St_1) soit en classe III (lot $St_{1'}$) sans que la différence entre les concentrations moyennes soit significative. Dans ce cas, nous proposons de retenir la classe la plus défavorable pour la station St_1 à savoir la classe III d'autant que la différence entre les lots $St_{1'}$ et le lot de provenance T_1 est significative alors que la différence entre le lot St_1 et le lot de provenance T_3 ne l'est pas.

La station St_3 (lot St_3) se classe également en classe III avec une différence significative avec le lot de provenance T_1 et la station St_5 (lot $St_{5'}$) à la limite supérieure de la classe II sans différence significative avec le même lot de provenance T_1.

La station $St_{6.2}$ (lot $St_{6.2}$) est contaminée par les poussières dispersées par les véhicules venant déverser les poussières d'aciérie dans l'alvéole C. Elle se classe en classe II ainsi que la station St_4 (lot St_{4b}) correspondant à la friche des anciens laminoirs dont l'hétérogénéité est démontrée par l'individu autochtone (lot St_{4a}) dont la concentration moyenne en manganèse relève de la classe I. Nous retiendrons, pour cette station St_4, le diagnostic le plus défavorable (classe II) d'autant qu'il est établi sur un lot de cinq individus pour St_{4b}. Il n'y a pas de

différence significative entre les lots $St_{6.2}$ et St_{4b} et une différence significative entre ces deux lots et le lot de provenance T_4.

Le remblai de l'alvéole A (station $St_{6.3}$) ne présente, par contre, aucune contamination par le manganèse. La moyenne du lot $St_{6.3}$ relève de la classe I sans différence significative avec le lot d'élevage T_4 dont il provient.

L'extrême différence qui existe entre les lots $St_{6.0}$ et $St_{6.3}$ met en évidence la sensibilité de l'escargot placé dans un cas à la surface même de l'alvéole non végétalisée ($St_{6.0}$) et dans l'autre cas sur le merlon végétalisé constituant la paroi de l'alvéole.

IV.4.5.4.2. Autres espèces (autochtones)

a. *Cepaea nemoralis*

Les individus de cette espèce, récoltés en station St_2 (lot $St_{2'}$) relèvent de la classe II, soit un niveau de contamination significativement inférieur à celui du lot St_{2a} constitué d'individus également autochtones d'*Helix aspersa aspersa* classés en classe IV. Il apparaît, dans ce cas, une différence nette dans la capacité des deux espèces à indiquer une contamination par le manganèse.

Il en est de même du lot des deux individus autochtones St_5 qui, par comparaison avec le lot $St_{5'}$ d'*Helix aspersa aspersa* transférés, présente une concentration moyenne inférieure bien que relevant de la même classe II. Le faible effectif de St_5 ne permet pas, dans ce cas, d'établir l'existence d'une différence significative entre les deux espèces.

Le lot autochtone $St_{7'}$ des jardins ouvriers se classe à la limite inférieure de la classe III sans différence significative, du fait d'un écart type important, avec le lot $St_{2'}$ relevant de la classe II.

b. *Helix pomatia*

Les deux individus autochtones récoltés dans les jardins ouvriers (St_7) présentent une concentration moyenne en manganèse inférieure à celle des individus de l'espèce *Cepaea nemoralis* et relèvent de la classe II avec un niveau de contamination inférieur à celui d'un site non industrialisé (lot d'*Helix pomatia* d'Augny) mais influencé par la présence d'incrustations de manganèse dans les calcaires du site de récolte.

IV.4.5.4.3. Conclusion sur le niveau de contamination par le manganèse

la prise en compte de toutes les données obtenues à partir des individus d'*Helix aspersa aspersa* transférés et des individus autochtones de trois espèces permet d'établir un classement progressif de contamination croissante pour le manganèse selon l'ordre suivant :

$$\underset{\mathbf{I}}{T_4,\ St_{6.3},\ T_1 \text{ et } T_3} < \underset{\mathbf{II}}{St_4\ (4b) < St_{6.2} < St_5\ (5') < St_3,\ St_7 < St_1\ (1')} < \underset{\mathbf{III}}{St_{6.1} < St_2\ (2a)} < \underset{\mathbf{IV}}{St_{6.0}}$$

IV.4.5.5. Contamination par le chrome

IV.4.5.5.1. Helix aspersa aspersa. Classement par référence à la grille établie au chapitre I et nouvelle proposition

Le tableau 48 et la figure 75 E donnent le classement des différents lots dans l'ordre croissant de contamination en retenant la concentration moyenne en chrome.

Tableau 48 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le chrome ; a classes proposées au chapitre I ; b nouvelle proposition
**Lot non retenu car contamination externe du matériel biologique*

Lots	a :Classe	Regroupement par classe	Concentration en chrome (mg/kg de MS)
$St_{6.3}$	I	I	Cr ≤ 0,6
$St_{6.2}$	I		
St_{4b}	I		
T_4	II	II	0,6 < Cr ≤ 1,8
St_{2b}	II		
$St_{6.1}$	II		
	III	III	1,8 < Cr ≤ 5,4
St_{4a}	IV	IV	5,4 < Cr ≤ 16,2
St_3	IV		
St_5	IV		
T_1	IV		
$St_{1'}$	IV		
St_1	IV		
St_{2a}	IV		
T_3	IV	V b	Nouvelle proposition Classe V si Cr > 16,2
$St_{6.0}$	IV		
$St_{6'.0}$*	IV		

Les différentes stations du site relèvent des classes I à IV de la grille établie au chapitre I. La contamination en chrome, la plus élevée, est diagnostiquée en station $St_{6.0}$ (31 mg/kg de MS) et relève d'une classe V non envisagée au début de l'étude. Le seuil de cette classe est fixé à 16,2 mg/kg de MS. Le lot $St_{6'.0}$ présente une concentration moyenne en chrome anormale (192 mg/kg de MS). Il y a, très certainement, une contamination de l'échantillon analysé et la figure 75 E ne comprend pas ce lot.

Contrairement à ce qui a été observé pour le zinc, le fer et le plomb, les stations $St_{6.1}$ à $St_{6.3}$ du parc à cendres, autres que la station $St_{6.0}$, présentent les plus faibles concentrations en chrome (lots $St_{6.3}$ et $St_{6.2}$: classe I ; lot $St_{6.1}$: classe II) avec, par rapport au lot T_4 dont ils proviennent et qui relève de la limite entre les classes I et II, soit une diminution de la concentration moyenne en chrome (significative en $St_{6.3}$ et non significative en $St_{6.2}$), soit une très légère augmentation non significative en $St_{6.1}$.

Sur le site de l'usine, les animaux autochtones présentent des concentrations moyennes en chrome supérieures à celles des animaux transférés. Par exemple, à la station St_4, l'individu St_{4a}, autochtone, relève de la classe IV alors que le lot transféré St_{4b} relève de la classe I sans différence significative avec le lot de provenance T_4. Il en est de même pour la station St_2, avec une différence significative entre les lots St_{2a} et St_{2b}, puisque le lot autochtone St_{2a} relève de la classe IV alors que le lot transféré St_{2b} relève de la limite classe I/classe II sans différence significative avec le lot de provenance T_4. Ceci illustre l'hétérogénéité du site vis à vis de la contamination métallique ; les individus placés en microcosme ne prospectent pas la

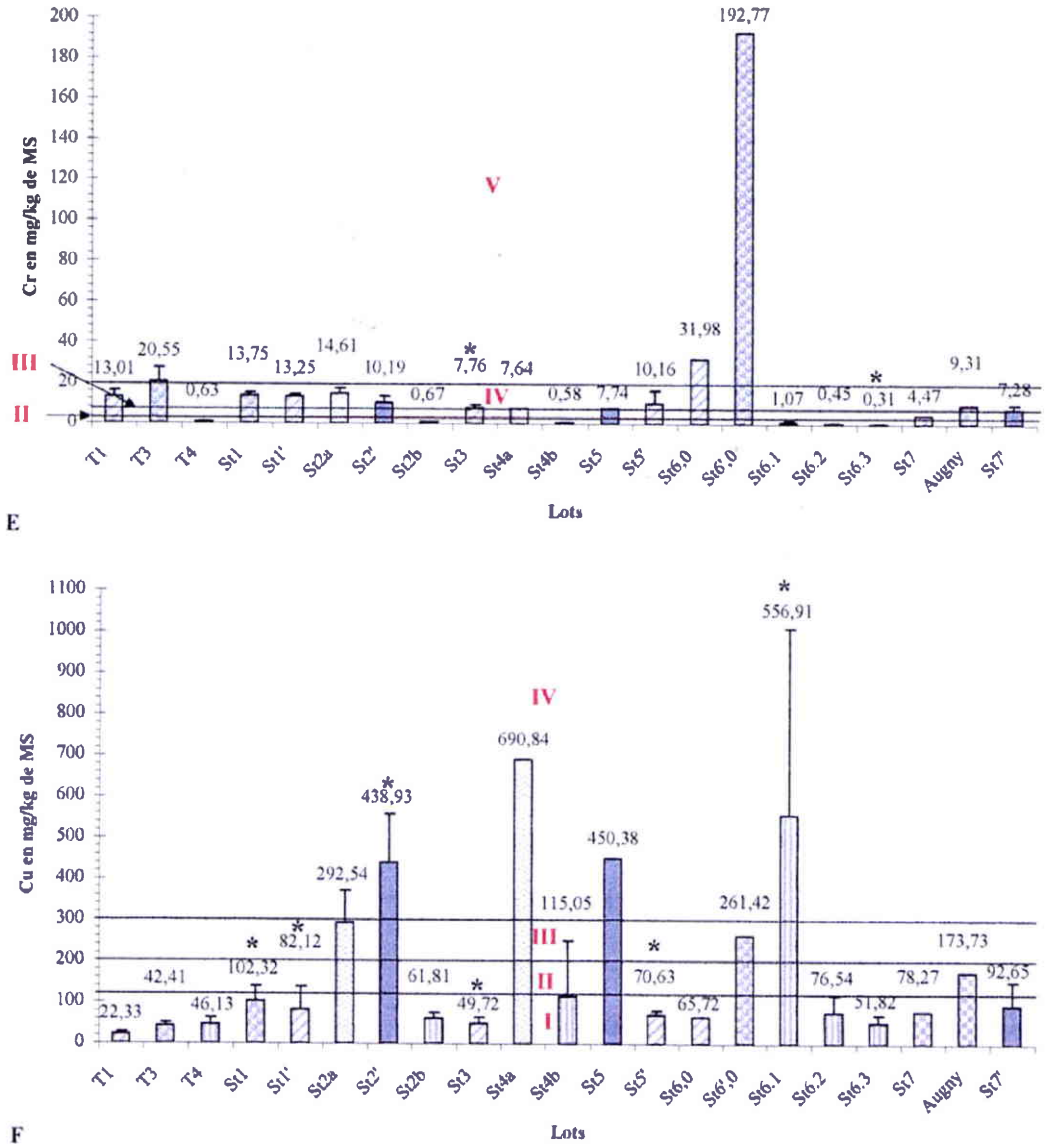


Figure 75b (suite) : Concentrations en métaux dans les différents lots d'escargots autochtones ou transférés (A : Zn, B : Fe, C : Pb, D : Mn, E : Cr, F : Cu, G : Cd, H : Ni) ; *différence significative avec le lot d'origine

même surface que les individus autochtones et séjournent seulement un mois. Il est proposé de retenir la classe IV pour la station 2.

La station St_1 est contaminée par le chrome puisque les concentrations moyennes des lots transférés St_1 et $St_{1'}$ relèvent de la classe IV, sans différence significative par rapport aux lots T_3 et T_1 dont ils proviennent (classe IV pour T_1 et proposition d'une nouvelle classe V pour T_3). La présence de chrome dans les animaux d'élevage T_1, en 1997, était liée à l'aliment. Un meilleur contrôle en 1998 a permis l'utilisation d'un aliment compatible avec l'obtention d'animaux d'élevage T_4 relevant de la classe I. Le maintien de la même classe après transfert de T_1 indique un apport continu de chrome.

Il en est de même du lot $St_{5'}$ de la station St_5 qui relève de la classe IV, identique à celle du lot dont il provient (lot T_1). Par contre, le lot St_3 présente une concentration moyenne en chrome significativement inférieure à celle du lot T_1. Il y a, dans ce cas, décontamination après transfert.

IV.4.5.5.2. Autres espèces (autochtones)

a. *Cepaea nemoralis*

Le diagnostic établi à partir de cette espèce, en appliquant la grille d'*Helix aspersa aspersa*, ne modifie pas l'appartenance à une classe. Les lots de *Cepaea nemoralis* St_5 et $St_{2'}$ appartiennent à la classe IV de même que les lots d'*Helix aspersa aspersa* $St_{5'}$ et St_{2a}. Le lot $St_{7'}$ des jardins ouvriers relève également de la classe IV. Il n'y a pas de différence significative entre les lots $St_{2'}$ et $St_{7'}$.

b. *Helix pomatia*

Les deux individus récoltés dans les jardins ouvriers (lot St_7) présentent une concentration moyenne en chrome inférieure à celle du lot de *Cepaea nemoralis* et relèvent de la classe III, soit une classe inférieure à celle de la référence régionale pour la même espèce (*Helix pomatia* d'Augny).

IV.4.5.5.3. Conclusion sur le niveau de contamination par le chrome

La prise en compte de toutes les données obtenues à partir des individus d'*Helix aspersa aspersa* d'élevage et transférés, ainsi que des individus autochtones des trois espèces, permet d'établir un classement progressif de contamination croissante par le chrome selon l'ordre :

$$\underset{\text{I}}{St_{6.3},\ St_{6.2} < St_4\ (4b),\ T_4 < St_{6.1}} < \underset{\text{II}}{St_4\ (4a),\ St_3,\ St_5\ (5')} < \underset{\text{IV}}{T_1,\ St_1,\ St_2\ (2a) < T_3} < \underset{\text{V}}{St_{6.0}}$$

IV.4.5.6. Contamination par le cuivre

IV.4.5.6.1. Helix aspersa aspersa. Classement par référence à la grille établie au chapitre I

Le tableau 49 et la figure 75 F donnent le classement des différents lots dans l'ordre de contamination croissante en retenant la concentration moyenne en cuivre.

Tableau 49 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le cuivre ; a classes proposées au chapitre I

Lots	a :Classe	Regroupement par classe	Concentration en cuivre (mg/kg de MS)
T_1	I	I	Cu ≤ 130
T_3	I		
T_4	I		
St_3	I		
$St_{6.3}$	I		
St_{2b}	I		
$St_{6.0}$	I		
$St_{5'}$	I		
$St_{6.2}$	I		
$St_{1'}$	I		
St_1	I		
St_{4b}	I		
	II	II	130 < Cu ≤ 200
$St_{6'.0}$	III	III	200 < Cu ≤ 300
St_{2a}	III		
$St_{6.1}$	IV	IV	Cu > 300
St_{4a}	IV		

Les différentes stations du site relèvent des classes I à IV avec une grande majorité en classe I ce qui concorde avec le fait que le cuivre n'est pas un métal associé à cette activité sidérurgique. Cependant, au niveau de la station ayant reçue des boues de coulée continue $St_{6.1}$, il y a une contamination significative par le cuivre avec appartenance à la classe IV alors que le lot d'origine T_4 relève de la classe I. Le seul individu autochtone récolté sur la friche de l'ancien laminoir (St_{4a}) présente une contamination en cuivre très élevée de classe IV alors que le lot transféré en un autre emplacement de cette même friche (St_{4b}) se situe à la limite entre les classes I et II mais sans différence significative avec le lot d'origine (T_4). Ceci souligne l'hétérogénéité de cette friche.

La surface de l'alvéole A non végétalisée est également une nette source de contamination par le cuivre avec une appartenance à la classe III pour le lot $St_{6'.0}$ et une tendance à l'augmentation entre le lot $St_{6.0}$ et T_1.

Tous les autres lots relèvent de la classe I mais une différence entre eux ressort si l'on considère l'évolution de la concentration moyenne en cuivre par rapport à celle des lots d'élevage dont ils proviennent.

Ainsi il n'y a pas d'augmentation significative de la concentration moyenne en cuivre des lots $St_{6.2}$, $St_{6.3}$ et St_{2b} par rapport à T_4 mais il y a une augmentation significative de la concentration moyenne en cuivre des lots de la station St_1 (St_1 et $St_{1'}$) par rapport aux lots T_3 et T_1 et de celle des lots $St_{5'}$ et St_3 par rapport à T_1.

Le lot d'individus autochtones prélevés en St_2 (lot St_{2a}) relève de la limite classe III/classe IV et présente une contamination significative par le cuivre. Ce secteur a reçu, par le passé, des boues de coulée continue et montre l'existence d'un apport de cuivre vérifié en $St_{6.1}$. Les animaux en microcosme (St_{2b}) n'explorent pas la même surface et ne restent sur le site que un mois.

IV.4.5.6.2. Autres espèces (autochtones)

a. *Cepaea nemoralis*

Les individus autochtones, récoltés sur la station St_2 (lot $St_{2'}$), relèvent de la classe IV avec un diagnostic proche de celui donné par le niveau de contamination du lot autochtone d'*Helix aspersa aspersa* (lot St_{2a} en classe III/IV). L'augmentation est significative entre le lot $St_{2'}$ et le lot St2a. Dans ce cas, il est proposé de retenir la classe IV pour la station St_2. Les deux individus autochtones récoltés sur la station St_5 présentent un niveau de contamination très supérieur (classe V) à celui du lot d'*Helix aspersa aspersa* transféré ($St_{5'}$) qui relève de la classe I.

Le lot $St_{7'}$ des jardins ouvriers présente une concentration moyenne en cuivre qui relève de la classe I sans différence significative avec le lot de *Helix aspersa aspersa* d'élevage (T_4).

b. *Helix pomatia*

Les individus récoltés dans les jardins ouvriers (lot St_7) présentent une concentration moyenne en cuivre relevant de la classe I, inférieure à la concentration moyenne du lot d'*Helix pomatia* récolté en dehors de toute activité sidérurgique et qui constitue notre lot témoin pour le fond pédogéochimique (lot d'Augny, classe II).

IV.4.5.6.3. Conclusion sur le niveau de contamination par le cuivre

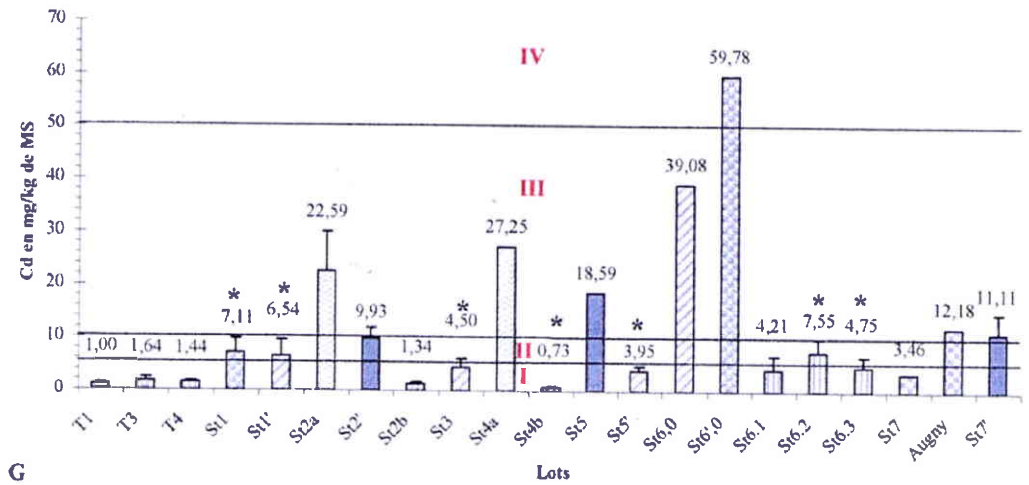
La prise en compte de toutes les données obtenues à partir des individus d'*Helix aspersa aspersa* transférés et des individus autochtones des trois espèces permet d'établir un classement progressif de contamination croissante par le cuivre selon l'ordre :

$$\underset{\text{I}}{T_1, T_3, T_4 < St_3 < St_{6.3} < St_{6.2} < St_1,} \; \underset{\text{III}}{St_7 < St_{6.0} < St_2\,(2a),} \; \underset{\text{IV}}{St_5 < St_{6.1} < St_4\,(4a)}$$

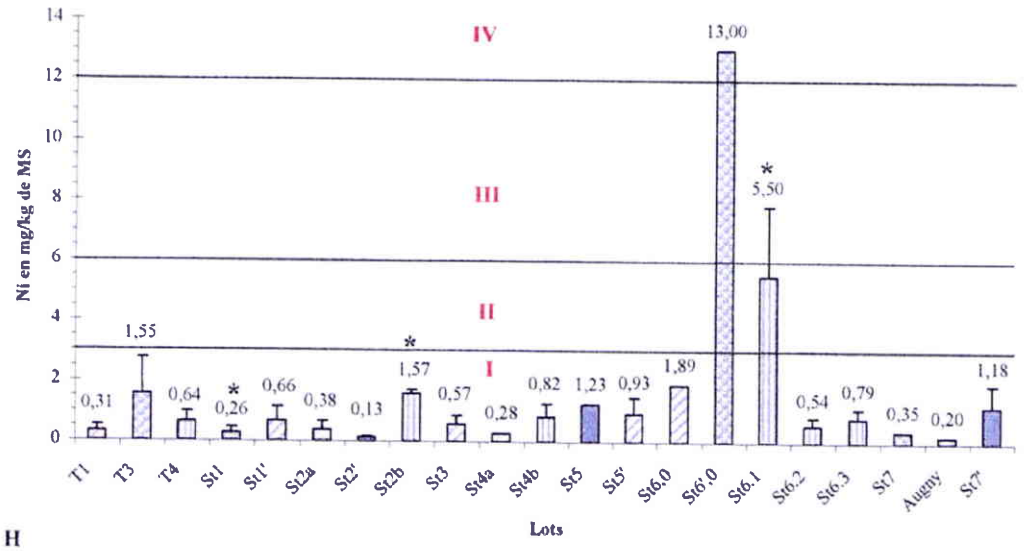
IV.4.5.7. Contamination par le cadmium

IV.4.5.7.1. Helix aspersa aspersa. Classement par référence à la grille établie au chapitre I

Le tableau 50 et la figure 75 G donnent le classement des différents lots dans l'ordre de contamination croissante en retenant la concentration moyenne en cadmium.



G



H

Figure 75b (suite) : Concentrations en métaux dans les différents lots d'escargots autochtones ou transférés (A : Zn, B : Fe, C : Pb, D : Mn, E : Cr, F : Cu, G : Cd, H : Ni) ; *différence significative avec le lot d'origine

Tableau 50 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le cadmium ; a classes proposées au chapitre I

Lots	a :Classe	Regroupement par classe	Concentration en cadmium (mg/kg de MS)
St_{4b}	I	I	Cd ≤ 5
T_1	I		
St_{2b}	I		
T_4	I		
T_3	I		
$St_{5'}$	I		
$St_{6.1}$	I		
St_3	I		
$St_{6.3}$	I		
$St_{1'}$	II	II	5 < Cd ≤ 10
St_1	II		
$St_{6.2}$	II		
St_{2a}	III	III	10 < Cd ≤ 50
St_{4a}	III		
$St_{6.0}$	III		
$St_{6'.0}$	IV	IV	Cd > 50

Les différentes stations du site relèvent des classes I à IV de la grille de contamination établie au chapitre I.

La contamination la plus élevée est relevée dans les lots transférés à la surface de l'alvéole A, non végétalisée, avec, pour le lot $St_{6'.0}$ une appartenance à la classe IV et pour le lot $St_{6.0}$ une appartenance à la classe III.

Le fait le plus marquant concerne l'importante différence dans la concentration en cadmium entre les individus autochtones des stations St_4 (St_{4a}) et St_2 (St_{2a}) qui relèvent de la classe III et celle des individus transférés dans les mêmes secteurs à savoir les lots St_{4b} et St_{2b} qui relèvent de la classe I sans différence significative avec les témoins dont ils sont issus (lot T_4) en ce qui concerne St_{2b} et avec même une diminution significative en ce qui concerne St_{4b}. Cette différence met en évidence l'hétérogénéité dans la contamination des deux secteurs étudiés. Les individus autochtones peuvent prospecter une plus grande surface que le lot transféré en microcosme et pendant une période plus importante. Chaque fois qu'il est possible, il s'avère donc nécessaire, pour les sites à contamination très hétérogène, ce qui est très souvent le cas, de pouvoir contrôler les niveaux de contamination des individus autochtones.

La comparaison des autres lots transférés avec leurs lots d'élevage met en évidence les faits suivants :

- Un maintien dans la même classe I et sans différence significative entre $St_{6.1}$ et T_4

- Un maintien dans la même classe I avec une augmentation significative entre St_3, $St_{5'}$ et T_1 ainsi qu'entre $St_{6.3}$ et T_4

- Un changement de classe I en classe II avec augmentation significative entre St_1 et T_3, entre $St_{1'}$ et T_1 ainsi qu'entre $St_{6.2}$ et T_4.

IV.4.5.7.2. Autres espèces (autochtones)

a. *Cepaea nemoralis*

Comme pour les individus autochtones d'*Helix aspersa aspersa* (lot St_{2a}), les individus autochtones de *Cepaea nemoralis* indiquent une contamination importante par le cadmium à savoir à la limite des classes II et III en station St_2 pour le lot $St_{2'}$. Le classement est également en III pour le lot St_5 et celui des jardins ouvriers (lot $St_{7'}$) sans différence significative entre les lots $St_{2'}$ et $St_{7'}$.

b. *Helix pomatia*

Les individus récoltés dans les jardins ouvriers (St_7) présentent des concentrations faibles relevant de la classe I alors que les individus de la référence régionale (Augny) relèvent de la classe III. La réponse des deux espèces *Cepaea nemoralis* et *Helix pomatia* se révèle ainsi très différente dans un même secteur mais le faible effectif de *Helix pomatia* nécessite une vérification ultérieure.

IV.4.5.7.3. Conclusion sur le niveau de contamination par le cadmium

La prise en compte de toutes les données obtenues à partir des individus d'*Helix aspersa aspersa* transférés et des individus autochtones des trois espèces permet d'établir un classement progressif de contamination croissante par le cadmium selon l'ordre suivant :

St_4 (4b), T_1, St_2 (2b), T_4, $T_3 < St_{5'}$, $St_{6.1}$, St_3, $St_{6.3} < St_1$, $St_{6.2} < St_{7'} < St_2$ (2a), St_4 (4a) $< St_{6.0} < St_{6'.0}$

I | **II** | **III** | **IV**

Quand, pour une même station, des lots différents relèvent de classes différentes, nous proposons de retenir le rang de classement le plus élevé (référence en gras).

IV.4.5.8. Contamination par le nickel

IV.5.8.1. Helix aspersa aspersa. Classement des stations par référence à la grille établie au chapitre I

Le tableau 51 et la figure 75 H donne le classement des différents lots dans l'ordre de contamination croissante en retenant la concentration moyenne en nickel.

Tableau 51 : Classement des différents lots de H.a.a. dans l'ordre croissant de contamination par le nickel ; a classes proposées au chapitre I (Absence de station dans la classe III).

Lots	a :Classe	Regroupement par classe	Concentration en nickel (mg/kg de MS)
St_{4a}	I	I	Ni ≤ 3
St_1	I		
T_1	I		
St_{2a}	I		
$St_{6.2}$	I		
St_3	I		
T_4	I		
$St_{1'}$	I		
$St_{6.3}$	I		
St_{4b}	I		
$St_{5'}$	I		
T_3	I		
St_{2b}	I		
$St_{6.0}$	I		
$St_{6.1}$	II	II	3 < Ni ≤ 6
	III	III	6 < Ni ≤ 12
$St_{6'.0}$	IV	IV	Ni > 12

Les différentes stations du site relèvent des classes I à IV de la grille établie au chapitre I.

Globalement, mis à part la stations $St_{6.1}$ qui relève de la classe II avec une augmentation significative par rapport au lot T_4 ayant fourni les animaux transférés, et la station $St_{6.0}$ qui par le lot $St_{6'.0}$ relève de la classe IV, l'ensemble du site ne présente pas de contamination par le nickel avec une appartenance à la classe I pour tous les autres lots. Il y a même, par rapport à la contamination moyenne de certains lots témoins, une diminution après transfert, significative pour le lot St_1 par rapport au lot T_3 et non significative pour le lot $St_{6.2}$ par rapport au lot T_4. Le diagnostic est conforté par la concentration moyenne en nickel des lots d'individus autochtones récoltés aux stations St_2 (lot St_{2a}) et St_4 (lot St_{4a}). Dans ce cas, en stations 2 et 4b, les microcosmes ont été implantés sur des surfaces plus riches en nickel que le biotope élargi.

Une légère augmentation de la concentration moyenne en nickel par rapport au lot T_1, tout en restant dans la classe I et sans différence significative, est constatée pour les stations St_3 (lot St_3), St_1 (lot $St_{1'}$) et St_5 (lot $St_{5'}$).

L'augmentation de la concentration moyenne en nickel, tout en restant dans la classe I, est non significative pour la station $St_{6.3}$ (lot $St_{6.3}$) par rapport au lot T_4 ainsi que pour la station $St_{1'}$ par rapport à T_1, mais significative pour la station St_2 (lot St_{2b}) par rapport à T_4. L'hypothèse de la présence de nickel dans les boues de coulée continue en quantité plus élevée qu'aux autres stations est renforcée si l'on compare le niveau de contamination du lot St_{2b} pour la station plus ancienne, végétalisée, d'épandage des boues et le lot $St_{6.1}$ sur la station $St_{6.1}$ (classe II) ayant reçue plus récemment les mêmes boues et dont la végétalisation est en cours.

IV.4.5.8.2. Autres espèces (autochtones)

a. *Cepaea nemoralis*

Les individus autochtones de cette espèce, récoltés sur les stations St_2 (lot $St_{2'}$), St_5 et St_7 (lot $St_{7'}$), donnent le même diagnostic qu'*Helix aspersa aspersa* avec une appartenance à la classe I. La station 7 des jardins ouvriers (lot $St_{7'}$) étant cependant significativement plus riche en nickel que la station 2.

Le lot $St_{2'}$ présente d'ailleurs la concentration la plus faible en nickel pour l'ensemble des lots, toutes espèces confondues.

b. *Helix pomatia*

La concentration moyenne en nickel des individus autochtones d'*Helix pomatia* (lot St_7) relève du bas de la gamme de classe I et est du même ordre de grandeur que celle des individus du lot de référence (Augny).

IV.4.5.8.3. Conclusion sur le niveau de contamination par le nickel

La prise en compte de toutes les données obtenues à partir des individus d'*Helix aspersa aspersa* transférés et des individus autochtones des trois espèces permet d'établir un classement progressif de contamination croissante par le nickel selon l'ordre suivant :

$$\underset{\text{I}}{T_1, T_4, St_1 (1'), St_3, St_4 (4b), St_5, St_{6.2}, St_{6.3}, St_{7'}, T_3, St_2 (2b)} < \underset{\text{II}}{St_{6.1}} < \underset{\text{IV}}{St_{6.0}}$$

IV.4.6. Conclusion et discussion de l'étude du site sidérurgique

Tableau 52 : Synthèse du classement des différents lots de l'aciérie pour les huit métaux étudiés (Zn, Fe, Pb, Mn, Cr, Cu, Cd et Ni); H.a.a. (*Helix aspersa aspersa*), C.n. (*Cepaea nemoralis*), H.p. (*Helix pomatia*) ; E : individus d'élevage, A : individus autochtones ; classe I, classe II, classe III, classe IV, classe V

	Helix aspersa aspersa									*Cepaea nemoralis* et *Helix pomatia*								
	Zn	Fe	Pb	Mn	Cr	Cu	Cd	Ni	ICPM	Zn	Fe	Pb	Mn	Cr	Cu	Cd	Ni	ICPM
T_1 (E)									14									
T_3 (A)									15									
T_4 (E)									9									
St_1 (T_3, tr)									19									
$St_{1'}$ (T_1, tr)									22									
St_{2a} (A)/St_2 (A, C.n.)									24-25									23
St_{2b} (T_4,tr)									13									
St_3 (T_1, tr)									21									
St_{4a} (A)									21									
St_{4b} (T_4, tr)									11									
$St_{5'}$ (T_1, tr)/St_5 (A, C.n.)									19									21
$St_{6.0}$ (T_1, tr)									29									
$St_{6'.0}$ (T_2, T_3, tr)									35									
$St_{6.1}$ (T_4, tr)									24									
$St_{6.2}$ (T_4, tr)									17									
$St_{6.3}$ (T_4, tr)									15									
$St_{7'}$ (A) C.n.																		21
Augny (H.p.)																		18
St_7 (A) H.p.																		15

Le tableau 52 fait la synthèse du classement des différents lots pour les huit métaux étudiés. Les faits suivants sont à souligner :

- Les lots de *Helix aspersa aspersa* d'élevage peuvent présenter, avant transfert, une contamination par plusieurs métaux. Le lot T_1 présente une contamination par Fe, Zn et Cr, avec un indice polymétallique de 14, par contre le lot T_4, dont l'indice de contamination polymétallique est de 9, est très satisfaisant mis à part une très légère contamination par le chrome. Ceci renforce la nécessité d'obtenir, en élevage, une qualité de classe I pour tous les métaux. Cependant, après transfert de un mois, si la concentration moyenne en un métal donné relevant d'une classe supérieure à I n'a pas significativement évoluée, il est possible de conclure que le niveau de contamination de la station relève bien de cette classe. Par contre, si cette concentration moyenne augmente ou diminue significativement, il est possible de conclure à l'existence d'une contamination respectivement supérieure ou inférieure.

- Le choix d'animaux (*Helix aspersa aspersa*) prélevés dans un site de référence (lot T_3) ne permet pas une qualité équivalente à celle d'un élevage contrôlé. Dans le cas présent, le lot T_3 présente une contamination en Fe, Zn et Cr et un indice polymétallique de 15, proche de celui du lot d'élevage T_1.

- Après transfert d'un mois sur les différentes stations du site sidérurgique, il est possible de détecter et d'évaluer comparativement les niveaux de contamination polymétallique. En référence à *Helix aspersa aspersa*, l'indice polymétallique varie sur le site de 11 à 35.

    - La friche correspondant à l'emplacement d'un ancien laminoir (St_4) présente un indice polymétallique de 11 (St_{4b}) avec un enrichissement en Fe, Zn et Mn
    - La station St_2, proche du parc des réfractaires, avec un indice polymétallique de 13 (St_{2b}) présente une contamination par Zn, Fe et Pb
    - La réponse est sensible en fonction du positionnement du microcosme. Par exemple, la station $St_{6.3}$, sur le merlon servant de paroi à l'alvéole A non végétalisée, présente un indice polymétallique de 15 avec une contamination par Zn et Pb alors que si le microcosme est placé à la surface de l'alvéole A, l'indice polymétallique atteint les valeurs maximales de 35 pour le site (lot $St_{6'.0}$) ou de 29 (lot $St_{6.0}$) avec une contamination par l'ensemble des huit métaux. La distance séparant les stations $St_{6.0}$ et $St_{6.3}$ n'est pourtant que de quelques mètres.
    - La station $St_{6.2}$, au pied de l'alvéole B végétalisée, présente une contamination atmosphérique par le dépôt des poussières d'électrofiltres transportées par camion. L'indice polymétallique est de 17 résultant d'un enrichissement en Zn, Pb, Mn et Cd.
    - La station St_1, localisée sur le site de l'ancien haut fourneau, présente, avec le lot St_1, un indice polymétallique de 19 avec une contamination par Pb, Mn, Cd, Zn et Fe. Pour le chrome, le diagnostic est difficile puisque le lot de la nature T_3 qui a fourni les animaux transférés présente déjà une contamination supérieure à celle obtenue en fin d'exposition et un indice polymétallique de 15. Le lot $St_{1'}$ renforce le diagnostic de contamination avec un indice polymétallique de 22 nettement différent de l'indice

polymétallique de 14 correspondant au lot d'élevage T1 ayant fourni les animaux transférés. La contamination est due à Pb, Mn, Zn, Fe et Cd. Le diagnostic pour le chrome demeure difficile compte tenu de la contamination par ce métal du lot d'origine.

- La station St_5 (lot $St_{5'}$), avec un indice polymétallique de 19, présente, par rapport au lot T_1 d'origine (indice polymétallique de 14), une contamination par Zn, Pb, Fe et Mn. Le chrome demeure dans la même classe IV que celle du lot d'origine.
- La station St_3 (lot St_3), situé au voisinage de l'unité de traitement des poussières de l'aciérie, présente un indice polymétallique de 21 avec par rapport au lot d'élevage d'origine (T_1) une contamination par Pb, Mn, Zn et Fe. L'interprétation du niveau de contamination du chrome est difficile pour les mêmes raisons que ci-dessus
- La station $St_{6.1}$ (lot $St_{6.1}$), située en surface d'une zone d'épandage de boues mais recevant aussi des dépôts de poussières d'aciérie lors de leur camionnage, présente une contamination par six métaux au moins Zn, Pb, Cu, Mn, Fe et Ni plus le chrome déjà présent dans le lot d'élevage T_4 et qui persiste après transfert
- Mis à part la station $St_{6.1}$, la contamination par le cuivre est détectée chez les individus autochtones de *Helix aspersa aspersa* au niveau de trois autres stations :

  - En station St_2 (lot St_{2a}) en même temps que six autres métaux Zn, Mn, Cr, Pb, Cd et Fe avec un indice polymétallique de 24-25. Cette station correspond également à une zone ancienne d'épandage de boues ;
  - En station St_4 (individu $_{4a}$) en même temps que cinq autres métaux Cr, Cd, Pb, Zn, Fe et un indice polymétallique de 21 ;
  - En station $St_{6'.0}$ en même temps que tous les autres métaux et avec un indice polymétallique de 35.

- L'analyse d'individus d'*Helix aspersa aspersa* autochtones met en évidence, dans tous les cas, des indices polymétalliques supérieurs à ceux d'individus *Helix aspersa aspersa* transférés en microcosmes pendant un mois. L'indice polymétallique du lot St_{2a} est de 24-25 contre 13 pour le lot St_{2b}. Il est de 21 pour l'individu $_{4a}$ contre 11 pour le lot St_{4b}.
  Deux facteurs peuvent expliquer l'amplification du diagnostic chez les autochtones :

  - D'une part la durée de séjour plus longue ;
  - D'autre part, la surface de biotope plus importante prospectée puisqu'il n'y a pas contention dans l'aire réduite d'un microcosme. Cette surface plus importante permet une intégration de l'hétérogénéité de la contamination de la station.

- La récolte d'individus autochtones de *Cepaea nemoralis* et la comparaison de leur niveau de contamination avec celui des lots de *Helix aspersa aspersa* autochtones du même site mettent en évidence, dans le cas de la station St_2, un indice polymétallique de 23 pour le lot de *Cepaea nemoralis*

$St_{2'}$ du même ordre de grandeur que celui évalué à 24-25 pour le lot *Helix aspersa aspersa* St_{2a}.
Si on compare l'évaluation métal par métal, *Cepaea nemoralis* fourni une évaluation supérieure pour Cu, égale pour Zn, Fe, Cr, Cd, Ni et inférieure pour Pb et Mn

- En station St_5, l'indice polymétallique est de 21 chez les *Cepaea nemoralis* autochtones (St_5) et de 19 chez les *Helix aspersa aspersa* transférés ($St_{5'}$) avec, dans ce cas, pour *Cepaea nemoralis* sept métaux dépassant la classe I : Cr, Cu, Cd, Zn, Fe, Mn, Pb et pour *Helix aspersa aspersa* seulement cinq métaux : Zn, Cr, Fe, Pb et Mn
- Avec un indice polymétallique de 21 les *Cepaea nemoralis* autochtones des jardins ouvriers (lot $St_{7'}$) mettent en évidence une contamination par six métaux qui dépassent la classe I : Zn, Cr, Mn, Pb, Cd et Fe. Par contre, l'indice polymétallique des individus autochtones de *Helix pomatia* (St_7) du même site est de 15 avec cinq métaux dépassant la classe I : Pb, Cr, Zn, Fe et Mn. S'il semble possible d'utiliser en référence à la grille d'évaluation proposée, les espèces *Helix aspersa aspersa* et *Cepaea nemoralis* l'application à *Helix pomatia* nécessite des études ultérieures car son aire de déplacement est beaucoup plus vaste.
  En l'état actuel des données, il apparaît que *Helix pomatia* atteint des niveaux de contamination identiques à *Cepaea nemoralis* pour Fe, Pb, Cu, Ni et des niveaux inférieurs pour Zn, Mn, Cr et Cd
- L'étude de ce site sidérurgique ancien, reconverti dans une activité nouvelle, a montré la complexité d'une évaluation des niveaux de contamination en utilisant des gastéropodes autochtones et/ou transférés de trois espèces : *Helix aspersa aspersa*, *Cepaea nemoralis* et *Helix pomatia*.
- En cas de différence significative, en une même station, entre l'indice polymétallique d'un lot autochtone (exemple lot St_{2a}) et celui d'un lot transféré (exemple lot St_{2b}), il est proposé de retenir, pour la station, l'indice polymétallique le plus élevé c'est-à-dire, dans l'exemple choisi, celui du lot autochtone pour autant que le nombre d'individus récoltés soit satisfaisant ; cependant, dans le cas de la station 4 et, compte tenu de l'éloignement du lieu de récolte (individu 4a) et du lieu d'implantation du microcosme (individu 4b), les deux ICPM sont conservés.

En conclusion, le tableau 53 donne le classement définitif des stations. Les particularités de certaines stations, liées à l'hétérogénéité de leur contamination étant signalées dans le tableau précédent 52. Le classement progresse du lot d'élevage au lot transféré à la surface de l'alvéole A du parc à cendres, non végétalisée. Les stations St_{4a} et St_{4b} sont distinguées du fait de la distance les séparant et l'important écart existant dans l'indice polymétallique (11 à 21). Les stations $St_{6.3}$ (indice polymétallique de 15) et $St_{6.2}$ (indice polymétallique de 17) du parc à cendres révèlent une contamination par dépôts des poussières d'aciérie dispersées par le vent et le camionnage. L'indice polymétallique des autres stations met en évidence une progression depuis l'ancienne plate-forme de la cokerie (lot St_5, indice polymétallique de 19), la bordure ouest du train continu à fil (lot St_4, indice polymétallique de 21) avec un même indice que pour les jardins ouvriers (lot $St_{7'}$) et la friche bordant au sud le système de traitement des poussières du four électrique (lot St_3). L'ancienne plate-forme des hauts fourneaux (lot St_1) présente une contamination historique (indice polymétallique de 22). La

station $St_{6.1}$ du parc à cendres qui a reçu des épandages récents de boues atteint une valeur d'indice polymétallique de 24 du même ordre de grandeur que celui de la station St_2 (lot St_{2a}), proche du parc à réfractaires, et ayant également reçu l'épandage ancien de boues puis ayant été végétalisée.

Les niveaux de contamination observés en certaines stations pour Zn, Fe, Pb et Cr nous ont incités à proposer, pour ces métaux, une classe V, non identifiable sur les autres sites.

En fonction des préférences écologiques des escargots, il faut souligner que cette classe est atteinte dans des conditions de contention des individus en microcosme ; sans cette contrainte, les escargots ne sont pas présents, par exemple, en station $St_{6.0}$ qui représente un biotope artificiel peu végétalisé, aride et poussiéreux.

Tableau 53 : Classement retenu pour les différentes stations du site sidérurgique étudié en retenant les données de *Helix aspersa aspersa* sauf pour la station St_7 (*Cepaea nemoralis*) ; E : élevage ; * *Cepaea nemoralis* ; classe I, classe II, classe III, classe IV, classe V

ICPM	Stations	Lots	Zn	Fe	Pb	Mn	Cr	Cu	Cd	Ni
9	E	T_4								
11	St_{4b}	St_{4b}								
15	$St_{6.3}$	$St_{6.3}$								
17	$St_{6.2}$	$St_{6.2}$								
19	St_5	$St_{5'}$								
21	St_{4a}	St_{4a}								
	St_7*	$St_{7'}$								
	St_3	St_3								
22	St_1	$St_{1'}$								
24	$St_{6.1}$	$St_{6.1}$								
25	St_2	St_{2a}								
35	$St_{6.0}$	$St_{6'.0}$								

Chapitre V : Détermination de l'origine du plomb par l'étude de ses isotopes ^{206}Pb, ^{207}Pb et ^{208}Pb

V.1. Données bibliographiques

Les rapports isotopiques du plomb peuvent être exprimés par les trois rapports isotopiques classiques du plomb normalisés à l'isotope stable ^{204}Pb, soit $^{206}Pb/^{204}Pb$, $^{207}Pb/^{204}Pb$ et $^{208}Pb/^{204}Pb$, ainsi que par les rapports $^{206}Pb/^{207}Pb$, $^{208}Pb/^{206}Pb$ et $^{208}Pb/^{207}Pb$. Le tableau 52 présente les données sur les rapports isotopiques des minerais de plomb, des essences, des charbons et des sols. Dans les études environnementales c'est le rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ qui est le plus utilisé avec une variation de 0,894 à 1,38 (Ault *et al.*, 1970) puis les rapports $^{208}Pb/^{206}Pb$ et $^{208}Pb/^{207}Pb$. Ceci s'explique par la faible abondance du ^{204}Pb par rapport aux isotopes majeurs (environ 1,48%) rendant délicate sa mesure. Les isotopes ^{206}Pb, ^{207}Pb et ^{208}Pb proviennent de la désintégration radioactive respectivement de ^{238}U, ^{235}U et ^{232}Th (Gulson, 1986) et la composition isotopique actuelle d'un site dépend des abondances en uranium et thorium à l'origine. Selon Chow *et al.* (1975), on peut distinguer les mines de plomb précambriennes (Australie : Brokken-Hill ; USA : Idaho ; Canada : Colombie Britannique), les mines ordoviciennes (côte Atlantique du Canada) et les mines d'âge tertiaire (Mexique, Pérou, Yougoslavie). Le gisement du Missouri est très particulier car il est de l'âge pennsylvanien mais il est très radiogénique.

Selon les mêmes auteurs, l'étude des variations des rapports isotopiques du plomb permet de déduire les sources de pollution. L'augmentation du rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ (figure 76) indique une origine plus radiogénique, par contre l'abaissement de ce rapport indique une contribution du plomb émis par les véhicules à moteur. En effet, les essences plombées contiennent du plomb dont le rapport isotopique est celui du minerai dont il provient (Roy, 1996). Ainsi les additifs antidétonants des essences, en France, proviennent des minerais de plomb de Brokken Hill en Australie. Selon Pacyna (1988), la proportion des différentes sources de plomb était de 75% à partir des essences plombées et de 25% à partir des fonderies ; cette distinction des deux sources étant possible car une fonderie rejette un rapport isotopique caractéristique du plomb industriel.

Figure 76 : Evolution du rapport isotopique $^{206}Pb/^{207}Pb$ en fonction des régions, de l'origine du plomb des essences, du sol de surface ou profond, des aérosols, de la pluie et des sources industriels

Mines de plomb
Essence
Sols ou sédiment, surface (S), profondeur (F)
Charbon
Aérosols (avec date si connue)
Pluie
Industrie, fonderie
Industrie, incinérateur
PE : Pôle « essence » (Europe)
PI : Pôle industrie »
PN : Pôle « nature »

Régions et signification de haut en bas :

1. Globe terrestre :

   - Croûte continentale supérieure (1,23 ; Zartman et Doe, 1981) ;
   - Mine de Plomb précambrienne Australie (1,037-1,064 ; Chow, 1975) ;

2. Grande Bretagne, essences (1,059-1,079 ; Doucet, 1997) ;

3. France :

   - Aérosol en 1992, essences sans plomb (1,2 ; Grousset, 1994) ;
   - Rejets industriels (1,178-1,182 ; Petit *et al.*, 1977 ; Pacyna et Nriagu, 1979) ;
   - Précipitations (1,140-1,148 ; Roy, 1996) ;
   - Mine de Plomb de Brokken-Hill Australie (1,130 ; Doucet, 1997), origine du plomb des essences en France ;
   - Essences (1,110-1,120 ; Roy, 1996) ;
   - Aérosols en 1979, essences avec plomb (1,095 ; Grousset, 1994).

4. Allemagne :

   - Mine de plomb, Stolberg (1,18-1,2 ; Metzger, 1998) ;
   - Sol de Stolberg en surface (1,15-1,16 ; Metzger, 1998).

5. USA :

   - Mine de plomb, Missouri-Pennsylvanien, cas particulier (1,385 ; Chow *et al.*, 1975) ;
   - Mine de plomb, Mississipi (Marcantino, 1998) ;
   - Charbon américain (1,385 ; Chow *et al.*, 1975).

6. USA (Keinonen, 1992) :

   - Industrie, incinérateur (1,136) ;
   - Industrie, fonderie (1,155-1,199) ;
   - Sol autoroute (1,136) ;
   - Essences (1,08-1,136).

7. Ecosse : sédiment de lac (surface : 1,140 ; profondeur : 1,180) ;

8. Océan Atlantique (Veron *et al.*, 1992) : Air venant des USA (1,195-1,205), air méditerranéen (1,131), mélange : zone hachurée.

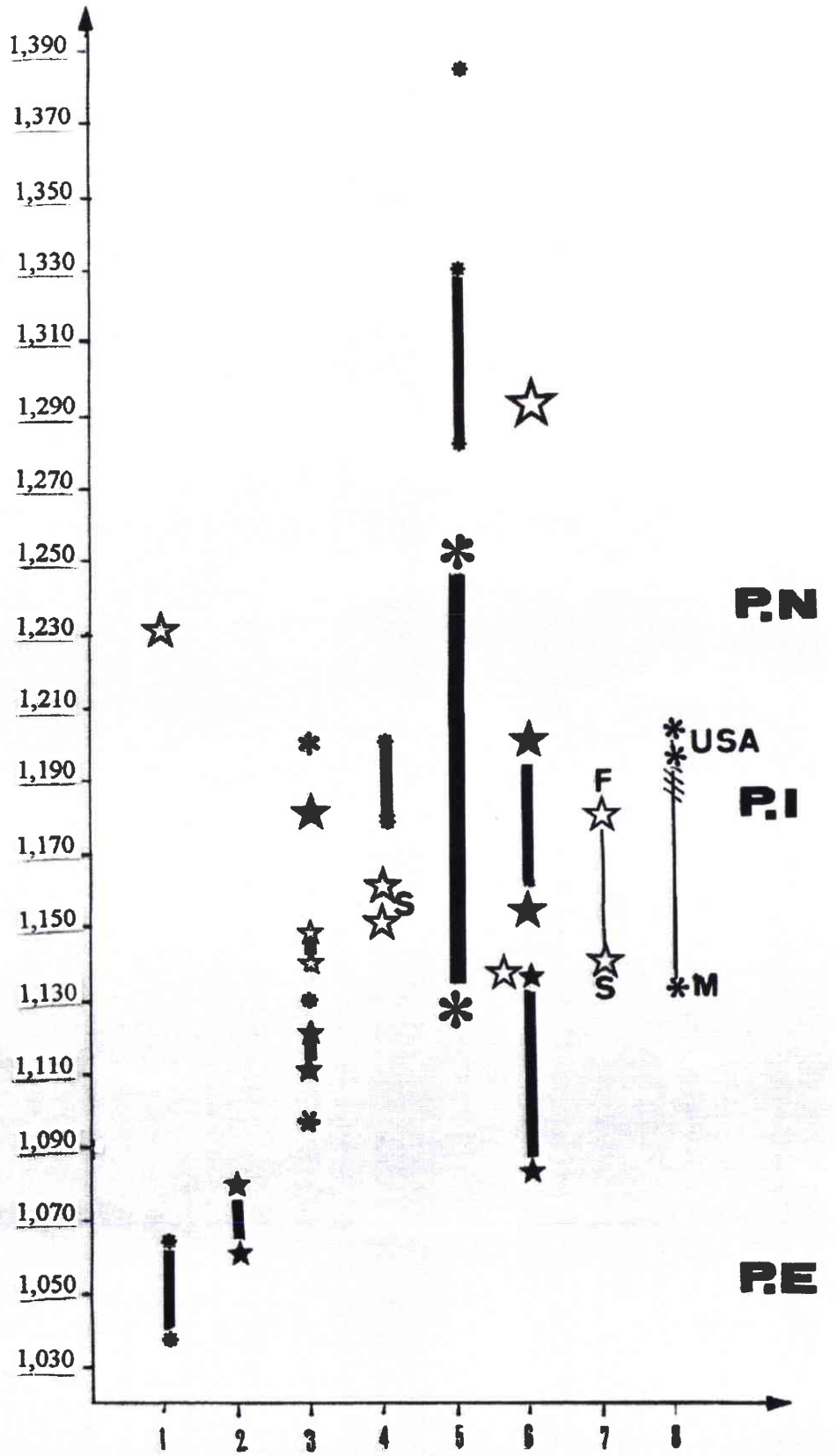


Figure 76 : Evolution du rapport isotopique $^{206}Pb/^{207}Pb$ en fonction des régions, de l'origine du plomb des essences, du sol de surface ou profond, des aérosols, de la pluie et des sources industriels

Tableau 54 : Etudes des isotopes du plomb dans les minerais de plomb, les essences et les rejets industriels

Nom	Année	Objet de l'étude	Résultats
Chow *et al.*	1975	Composition isotopique des additifs de l'essence, des charbons et des sols	- **Mines ($^{206}Pb/^{207}Pb$) :** précambrien 1,037-1,064 ordovicien : 1,160 tertiaire : 1,192-1,2 Particulier :1,385 (pennsylvanien (USA) - **Essences (Pb d'origines multiples utilisées dans la même raffinerie) $^{206}Pb/^{207}Pb$:** Paris 1966 : 1,162 San Diego 1965 : 1,151 (importation) San Diego 1974 : 1,189 (Missouri) Les aérosols suivent la même tendance - **Charbons américains ($^{206}Pb/^{207}Pb$) :** 1,126-1,252 (origine plus radiogénique que le Pb des essences) - **Sols** En relation avec la densité de trafic et sa proximité mais pas de corrélation étroite entre le rapport isotopique des essences et le rapport isotopique du sol du fait d'autres origines du plomb
Petit *et al.*	1977	Rejets industriels en Europe	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,178-1,182
Zartman et Doe	1981	Croûte continentale supérieure	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,23
Nriagu et Pacyna	1988	Rejets industriels en Europe	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,178-1,182
Hopper *et al.*	1991	Aérosols en Europe de l'ouest	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,142 (1,13-1,155) $^{208}Pb/^{207}Pb$: 2,405 (2,4-2,41)
Keinonen	1992	Diverses essences	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,08-1,136
Veron *et al.*	1992	Origine continentale et sources industrielles des métaux traces de la troposphère du nord ouest de l'Atlantique	- **Air de l'est méditerranéen** $^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,131 - **Air de l'ouest américain** $^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,195-1,205 - **Atmosphère en France selon les auteurs** $^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,09 ; 1,11 ; 1,118 ; 1,141 ; 1,149
Grousset *et al.*	1994	Aérosols en France de 1979 à 1992	Diminution, au cours du temps, du rapport $^{208}Pb/^{206}Pb$ (2,17-2,075) Augmentation, au cours du temps du rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ (1,095-1,2)
Croudace et Cundy	1995	Combustion de charbon (UK)	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,18
		Plomb naturel dans les sols	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,17-1,19
Taylor et Mc Lennan	1995	Croûte continentale supérieure	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,192-1,215
Roy	1996	Isotopes du plomb dans les essences en France	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,11-1,12
		Isotopes dans les précipitations en France	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,14-1,145
Doucet	1997	Brokken-Hill (Australie) minerais de plomb utilisés dans les essences plombées en France	$^{208}Pb/^{206}Pb$: 2,13 $^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,13 < naturel (1,21)
Monna *et al. in* Doucet (1997)	1997	Essences en Angleterre (origine du plomb : mines précambriennes d'Australie et du Canada)	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,059-1,079
Marcantino *et al.*	1998	Mines de la vallée du Mississipi (USA). Situation différente de Brokken Hill	$^{206}Pb/^{207}Pb$: 1,28-1,33 > naturel (1,21)
Metzger *et al.*	1998	Isotopes du plomb du site de Stolberg (Allemagne) Mines et fonderies	$^{206}Pb/^{207}Pb$ géogène : 1,18 $^{206}Pb/^{207}Pb$ anthropique : 1,15-1,16

La signature de la contamination par le plomb contenu dans les additifs des essences a été démontrée dès 1975 par Chow *et al.* Ainsi, dans la région de San Diego (Californie, USA), il y a eu dans les années 60-70 une augmentation de la contribution radiogénique des isotopes du plomb du fait d'un changement dans l'origine des additifs. Vers le milieu des années 65, ces additifs provenaient du Canada, d'Australie, du Pérou et du Mexique, puis la production de plomb, hautement radiogénique du Missouri a augmenté avec, pour conséquences, moins d'importations. Cependant, dans les années 70, les USA utilisaient 278.000 tonnes de plomb comme additif (Chow *et al.*, 1975) ; les autres sources de pollution par le plomb sont la combustion du charbon et les fonderies. Par ailleurs les auteurs ont montré des corrélations entre les plombs des essences, des sols et des végétaux.

Selon Grousset *et al.* (1994), il y a, en France, depuis les quinze dernières années, une modification des proportions de la contribution des deux sources principales, avec 50% provenant des essences plombées et 50% provenant des fonderies (Roy, 1996). Cette variation est à mettre en liaison avec une diminution de la contribution des essences plombées à la pollution atmosphérique, le parc automobile récent utilisant les essences sans plomb.

Selon Roy (1996) et Innocent *et al.* (1996), les variations des compositions isotopiques s'expliquent par les variations dans les différentes proportions des diverses sources de pollution qui possèdent des compositions isotopiques de plomb distinctes.

Les variations des concentrations en plomb et des proportions d'isotopes dans la glace, la tourbe ou les sédiments ont servi pour évaluer les changements spatio-temporels dans le niveau et l'origine des dépôts atmosphériques du plomb (Rosman *et al.*, 1993 ; Renberg et Persson, 1994 ; Graney *et al.*, 1995).

Le recours aux compositions isotopiques du plomb a permis à Veron *et al.* (1992) de distinguer, dans la troposphère du Nord Ouest de l'océan Atlantique, des apports continentaux de l'Est méditerranéen ($^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,131) et de l'Ouest américain ($^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,195 – 1,205). Quand les masses d'air américain se mélangent à celles du Canada, le rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ est intermédiaire ($^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,190 – 1,195) de même, s'il y a mélange avec les masses d'air méditerranéen ($^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,180 – 1,190).

Farmer *et al.* (1996) ont montré que, dans les sédiments d'un lac écossais, il existe une diminution du rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ (1,140) dans les couches supérieures par rapport aux couches plus profondes ($^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,180), ceci en liaison avec les émissions de plomb d'origine « véhicules à moteur » pendant ce siècle.

Metzger *et al.* (1998) ont effectué une étude de la région Aachen-Stolberg dans les monts de l'Eifel en Allemagne, site connu depuis les romains pour l'exploitation et la purification des minerais de plomb et de zinc. A cette contamination d'origine géogène ($^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,180 – 1,200) s'ajoutent les apports anthropogéniques avec un rapport isotopique inférieur (essences, centrales au charbon, industrie du fer et de l'acier). A proximité des fonderies, les sols sont très contaminés par le plomb, le zinc l'arsenic et le cadmium. L'origine anthropogène est observable dans les sols de surface, sur roches sableuses, avec un rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ de 1,150 à 1,160. Par contre, dans les sols sur roches calcaires, c'est l'origine géogène qui domine. L'importation de minerais d'origines variées vers les fonderies de Stolberg et les apports dans les essences modifient le rapport isotopique naturel.

Les études sur les compartiments abiotiques ne renseignent pas sur la biodisponibilité du plomb. Pour cette raison, d'autres recherches ont concerné les végétaux et les animaux. Selon Doucet (1997), la composition isotopique des métaux dans l'atmosphère étant très différente de celle des métaux présents dans la croûte continentale (Taylor et Mc Lennan, 1995), la contribution des métaux d'origine naturelle dans l'atmosphère n'est pas significative.

La composition des lichens et des eaux de précipitation en France (Roy, 1996), avec un rapport maximum de 1,148 pour $^{206}Pb/^{207}Pb$, peut s'interpréter comme le résultat d'un mélange entre le pôle « essence automobile » (Roy, 1996 ; $^{206}Pb/^{207}Pb = 1,110 - 1,114$) et le pôle « rejets atmosphériques industriels » (Petit *et al.*, 1984 ; $^{206}Pb/^{207}Pb = 1,178 - 1,182$). Une proportion des rejets industriels varie de 20% à 50% selon la région et l'activité industrielle reste à vérifier au niveau de la France ; les données de Petit *et al.* (1977) sur la composition du pôle « rejets industriels » ne sont peut être pas le reflet exact de ce pôle à l'échelle nationale.

Selon Doucet (1997), la détermination des sources de pollution atmosphérique sur la base des rapports élémentaires des métaux dans les bioindicateurs (lichens) est difficile. Il est indispensable de réaliser l'étude des compositions isotopiques. Selon cet auteur, l'augmentation du rapport isotopique $^{206}Pb/^{207}Pb$ avec l'altitude permet de discerner une origine liée à la combustion des essences dans les vallées et une origine probablement industrielle en altitude (rapport isotopique plus radiogénique). Les valeurs données par Innocent *et al.* (1996), sur des lichens ailleurs en France, sont conformes à celles de Doucet (1997) et à celles de Roy (1996) dans les précipitations en France (tableau 55).

Tableau 55 : Teneurs en métaux, dans les lichens, normalisés sur l'aluminium (Doucet, 1997) ; rapports intermétalliques dans les lichens et références des rejets industriels.

As/Al : 0,0022	Cd/Pb (lichens) : 0,02 à 0,08 Cd/Pb (industriel) : 0,09 à 0,2
Cd/Al : 0,0016	Cd/Zn (lichens) : 0,003 à 0,01 Cd/Zn (industriel) : 0,06 à 0,08
Cr/Al : 0,0064	
Cu/Al : 0,0186	Cu/Pb (lichens) : 0,29 à 0,62 Cu/Pb (industriel) : 0,6 à 0,8
Ni/Al : 0,0151	
Pb/Al : 0,0364	
Zn/Al : 0,2128	Zn/Pb (lichens) : 3,96 à 7,58 Zn/Pb (industriel) : 2 à 2,5

Les rapports élémentaires des métaux dans les bioindicateurs varient peu et ne permettent pas de déterminer les sources de pollution sauf à proximité de celles-ci. Selon Doucet (1997), cette homogénéisation s'effectue grâce aux transports à grande distance dans les circulations atmosphériques générales.

D'autres auteurs ont appliqué la recherche isotopique du plomb à la compréhension de l'évolution des participations des différentes sources de pollution et à l'identification de ces sources (tableau 56).

Pour le monde végétal, citons les travaux de Marcantonio *et al.* (1998) sur les anneaux de croissance du cyprès chauve de Louisiane dans un secteur ayant reçu des rejets de raffineries. La contamination anthropogénique est décelée à partir de la date de mise en exploitation d'une raffinerie (1970). Le tronc d'arbre peut constituer ainsi une archive biologique de la pollution par le plomb biodisponible et permettre une étude temporelle et spatiale par la recherche de ses isotopes.

Tableau 56 : Etudes environnementales des isotopes du plomb

Auteurs	Dates	Matériels biologiques	Résultats
Keinonen	1992	**Etude environnementale globale sur la période 1966 à 1987 dans la région de Helsinki :** Essences Incinérateurs (cendres) Fonderies (sols) Combustion du charbon (Pologne) Air Sols près d'autoroute Sédiments des lacs (stratification) Lichens Homme	$^{206}Pb/^{207}Pb$ 1,124 ± 0,026 (1,063-1,173) 1,218 ± 0,0011 1,155 – 1,199 1,184 ± 0,001 1,123 ± 0,013 1,136 ± 0,003 surface : 1,15 à 1,16 Fond (roche mère) : 1,23 à 1,38 1,148 ± 0,006 Foie : 1,142 ± 0,015 Poumons : 1,151 ± 0,011 Os : 1,156 ± 0,13
Carignan et Gariépy	1995	Lichens épiphytes, végétaux supérieurs (épinette), sédiments lacustres du Québec	La composition isotopique des lichens de la vallée du St Laurent signale une origine à grande distance (US) ; $^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,179-1,188 alors que les émissions canadiennes donnent un rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ de 1,15 et les émissions US entre 1,2 et 1,24
Innocent *et al.*	1996	Lichens en France	$^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,122-1,148
Doucet	1997	Lichens : variations des isotopes du plomb selon l'altitude dans les Vosges et la région d'Annecy à l'écart de toute pollution directe	- Vosges : Diminution de la contribution du « pôle essence » et augmentation du rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ avec l'altitude (1,126-1,147). La variation du rapport $^{208}Pb/^{206}Pb$ se fait dans le sens opposé (2,130-2,112) - Annecy : il y a peu de variation du rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ (1,128-1,136) et $^{208}Pb/^{206}Pb$ (2,131-2,122)
		Lichens : à la proximité d'une autoroute dans la région de Dijon	- $^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,134 - $^{208}Pb/^{206}Pb$ = 2,125
Gelinas et Schmit	1997	Type agricole. 1 : dépôts atmosphériques ; 2 : sols ; 3 : eaux ; 4 : matières en suspension ; 5 : écosystème dulçaquicole	$^{206}Pb/^{207}Pb$ 1 : 1,188 ; 2 : 1,274 ; 3 : 1,184 ; 4 : 1,263 ; 5 : 1,226 (plantes aquatiques), 1,247 (périphyton) et 1,162 (poissons)
		Type urbain	$^{206}Pb/^{207}Pb$ 2 : 1,236 ; 3 : 1,155 ; 4 : 1,164 ; 5 : 1,156 (plantes aquatiques), 1,161 (périphyton)
Outridge *et al.*	1997	Milieu marin : dents de béluga	$^{206}Pb/^{207}Pb$ 1450-1650 = 1,28 à 1,23 1993 = 1,22 à 1,18
Marcantonio *et al.*	1998	Anneaux de croissance de Cyprès en Louisiane en secteurs contaminés et non contaminé	Il y a deux sources de contamination : le rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ est corrélé au rapport $^{206}Pb/^{208}Pb$. Une source est naturelle, la seconde est industrielle. **Source naturelle :** $^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,21 $^{206}Pb/^{208}Pb$ = 0,492 **Source industrielle :** $^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,28 $^{206}Pb/^{208}Pb$ = 0,51 (Valeurs qui correspondent aux mines de la vallée du Missouri) $^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,28-1,33

Tableau 56 (suite) : Etudes environnementales des isotopes du plomb

Auteurs	Dates	Matériels biologiques	Résultats
Watmough *et al.*	1999	Anneaux de croissance de l'érable sycomore en secteur contaminé (secteur A) et en secteur péri-urbain (secteur B)	**Secteur A** Pas d'évolution du rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ (1,16) (plomb d'origine industrielle) **Secteur B** Période 1965–1987 : $^{206}Pb/^{207}Pb = 1,16$ Période 1987-1995 : $^{206}Pb/^{207}Pb = 1,17$ du fait de la réduction du plomb d'origine « trafic » Dans les deux secteurs il y a une baisse des teneurs en plomb du bois entre 1960 et 1994 (antérieure à la diminution du plomb dans les essences). 8mg/kg à 1,6 mg/kg (secteur A) et 8 mg/kg à 3 mg/kg (secteur B)
		Contamination des sols en secteur contaminé (secteur A) et en secteur péri-urbain (secteur B)	Secteur A (343 mg/kg) $^{206}Pb/^{207}Pb = 1,197$ (industrie) Secteur B (54,7 mg/kg) $^{206}Pb/^{207}Pb = 1,174$ (ville et trafic)

Cette approche a été également réalisée, avec succès, sur feuillus : le chêne rouge (Ault *et al.*, 1970) dans le New Jersey et l'érable sycomore (Watmough *et al.*, 1999). Ces derniers auteurs comparent deux sites, un site industriel et un site péri-urbain. Les proportions isotopiques mettent en évidence la contribution variable des sources industrielles et des sources urbaines. Le chêne rouge montre bien une augmentation de la contamination par le plomb dans le xylème entre les années 1940 (0,16 mg/kg en plomb) et les années 1960 (0,34 mg/kg de plomb), mais pas de variation à la baisse du rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$. Il apparaît donc que toutes les espèces d'arbres ne sont pas favorables à une étude dendrochimique des isotopes du plomb. Par ailleurs, il a été démontré que le plomb pénètre dans le xylème plus par l'écorce et le feuillage que par l'absorption racinaire (Lepp et Dollard, 1974 ; Lin *et al.*, 1995) et que d'autres facteurs interviennent (pH de la pluie).

Selon Watmough *et al.* (1999), les rapports les plus élevés en $^{206}Pb/^{207}Pb$ dans les sols de surface et dans l'érable sycomore signalent que la contribution du plomb, provenant des sources naturelles, industrielles et urbaines, est supérieure à celle provenant des émissions de véhicules à moteur.

Carignan et Gariépy (1995) proposent les lichens épiphytes (*Parmelia sulcata*, *Evernia mesomorpha*, *Usnea sp.*) comme matériel biologique pouvant, par leur composition isotopique en plomb, permettre de définir les sources d'émission de plomb atmosphérique dans le Sud du Québec (Canada). Pour la vallée du St Laurent, cette source est très éloignée, appartenant au territoire américain. Les écorces ou le bois d'épinette noire (*Picea mariana*) ainsi que les feuilles de feuillus donnent un signal plus radiogénique que les lichens du même site, ceci est lié à la physiologie des lichens épiphytes, c'est-à-dire, une capacité élevée et non sélective, à puiser dans l'atmosphère certains constituants.

Chez les animaux, les recherches concernant les rapports isotopiques du plomb sont rares (milieu marin) ou inexistantes (milieu terrestre).

En milieu marin, Shen et Boyle (1987) ont étudié les rapports isotopiques du plomb dans les coraux. Outridge *et al.* (1997) ont étudié l'évolution des rapports isotopiques du plomb dans les dents des bélugas de la zone canadienne arctique. Chez les bélugas, une décroissance significative des rapports isotopiques met en évidence l'existence d'une contamination d'origine anthropique du milieu du XVII^{ième} siècle jusqu'à la fin du XVIII^{ième} siècle et avant l'impact de l'ère industrielle ; une décroissance plus récente entre 1775 et 1993 met en

évidence une contamination d'origine industrielle. Certains matériels biologiques tels que les dents qui peuvent être récolté dans les musées ou certains gisements peuvent ainsi servir à l'établissement d'un historique de la contamination par le plomb. Cette décroissance a été également signalée chez la loutre de mer par Smith *et al.* (1990).

Au niveau des écosystèmes, les recherches concernant les rapports isotopiques du plomb sont très peu nombreuses.

En écosystème aquatique d'eau douce, citons les travaux de Gelinas et Schmit (1997) sur la rivière des Hurons (bassin hydro-géographique agricole canadien). Ces recherches concernent l'ensemble de l'écosystème avec, pour le compartiment biologique, le plancton, les algues (*Cladophora*), des macrophytes (Potamot, Cératophylle et des lentilles d'eau), des limnées, des gammares et des poissons (goujons) et, pour le compartiment abiotique, l'eau, les matières en suspension, les sols. Selon ces auteurs, les rapports isotopiques du plomb des dépôts atmosphériques et des sols agricoles sont significativement différents. Cette différence permet de mettre en évidence une prise préférentielle du plomb d'origine atmosphérique par rapport au plomb du sol agricole avec comme hypothèse, une grande mobilité et biodisponibilité du plomb atmosphérique.

Les résultats sur les macro-invertébrés sont variables, mais le rapport isotopique des goujons montre que la signature isotopique est conservée le long de la chaîne alimentaire. Par contre, dans un autre cours d'eau de type urbain, avec moins de matières en suspension, 95% de la teneur des tissus en plomb est d'origine anthropogénique. Par ailleurs, il existe une relation directe entre l'augmentation des concentrations en plomb total des sols et la baisse du rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$.

En ce qui concerne l'Homme, l'étude de Keinonen (1992) est complète en intégrant dans une étude environnementale et pour la région d'Helsinki (Finlande), les sources d'émission (essence, incinérateurs, fonderie, combustion de charbon), l'air et les compartiments de dépôts ou d'accumulation, les sols, les sédiments de lacs, les lichens, et pour l'Homme, le foie, le poumon et l'os (individus décédés entre 1976 et 1979) (tableau 56).

L'os peut être considéré comme le meilleur indicateur de la charge en plomb pour l'ensemble de la durée de vie, car le temps de présence du plomb dans l'os est de 30 à 70 ans.

Le foie et les poumons reflètent une accumulation récente (40 à 200 jours). C'est le foie qui accumule le plus de composés organiques du plomb (plomb tétra-alkyle des essences) et c'est dans le foie que l'on détecte un rapport isotopique inférieur par rapport au poumon et à l'os.

Le rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ permet d'affecter aux essences la contamination de l'air (fin des années 70) et du sol proche des autoroutes. Par contre, le rapport isotopique des lichens montre la contribution importante de sources industrielles (incinérateurs, fonderies, charbon).

L'étude des sédiments montre, en profondeur (âge supérieur à 100 ans), un rapport isotopique élevé, relevant d'une nature de plomb non anthropogénique, alors qu'en surface, les apports de plomb atmosphérique prédominent avec un rapport isotopique inférieur, proche de celui des essences, de l'air et des lichens.

Les rapports isotopiques des organes humains sont le reflet des émissions de plomb à partir des incinérateurs et des fonderies de la région de Helsinki dans les années 60 et 70. D'autres auteurs avaient précédemment analysé les rapports isotopiques du plomb dans le sang (Manton, 1977 ; Facchetti, 1979 ; Yaffe *et al.*, 1983).

V.2. Nomenclature des échantillons : Sols, poudres métalliques, poussières d'aciérie, hydroxydes métalliques après traitement physico-chimique. Escargots d'élevage, escargot contaminés en laboratoire, escargot transférés *in situ*.

L'étude concerne l'analyse des isotopes ^{206}Pb, ^{207}Pb et ^{208}Pb, selon la méthode exposée au chapitre V_2 de la deuxième partie, de différents échantillons numérotés selon la liste ci-dessous en fonction de leur nature et de leur provenance :

- Elevage de référence : farine Helixal® 2ème âge, pas de numérotation. Analyse impossible car Pb en trop faible quantité ;

Escargots d'élevage nourris 1 mois avec la farine Helixal® :

  - n°1 : Escargot 1;
  - n° 2 : Escargot 2.

- Expérience de contamination par la poudre de plomb ;

Poudre Prolabo Rectapur – Ref. 26476-293 – Emb. usine 84282, impuretés : Cu : 0,005 et Fe : 0,005.

  - Poudre de plomb : n°3 : 1er échantillon poudre, n°4 : 2ème échantillon poudre ;
  - Escargot nourris 1 mois avec farine Helixal® + poudre de plomb 25% : n°5: escargot 1, n°6: escargot 2.

- Expérience *in situ* : Bordure d'autoroute A31 (Bouxières-sous-Froidmont) ;

  - Sol bordure d'autoroute A31 (50 cm à 1 m de la bande d'arrêt d'urgence : n°7 : 1er échantillon sol, n°8 : 2ème échantillon sol ;
  - Sol agricole 300m de l'axe autoroutier : n°9: 1er échantillon sol, n°10 : 2ème échantillon sol ;
  - Escargot transféré 1 mois dans microcosme entre 50 et 1 m de la bande d'arrêt d'urgence (n°11).

- Expérience *in situ* sur le site de l'aciérie électrique ;

  - Poussières de l'aciérie électrique : n°12 : 1er Echantillon de poussière, n°13 : 2ème échantillon de poussières ;
  - Escargot transféré 1 mois sur le site de l'aciérie (n°14) ;

- Expérience *in situ* sur l'ancien site (Cedilor à Jouy-aux-Arches) et sur le nouveau site (Cedilor à Mallancourt-la-Montagne) d'un centre d'élimination des déchets industriels spéciaux ;

  - Nouveau site de Mallancourt-la-Montagne ;

- ❖ Hydroxydes métalliques résultant du traitement physico-chimique puis passage en filtre presse. Différents échantillons distingués par la couleur du « gâteau » de filtre presse ;

  - ➢ Gris clair : n°15 : 1 échantillon ;
  - ➢ Noir : n°16 : 1er échantillon, n°17 : 2ème échantillon ;
  - ➢ Jaune : n°18 : 1er échantillon, n°19 : 2ème échantillon ;
  - ➢ Mélange (1/3 gris clair + 1/3 noir + 1/3 jaune) : n°20 : 1er échantillon, n°21 : 2ème échantillon.

- ❖ Escargots transférés 1 mois à proximité de l'unité de traitement physico-chimique : n°22 : escargot 1, n°23 : escargot 2.

- Site ancien de Jouy-aux-Arches après remédiation ;

  - ❖ Terre de recouvrement, 3ans après végétalisation. Récolte d'échantillons de sol selon un transect correspondant à la situation des microcosmes avec prélèvement de 2 échantillons au niveau de 3 sous-stations puis mélange : n°24 et 25 : 1ère sous-station, n°26 et n°27 : 2ème sous-station, n°28 et n°29 : 3ème sous-station, n°30 et n°31 : mélange par 1/3 des échantillons des 3 sous-stations ;

  - ❖ Escargots transférés 1 mois sur le site : n°32 : escargot 1, n°33 : escargot 2.

- A titre de comparaison deux références ont été surimposées sur les graphiques à savoir :

  - n° 34 : Rapports isotopiques dans les eaux de ruissellement de chaussée (données IRH-SP Nancy) ;
  - n° 35 : Rapports isotopiques du minerai de plomb issu de la mine de Brokken-Hill (Doucet, 1997).

V.3. Résultats et discussion

L'étude des corrélations entre les rapports isotopiques des différents isotopes pris deux par deux (figure 77a : $^{208}Pb/^{206}Pb$ et $^{206}Pb/^{207}Pb$; figure 77b : $^{206}Pb/^{207}Pb$ et $^{208}Pb/^{207}Pb$; figure 77c : $^{208}Pb/^{206}Pb$ et $^{208}Pb/^{207}Pb$) met en évidence l'existence de corrélations hautement significatives, soit négative (R^2 : 0,81, figure 77a) soit positive (R^2 : 0,85, figure 77b), à significative et négative (R^2 : 0,44, figure 77c) avec, aux extrémités des droites de régression, un pôle qui peut être qualifié « essence » ou « trafic » représenté par le sol de bordure d'autoroute (références 7 et 8) et un pôle qui peut être qualifié de « naturel » représenté par le sol agricole à 300 m de l'autoroute (références 9 et 10). Cette présentation est renforcée par la situation du point 35, sur-imprimé au graphique figure 77a concernant le minerai de plomb issu de la mine de Brokken-Hill (Doucet, 1997) qui fournit le plomb pour les essences commercialisées en France. Ceci correspond aussi pour le rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ aux données de Roy (1996) concernant les essences en France, de Keinonen (1992) pour un sol de proximité autoroutière ($^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,136), aux données de Gelinas et Schmit (1997) pour un sol agricole ($^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,274) et enfin aux données de Taylor et Mc Lennan (1995) sur la croûte continentale supérieure ($^{206}Pb/^{207}Pb$ = 1,192-1,215).

Dans l'étude de l'autoroute A31, la contamination du sol de proximité est presque exclusivement d'origine « trafic », l'abaissement du rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ par rapport à la référence 35 indique la combustion d'essences d'origines variées par exemple d'essences anglaises à rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ de 1,059 à 1,079 donc inférieur à celui du minerai de Brokken-Hill (Australie).

En ce qui concerne le rapport isotopique $^{206}Pb/^{207}Pb$ de l'escargot référence 11 transféré en bordure d'autoroute, il y a, par rapport à la situation des escargots avant transfert (références 1 et 2), une décroissance du rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ et un déplacement vers le pôle « essence » tout en n'atteignant pas le rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ encore inférieur de l'essence.

Le rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ évolue, en effet, selon la décroissance suivante :

Elevage (références 1 et 2 : 1,161) > Escargot transféré à proximité autoroutière (référence 11 : 1,151) > Minerai de Brokken-Hill, essence française (1,13) > Sol de proximité autoroutière A31 (références 7 et 8 : 1,12).

La capacité des escargots à fournir une information sur l'origine de la contamination par le plomb est vérifiée en ce qui concerne le transfert sur le site de l'aciérie électrique avec une situation très groupée d'une part, des références 12 et 13 concernant les rapports isotopiques des poussières et, d'autre part, de la référence 14 concernant les rapports isotopiques de l'escargot transféré 1 mois sur site.

Il en est de même, mais dans une moindre mesure, en ce qui concerne le transfert des escargots sur le site de Cedilor Mallancourt (références 15 à 23). Dans ce cas, la contamination est liée à des sources de multiples origines en fonction des déchets à inerter par traitement physico-chimique et dont la diversité se voit par les couleurs différentes des boues d'hydroxydes métalliques obtenus. La réponse, chez l'escargot, est également variable : l'escargot 1 (référence 22) présente un rapport isotopique variant peu par rapport à l'escargot d'élevage (référence 1) alors que l'escargot 2 (référence 23) présente un déplacement des rapports isotopiques vers le pôle « naturel » (points 9 et 10). Dans ce cas, on peut proposer que cet individu ait été plus en contact avec des poussières relevant d'une composition isotopique plus proche du pôle « naturel ». Selon Metzger (1998), un rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ de 1,15 à 1,16 signale une activité anthropique de type industriel, ce qui correspond au rapport $^{206}Pb/^{207}Pb$ de 1,167 pour l'escargot de référence 23.

L'étude isotopique, en laboratoire, après ajout à l'aliment d'une poudre de plomb d'origine connue, permet de constater la sensibilité de la réponse chez l'escargot. En effet, les escargots d'élevage, nourris seulement avec la farine Helixal®, présentent un rapport isotopique $^{206}Pb/^{207}Pb$ de 1,161 ; après 1 mois en présence de farine contaminée par une poudre de plomb de rapport isotopique $^{206}Pb/^{207}Pb$ de 1,174 à 1,175 (références 3 et 4), celui-ci augmente également chez les escargots avec un rapport isotopique $^{206}Pb/^{207}Pb$ du même ordre de grandeur : 1,170 à 1,177 (références 5 et 6). La connaissance du minerai d'origine de la poudre aurait pu fournir une indication supplémentaire mais la firme commercialisant la poudre n'a pas souhaité ou pu fournir cette indication.

L'expérience de transfert d'escargots sur le site remédié de Cédilor-Jouy-aux-Arches (référence 24 à 33) est un cas intéressant, très différent des précédents. En effet, alors que les échantillons de sol (références 24 à 31) présentent des rapports isotopiques $^{206}Pb/^{207}Pb$ groupés entre 1,183 et 1,187, proches du pôle « naturel » et en adéquation avec les données de Croudace et Cundy (1195) pour le plomb naturel dans les sols, les escargots transférés sur le site présentent par rapport au lot d'origine (référence 1 et 2 à rapport isotopique $^{206}Pb/^{207}Pb$ de 1,161) un abaissement de ce rapport à 1,152-1,153 donc un déplacement vers le pôle « essence ». Il y a donc une nette discordance sur l'origine du plomb bioaccumulé et celui présent dans le sol, entre le diagnostic à partir du sol et celui à partir des escargots.

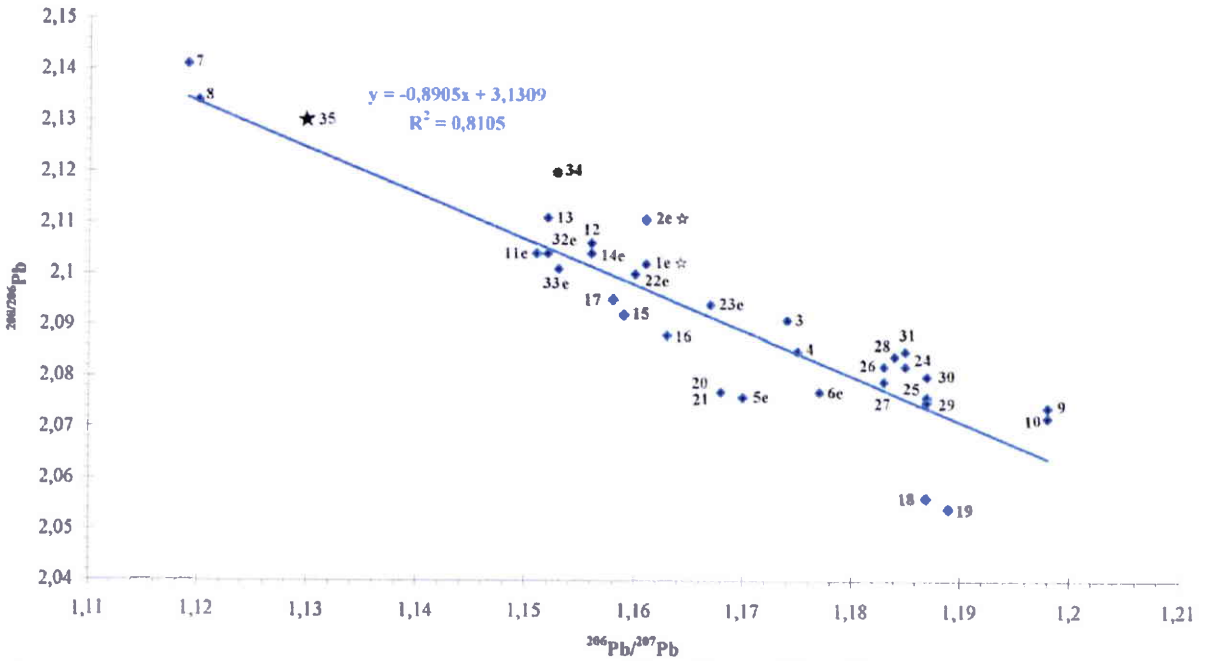


Figure 77a : Corrélation entre les rapports isotopiques $^{208}Pb/^{206}Pb$ et $^{206}Pb/^{207}Pb$

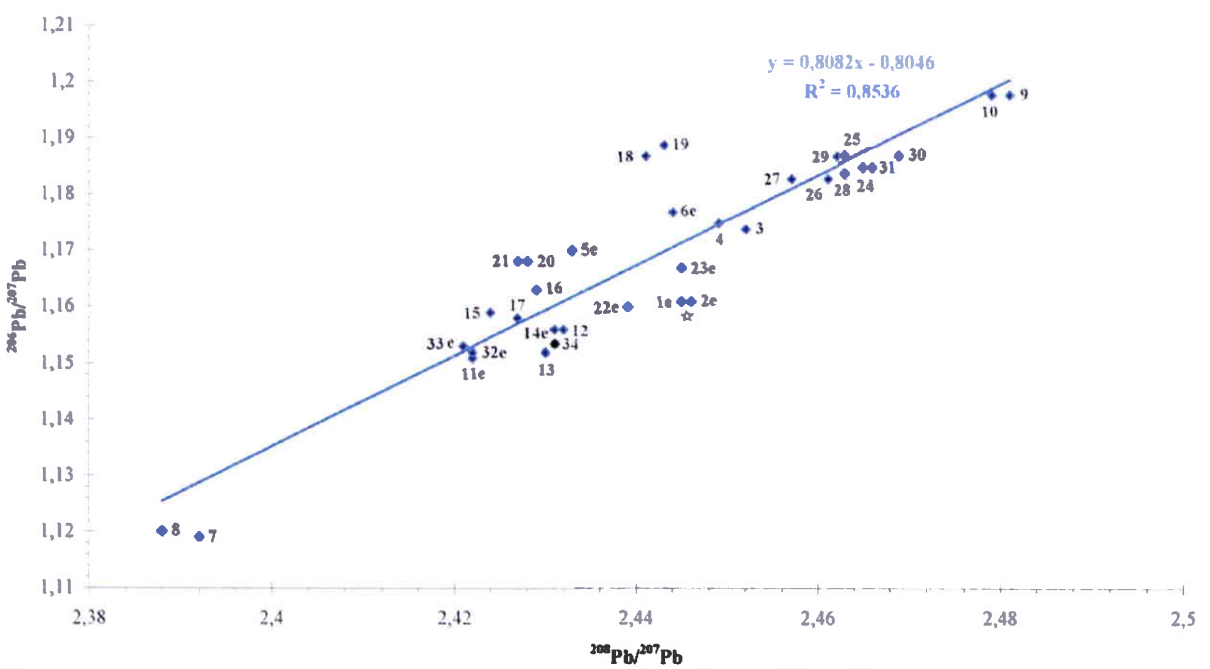


Figure 77b : Corrélation entre les rapports isotopiques $^{206}Pb/^{207}Pb$ et $^{208}Pb/^{207}Pb$

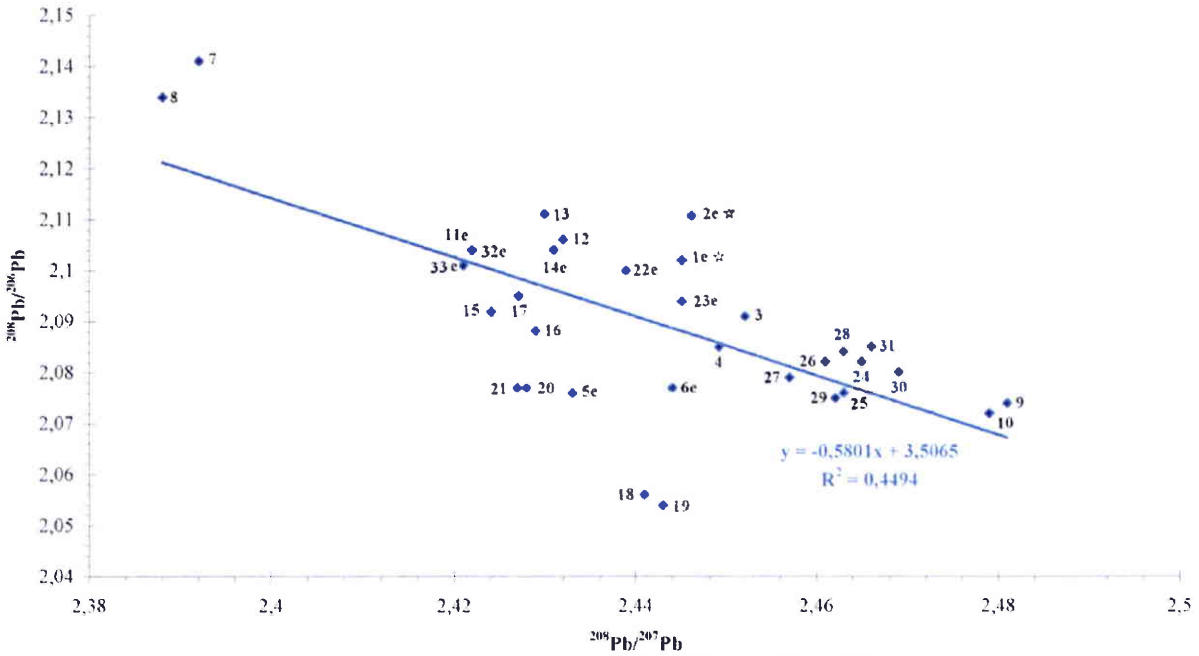


Figure 77c : Corrélation entre les rapports isotopiques $^{208}Pb/^{206}Pb$ et $^{208}Pb/^{207}Pb$

La connaissance du site permet de proposer une hypothèse explicative. En effet, le site, en flanc de colline, est sous l'influence des rejets liés à un trafic automobile très important du fait de l'existence proche d'une nationale à trafic élevé permettant de rejoindre soit l'autoroute A31 (saturée), soit une très importante zone commerciale péri-urbaine (Metz) connue pour ses embouteillages. Dans le cas présent, il apparaît donc comme plausible que les escargots reflètent plus rapidement que les sols une contamination d'origine « trafic » en consommant une végétation herbacée dense faisant écran protecteur vis-à-vis du sol.

L'abondance de la végétation et sa diversité (annexe 1) peut aussi expliquer une moindre consommation du sol et plus de consommation de parties vertes aériennes recevant les dépôts atmosphériques contaminés par le plomb d'origine « trafic ». Hopper *et al.* (1991) signalent les rapports isotopiques $^{206}Pb/^{207}Pb$ variant de 1,13 à 1,155 dans les aérosols d'Europe de l'ouest.

Il convient également de prendre en considération la possible contamination par les rejets atmosphériques de l'activité industrielle de Cedilor avant sa fermeture (unité d'évapo-incinération et traitement physico-chimique).

L'argumentation a été principalement faite en considérant le rapport isotopique $^{206}Pb/^{207}Pb$ car c'est celui dont on possède le plus de données ; cependant, elle demeure inchangée quant à ses conclusions si on prend en compte les autres rapports isotopiques. L'étude bibliographique a montré l'intérêt de l'étude des isotopes du plomb dans le matériel biologique végétal (lichens et anneaux de croissance de différentes espèces d'arbres). Cette première étude originale concernant des mollusques gastéropodes terrestres permet de diversifier les organismes permettant un diagnostic sur l'origine de la contamination par le plomb.

CONCLUSION DE LA TROISIEME PARTIE

Les escargots peuvent être retenus comme bioindicateurs de contamination et être utilisés pour détecter et quantifier les niveaux de pollution du biotope et de la biocénose en mesurant les concentrations en micropolluants métalliques, biologiquement disponibles, directement dans l'organisme entier ou plus efficacement, comme nous l'avons vu, dans la masse viscérale.

Parmi les critères établis par Butler *et al.* (1971), Haug *et al.* (1974), Philips (1977) et O Brian *et al.* (1993) pour le choix d'une espèce bioindicatrice, les escargots, et plus particulièrement *Helix aspersa aspersa*, présentent un bilan très favorable :

- Ils accumulent certains métaux dans une gamme allant de la microconcentration à la macroconcentration ;
- Ils tolèrent des variations des conditions du milieu ;
- Ils sont présents, comme nous l'avons vu, sur des zones polluées ou peuvent y être transférés ;
- Leurs déplacements sont limités et ils peuvent être considérés comme sédentaires et représentatifs de la zone de collecte ;
- L'aire géographique est très étendue, ce qui permet des comparaisons entre des sites très éloignés ;
- Les populations sont abondantes et les individus peuvent être récoltés rapidement et en quantité suffisante ;
- La durée de vie est suffisante pour permettre l'échantillonnage de plusieurs classes d'âge ;
- La taille est suffisante pour permettre des analyses sur l'organisme entier et même sur certains groupes d'organes ou organes séparés ;
- L'identification et l'échantillonnage de l'espèce sont facilement réalisables sur le terrain ;
- L'élevage est accessible par tout laboratoire et des aliments contrôlés sont désormais disponibles et permettent la production d'individus proches d'un standard.

Les escargots sont en étroite association avec leur biotope ce qui permet une exposition optimale. Il faut souligner la surface de contact entre l'animal et le sol lorsque le pied est étendu ; l'absorption d'eau, de terre, de végétaux, d'air en ce qui concerne les gastéropodes pulmonés. Le niveau de contamination est donc le reflet direct ou indirect de celui de ces différentes sources.

L'étude des lots provenant de la nature a montré la possibilité de disposer d'animaux témoins provenant de zones non polluées avec, dans les cas les plus favorables, des concentrations en métaux inférieurs à celles d'animaux d'élevage dont l'aliment n'est pas contrôlé en ce qui concerne la concentration en métaux.

La capacité bioindicatrice par bioaccumulation a d'ailleurs pour corollaire la nécessité du contrôle de l'aliment utilisé en héliciculture et également celle des effectifs récoltés en milieu naturel pour la consommation humaine.

Le critère non respecté pour tous les métaux retenus est celui de l'existence d'une corrélation simple entre la charge polluante dans l'organisme et la concentration moyenne dans le biotope étudié. Nous avons mis en évidence une efficacité supérieure en analysant la masse viscérale ceci en liaison, d'une part avec les fonctions spécifiques de la glande digestive dans la décontamination et, d'autre part avec son volume important.

Le rein, bien que de volume moindre que celui de la glande digestive, représente aussi, dans la masse viscérale, un organe mobilisé dans l'élimination des métaux (*Cf.* 4ème partie).

Sur les 8 métaux étudiés, il apparaît que la corrélation est significative et positive entre la concentration dans l'aliment et la concentration dans l'organisme : pour le cuivre dans le pied et la masse viscérale avec macroconcentration, pour le zinc dans la masse viscérale avec microconcentration, pour le manganèse dans les viscères avec déconcentration, pour le plomb dans le pied avec déconcentration. Pour le cadmium dans les viscères, il y a macroconcentration mais la corrélation n'est pas significative pour la gamme de concentration en cadmium dans l'aliment qui a été étudiée. Pour les autres métaux (Ni, Fe et Cr), nous avons cependant proposé une grille de contamination qui permet d'établir une hiérarchie dans la contamination des sites étudiés sans qu'il soit possible d'en déduire le niveau moyen de contamination. La sommation des indices de classes obtenus pour chacun des métaux permet l'établissement d'un indice polymétallique (ICPM), reflet de la contamination métallique globale.

QUATRIEME PARTIE :

ETUDE HISTOLOGIQUE ET MICROANALYTIQUE DE LA CONTAMINATION POLYMETALLIQUE CHEZ *HELIX ASPERSA ASPERSA*

Introduction

Cette partie traitant de l'histologie optique, électronique et de la microanalyse EDX et EEL est structurée avec pour objectif de suivre la pénétration puis la circulation et l'excrétion des métaux dans l'organisme à savoir :

- **La voie principale de pénétration qui est la voie digestive avec selon l'ordre anatomique**
  - **La glande digestive et ses lobules (chapitre I)**
  - **L'intestin proximal (chapitre II)**

Ce choix a été fait en tenant compte des données bibliographiques (*Cf.* 1ère partie, chapitre III). Des études ultérieures, sur les autres structures digestives, doivent cependant être entreprises pour réaliser un bilan complet sur le transit des métaux par la voie digestive.

- **La voie principale d'élimination par le rein (chapitre III) avec prise en compte :**
  - **Des néphrocytes**
  - **Du canal excréteur**

Cette étude du rein a été spécialement développée compte tenu des études antérieures, moins approfondies que celles concernant le tube digestif. Le **chapitre IV** concerne une comparaison des concrétions de la glande digestive et du rein chez *Helix aspersa aspersa.* Une comparaison des concrétions de la glande digestive et du rein entre *Helix aspersa aspersa* et *Helix pomatia* fait l'objet du **chapitre V**.

- **Les cellules sanguines circulantes (hémocytes) réalisant une part importante du transfert des organes de pénétration vers les organes d'excrétion**
- **Les cellules spécialisées du conjonctif péri-viscéral et pédieux telles que les « pore cells » et les cellules à calcium du conjonctif font l'objet du chapitre VI. Une observation préliminaire concerne également la localisation du plomb dans les neurocytes**

Le **chapitre VII** présente une synthèse avec proposition et discussion des voies de passage, de transport et d'élimination de la silice et des métaux.

La contamination a été effectuée, principalement, par ajout de métaux sous forme particulaire (poudre de zinc ou de plomb et poussières d'aciérie électrique) dans l'aliment ou le sol. La contamination par ajout d'un sel de cadmium lors de l'expérience préliminaire de l'essai inter-laboratoire du test de croissance, a donné lieu à une recherche de localisation du cadmium.

Pour des raisons d'allégement des légendes des planches histologiques, les abréviations sont explicitées dans la liste des abréviations jointe en annexe.

Chapitre I : Rôle de la glande digestive dans l'absorption des métaux sous forme particulaire ou dissoute.

I.1. Etude histologique de la glande digestive chez le témoin (microscopie optique et électronique)

Les données bibliographiques (*Cf.* partie I, chapitre III) étant importantes, l'étude entreprise a eu pour objectif de connaître la structure et l'ultrastructure des différents types cellulaires de la glande digestive afin de préciser ultérieurement la localisation des différents métaux dans les organites cellulaires.

La figure 78 donne une représentation schématique des deux types cellulaires, cellule digestive et cellule à calcium, d'un lobule de la glande digestive réalisée à partir d'observations en microscopie optique et électronique dont les planches IV_1 à IV_6 fournissent une représentation.

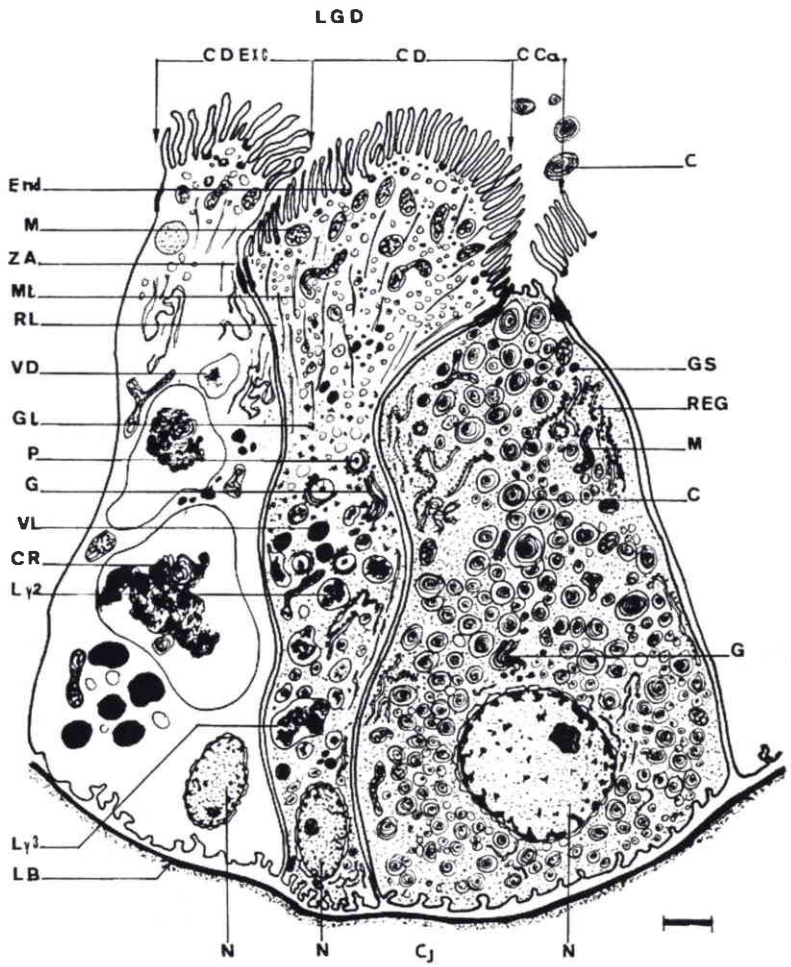


Figure 78 : Représentation schématique de l'ultrastructure des différents types cellulaires d'un lobule de la glande digestive (échelle = 1 µm).
CD : cellule digestive dans la phase d'assimilation ; CD Exc. : cellule digestive dans la phase d'excrétion ; C. Ca : cellule à calcium
Légendes : *Cf.* liste des abréviations

I.1.1. Les cellules digestives

Les cellules digestives sont des cellules à bordure en brosse, faisant protubérance dans la lumière de la glande digestive, avec un noyau basal d'environ 2µm dans le plus grand diamètre. La jonction apicale intercellulaire est réalisée par des *zonula adherens*. L'activité d'endocytose est importante à la base des microvillosités, plus sont abondantes chez la cellule digestive en phase d'assimilation que chez la cellule en phase d'excrétion. La membrane cytoplasmique basale présente de nombreuses invaginations (planche IV_4, figures 1 à 5).

I.1.1.1. La cellule digestive en phase d'assimilation (planche IV_1, figures 1 à 4)

La cellule digestive en phase d'assimilation présente, dans le cytoplasme apical, de nombreuses mitochondries avec des crêtes transversales, des vésicules d'endocytose, des microtubules, des vésicules lipidiques en formation et du glycogène en rosette. Le cytoplasme médian se caractérise par un appareil de Golgi actif (lysosomes primaires), des péroxysomes à nucléoïde avec leur cupule de réticulum endoplasmique, des vésicules lipidiques bien formées, des mitochondries et peu de réticulum endoplasmique lisse. Le cytoplasme basal montre un accroissement du volume des lysosomes secondaires puis tertiaires.

I.1.1.2. La cellule digestive en phase d'excrétion (planche IV_1, figures 2 à 3)

La cellule digestive en phase d'excrétion se caractérise par son importante vacuolisation et par l'accroissement du volume des vésicules lipidiques. Les corps résiduels présentent des figures myéliniques et des lipofuscines. En observation *in vivo*, les corps résiduels sont colorés en jaune. Dans le cytoplasme, on note la présence de grains de phosphate de calcium et dans les citernes du réticulum endoplasmique lisse des accumulations d'hémocyanine. Les cellules en phase d'excrétion sont moins nombreuses que les cellules en phase d'assimilation : au maximum 2 à 3 par lobule.

I.1.2. Les cellules à calcium (planche IV_1, figures 1, 2 et 4)

Les cellules à calcium se caractérisent par un remplissage du cytoplasme par de très nombreuses concrétions de différentes tailles. Leur forme est soit celle d'une bouteille à base plus ou moins globuleuse avec un noyau basal sphérique plus volumineux que celui des cellules digestives avec un diamètre de 4µm. Le pôle apical est restreint, entouré par les protubérances apicales des cellules digestives. Certaines concrétions sont proches d'être libérées dans la lumière de la glande digestive. Les organites cytoplasmiques sont moins diversifiés que dans la cellule digestive avec du réticulum endoplasmique granuleux, des mitochondries, du Golgi et des grains de sécrétion s'accumulant vers le pôle apical.

Les concrétions présentent des couches concentriques dont certaines se colorent en bleu-violet par le bleu de toluidine. Le noyau de chaque concrétion est en général plus clair.

En microscopie électronique, planche IV_5 figures 2 et 3, chaque concrétion se forme dans une vacuole à membrane simple et montre une succession de couches électrondenses et non électrondenses. A la périphérie, l'électrondensité se renforce et du matériel fibrillaire ou granuleux est en cours de condensation.

La coloration de Möller des coupes de la glande digestive du témoin n'est jamais positive, ce qui permet de conclure à l'absence de plomb (planche IV_1, figures 2 et 3). La coloration jaune à brune des corps résiduels existe déjà *in vivo*.

Planche IV_1 : Histologie de la glande digestive d'un animal témoin (échelle = 10 µm)

1- Coupe transversale dans un lobule de la glande digestive (coupe à la paraffine colorée au trichrome ; G x 400)

Cellules à calcium peu colorées avec un noyau sphérique volumineux (∅ = 4 µm).
Cellules digestives à bordure en brosse. Leur noyau est plus petit (∅ = 2 µm) que celui des cellules à calcium. Le cytoplasme est coloré en bleu-vert, au pôle apical, avec la présence de vacuoles digestives, augmentant de taille et se colorant en rouge vers le pôle basal.

2- Coupe transversale d'un lobule de la glande digestive (coupe à la paraffine colorée au Möller et au bleu de toluidine ; G x 400)

Il n'y a aucune réaction positive au Möller.
Les cellules à calcium présentent des concrétions colorées en rose-violet avec des couches concentriques.
Les cellules digestives sont d'aspect granuleux. Trois cellules sont au stade dit « excréteur » avec un volumineux corps résiduel coloré déjà « *in vivo* » en jaune brun, formé dans un phagolysosome ou lysosome tertiaire.

3- Corps résiduel dans les cellules digestives au stade d' »excrétion (coupe à la paraffine colorée au Möller seul ; G x 400)

Structure hétérogène du corps résiduel (lipides et lipofuscines)

4- Coupes transversales de plusieurs lobules de la glande digestive (coupe semi-fine colorée au bleu de toluidine ; G x 250)

Cellules à calcium avec des concrétions au centre clair et périphérie opaque.
Cellules digestives claires dont certaines avec de grandes vacuoles et des corps résiduels.
Dans le conjonctif inter-lobulaire, présence de cellules à calcium libres du conjonctif.

Planche IV_1

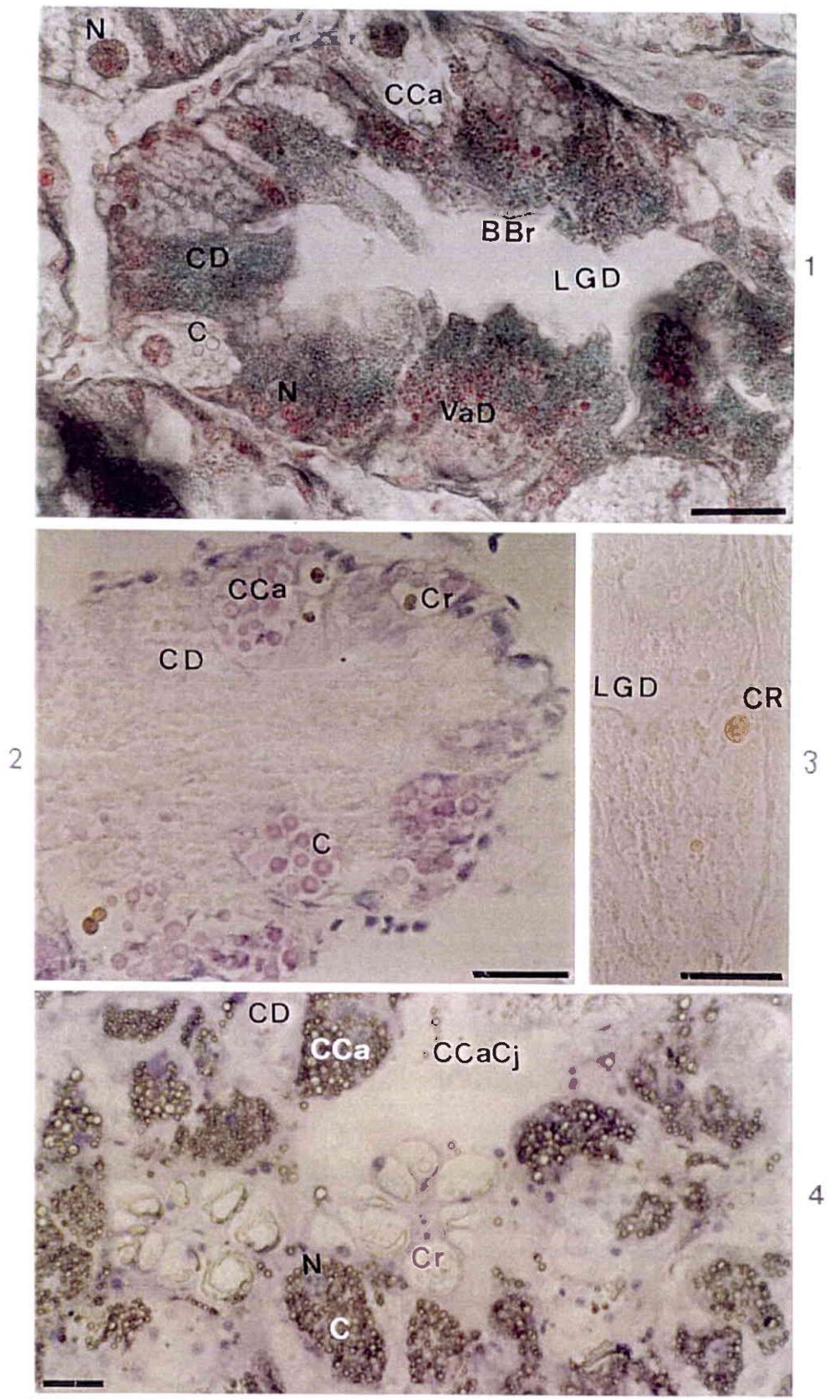


Planche IV_2 : Histologie de la glande digestive d'animaux de sites contaminés (1 et 2) ou contaminés par ajout de poudre de plomb dans la nourriture (3 et 4) (échelle = 10 µm)

- **1 et 2 : coupes transversales semi-fines dans les lobules de la glande digestive d'animaux transférés à proximité d'une autoroute**

1- Tissu n'ayant pas été traité aux sulfures (coloration au bleu de toluidine ; G x 400)

Cellules à calcium chargées en concrétions.
Cellules digestives au stade d'endocytose ou d'excrétion avec des vacuoles contenant des corps résiduels très opaques.

2- Tissu ayant été traité aux sulfures (pas d'autre coloration ; G x 250)

Cellules à calcium dont certaines concrétions donnent une réaction positive très noire.
Cellules digestives avec des vacuoles digestives qui sont colorées soit en noir soit en brun-vert.
Les corps résiduels ont une réaction très positive avec une formation de sulfures métalliques.

- **3 et 4 : coupes transversales dans les lobules de la glande digestive d'animaux contaminés par ajout de poudre de plomb dans la nourriture**

3- Coupe semi-fine (coloration au bleu de toluidine ; G x 250)

Cellules à calcium avec certaines concrétions très opaques.
Cellules digestives avec beaucoup d'entre elles au stade « excrétion ».
Les corps résiduels sont très denses et opaques.

4- Coupe à la paraffine (coloration au Möller seul ; G x 400)

Cellules à calcium avec des concrétions colorées en jaune et présence de grains opaques (présence de plomb).

Planche IV_2

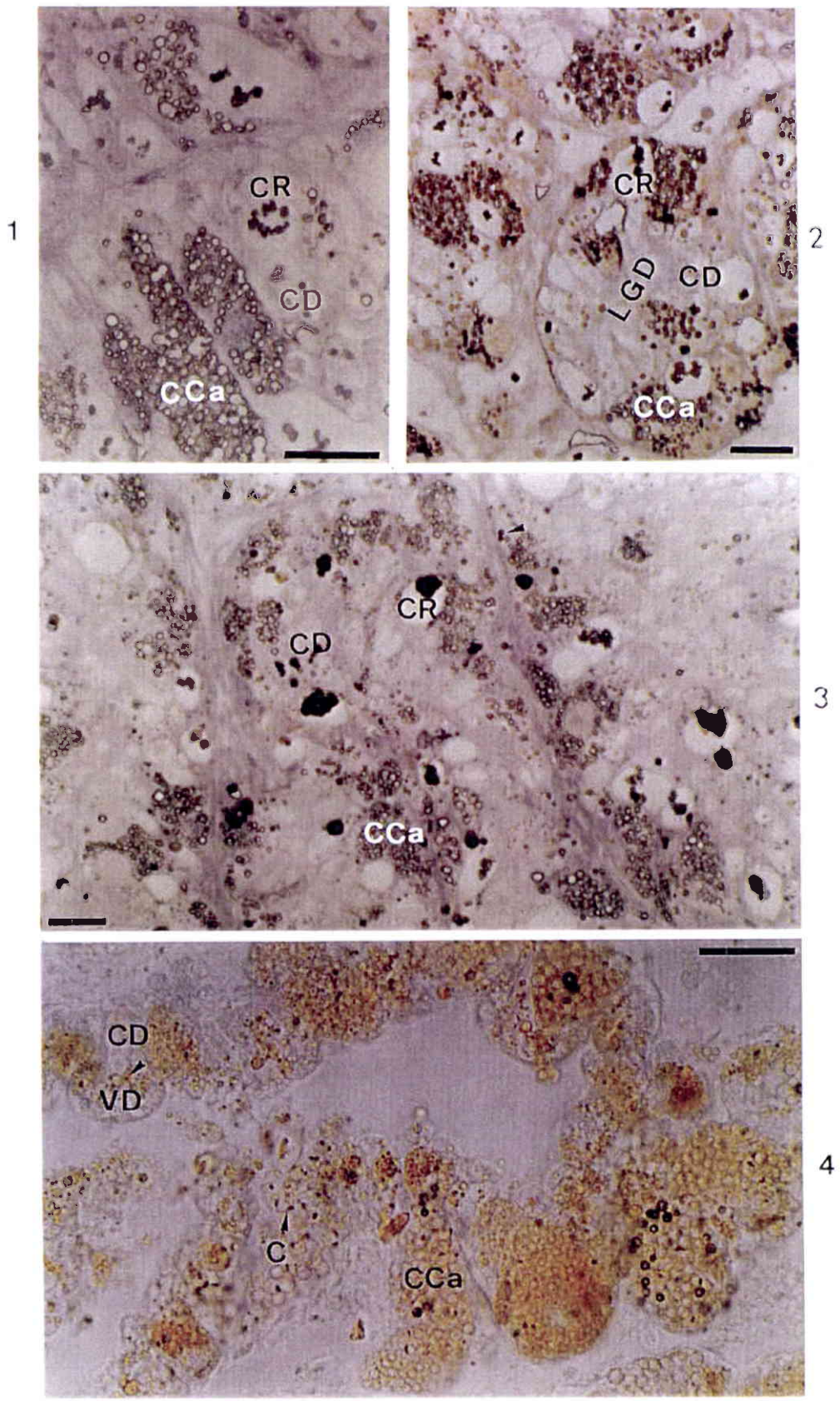


Planche IV_3 : Histologie de la glande digestive d'animaux contaminés par ajout de poudre de plomb dans la nourriture (échelle = 10 µm)

1- Coupe transversale d'un lobule avec un secteur de cellules à calcium et un autre de cellules digestives (coloration au Möller seul ; G x 1.000)

Cellules à calcium à réaction positive avec couronne de grains s'incorporant à la couche périphérique (Pb). Structure en couches concentriques des concrétions, bien visible. Réaction également positive au niveau des vacuoles cytoplasmiques des cellules digestives avec vacuoles digestives à grains métalliques et réaction positive (Pb).

2- Détail d'un secteur de lobule avec des cellules à calcium et des cellules digestives (coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 1.000)

Dans les cellules à calcium, présence très nette d'amas discontinus à réaction positive (Pb) à la surface des concrétions.
Dans les cellules digestives, réaction positive (Pb) visible dans certaines vacuoles mais en majorité masquée par l'affinité du bleu de toluidine mettant en évidence le contenu hétérogène des vacuoles formées par endocytose puis coalescence.

3- Détail d'un secteur de canal de la glande digestive (coloration au Möller seul ; G x 1.000)

Dans la lumière, présence de déchets cellulaires avec des concrétions libérées par les cellules à calcium des lobules et dans les cellules du canal de nombreuses vacuoles à réaction positive et grains opaques (Pb).

Planche IV_3

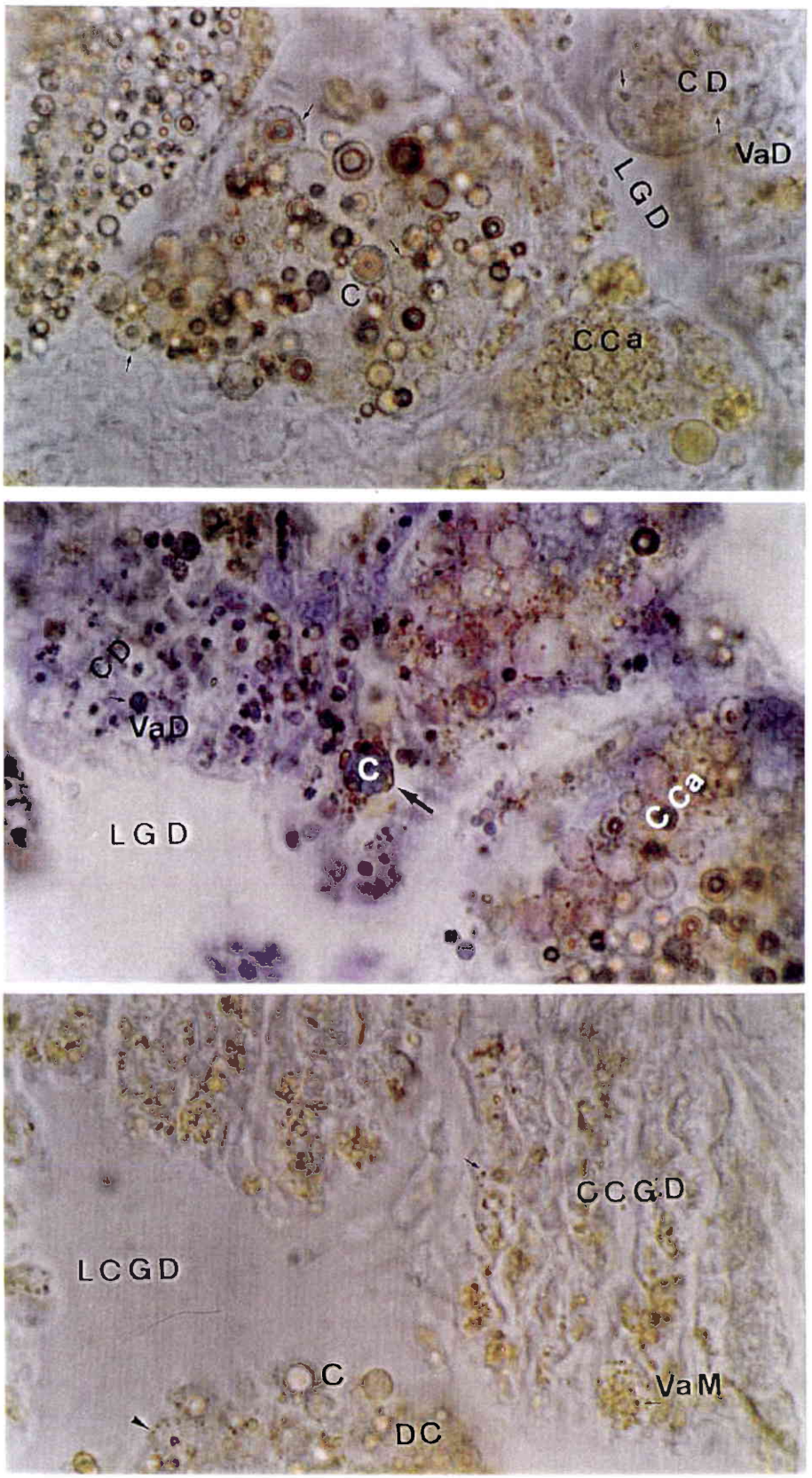


Planche IV_4 : Ultrastructure de la glande digestive d'un animal témoin (échelle = 0,5 µm)

1. **Microvillosités de la bordure en brosse du pôle apical d'une cellule digestive (G x 15.000)**

   Microfilaments d'actine au centre des microvillosités et jonction serrée entre deux cellules digestives voisines.

2. **Endocytose au pôle apical d'une cellule digestive (G x 15.000)**

   Présence de vésicules d'endocytose (vésicules à manteau), du REG pariétal, des mitochondries et d'un espace intercellulaire entre les membranes plasmiques latérales.

3. **Phagolysosomes d'une cellule digestive avec membrane, corps résiduel avec lipides et lipofuscines (G x 5.000)**

   Dans le cytoplasme notez la présence de vésicules lipidiques, d'hémocyanine, de dictyosomes, du REG et des péroxysomes.

4. **Agrandissement d'organites cytoplasmiques (G x 15.000)**

   Présence de trois vacuoles digestives avec membrane et corps résiduel.
   Dans le cytoplasme, présence de vésicules lipidiques, du REG associé à des péroxysomes, de grains de phosphate de calcium. Les péroxysomes présentent une membrane simple, un nucléoïde central et d'une matrice granuleuse.

5. **Détail de la biosynthèse de l'hémocyanine dans des vésicules du REL (G x 15.000)**

   Présence de mitochondries à crêtes sacculaires.

Planche IV_4

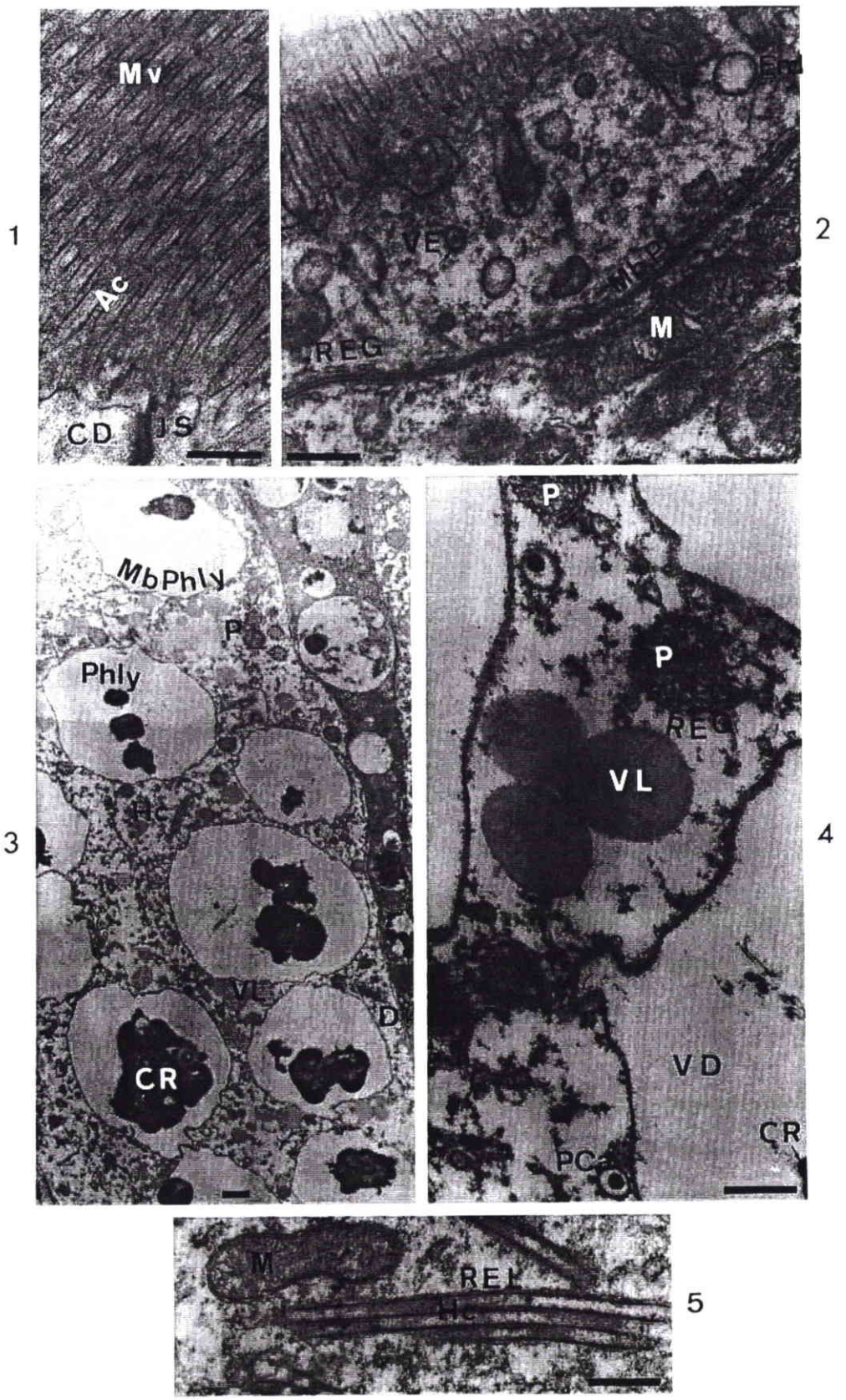

1
Mv
Ac
CD
S
2
VE
REG
M
3
MbPhly
P
Phly
Hc
VL
D
CR
4
P
P
REG
VL
VD
CR
PC
5
M
REL

Planche IV_5 : Ultrastructure de la glande digestive d'un animal témoin ; Cellule digestive (figure 1) et cellule à calcium (figures 2 et 3) (échelle = 0,5 µm)

1- **Détail d'un corps résiduel, d'une cellule digestive avec membrane du phagolysosome, lipides osmiophiles, début de figure myélinique, lipofuscine d'aspect granuleux (G x 20.000)**

2- **Cellule à calcium avec 4 concrétions de phosphate de calcium (sphérocristaux) contenu dans des vacuoles (G x 7.500)**

Le granule A est en cours d'expulsion vers la lumière de la glande digestive.
Le granule B est proche de la membrane apicale.
Les granules C et D sont plus en profondeurs.
Les granules A, C et D présentent des couches concentriques successivement électrondenses et non électrondenses révélant la nature mixte avec une partie minérale de phosphate de calcium et une partie organique osmiophile. La partie centrale du granule B a été énuclée pendant la coupe.
Les microvillosités appartiennent à une cellule digestive bordant l'autre côté de la lumière de la glande digestive.
Le cytoplasme présente un REG abondant, tubulaire et sacculaire ainsi que des grains de sécrétion et des mitochondries.

3- **Détail d'une concrétion (G x 15.000)**

Il y a une mise en évidence de la structure concentrique avec des couches électrondenses et non électrondenses.
Notez la membrane entourant la vacuole avec, en son centre, un ensemble minéralo-organique formé et, autour, de la matière non encore intégrée à la concrétion (*)
La partie centrale a été énuclée lors de la coupe.
Dans le cytoplasme il y a du REG, des mitochondries et une vésicule lipidique.

Planche IV_5

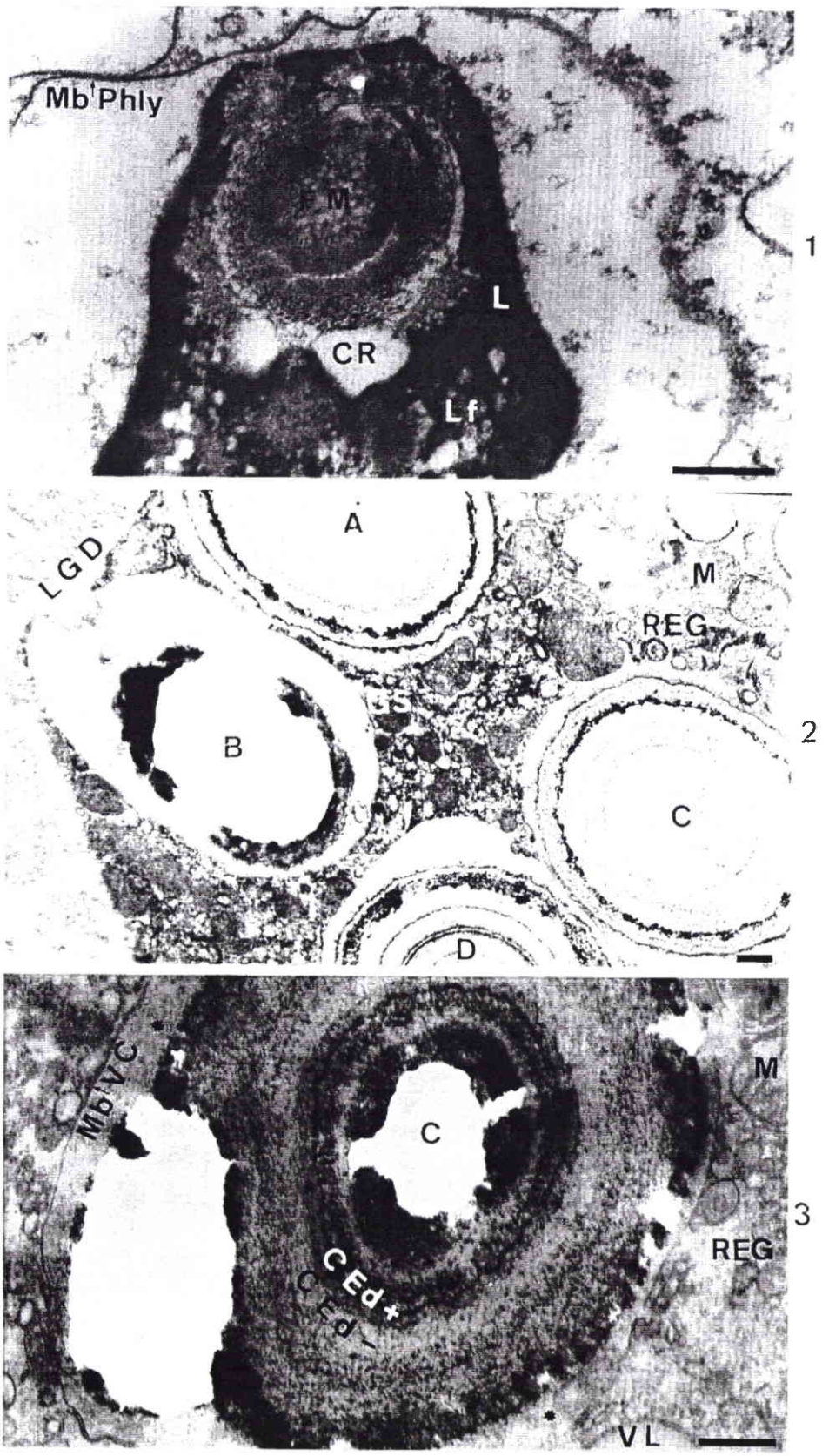


Planche IV_6 : Ultrastructure de la glande digestive d'animaux contaminés sur site autoroutier (fig. 1) ou par de la poudre de plomb dans la nourriture (fig. 2 et 3) (échelle = 0,5 µm)

1. **Détail de corps résiduels d'une cellule digestive et de concrétions de cellules à calcium (coloration au sulfure d'ammonium – G x 7.500)**

   La présence de métaux est mise en évidence dans les phagolysosomes et sur le pourtour de la concrétion en formation (le centre a été arraché lors de la coupe).

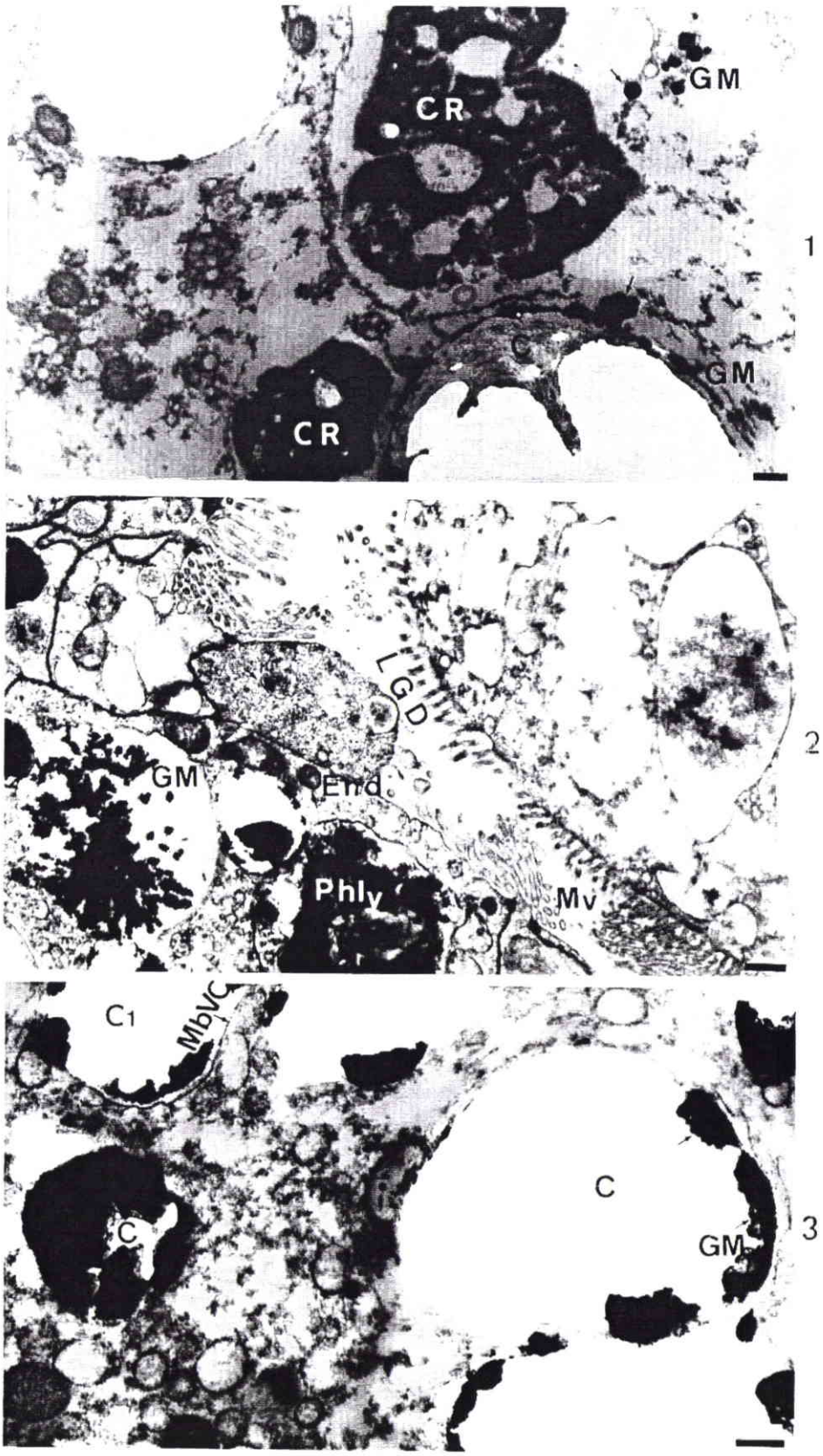
2. **Pôles apicaux de cellules digestives (G x 7.500)**

   Présence de microvillosités bordant la lumière de la glande digestive.
   Figures d'endocytose puis coalescence avec une formation de phagolysosomes contenant des granules métalliques (Pb).

3. **Cellule à calcium (G x 10.000)**

   Mise en évidence de l'incorporation en périphérie des concrétions, arrachées pendant la coupe, de granules métalliques formant des amas très électrondenses (Pb).
   La membrane de la vacuole enveloppant la concrétion est visible autour de la concrétion (1).

Planche IV_6



I.2. Etude histologique de la glande digestive d'escargots contaminés par des métaux.

I.2.1. Microscopie optique

Les lobules de la glande digestive d'individus transférés en proximité autoroutière donne une réaction positive aux sulfures métalliques (planche IV_2, figures 1 et 2).

Les lobules de la glande digestive d'individus contaminés par ajout de poudre de plomb dans la nourriture montrent des corps résiduels plus nombreux et plus volumineux (planche IV_2, figure 3). Après coloration au Möller (planche IV_2, figure 4), il y a une réaction positive à la présence de plomb, d'une part, dans les concrétions des cellules à calcium et, d'autre part, dans certaines vacuoles des cellules digestives. L'observation à fort grossissement (planche IV_3, figures 1 et 2), après coloration au Möller, met en évidence une réaction positive au plomb au niveau de la couronne de grains entourant les concrétions des cellules à calcium et une réaction positive dans les vacuoles digestives des cellules digestives.

Les cellules des canaux de la glande digestive présentent également (planche IV_3, figure 3) une réaction positive au niveau de très nombreuses vacuoles. La lumière du canal contient des concrétions expulsées par les cellules à calcium et présentant une couronne de grains à réaction positive au plomb.

I.2.2. Microscopie électronique (MET)

La coloration aux sulfures métalliques de coupes, provenant d'individus contaminés par ajout de poudre de plomb dans la nourriture, montre une réaction fortement positive au niveau des corps résiduels et des vacuoles digestives des cellules digestives (planche IV_5, figure 1 ; planche IV_6, figures 1 à 3) ainsi qu'au niveau des couches en formation des concrétions des cellules à calcium.

I.3. Etude par microanalyse de la localisation des métaux dans les cellules de la glande digestive

Le tableau 57 regroupe toutes les données de la microanalyse de la glande digestive.
Deux catégories cellulaires ont été étudiées à savoir :

- Les cellules digestives

Cette étude porte principalement sur les cellules digestives en phase d'assimilation.

Les cellules digestives en phase d'excrétion, à corps jaune, en nombre réduit, ont seulement pu être étudiées en microanalyse dans le cas de l'exposition aux poussières d'aciérie.

- Les cellules à calcium aussi appelées cellules basophiles (Cajaraville, 1995)

I.3.1. Les cellules digestives et discussion

I.3.1.1. Les cellules digestives

- ✓ Chez les témoins (tableau 57, ligne 1 ; planche IV_7, figure 1), les cellules digestives étudiées, par EDX, montrent la présence de vacuole d'endocytose confluant avec des vésicules lysosomiales. Aucun métal n'a été détecté. La présence de Si, P, S et de la matière organique (C, N et O) a été mise en évidence (Cl provient de la résine).
- ✓ En présence de poudre de zinc dans la nourriture (tableau 57, ligne 2 ; planche IV_7, figure 2), il y a bien pénétration de zinc particulaire, présence d'autres éléments (Si, P, S et Fe) et de matière organique (C, N et O) en voie de digestion.

- ✓ En présence de poudre de plomb dans la nourriture (tableau 57, ligne 3 ; planche IV_7, figure 3), il y a, au sein de phagolysosomes, des résidus organiques dont les parties électrondenses contiennent Zn, Pb, Fe, Cu ainsi que P, Ca, Mg et S. La partie non électrondense, périphérique aux inclusions, contient Pb, Zn, P et S (tableau 57, ligne 4 ; planche IV_7, figure 4).

- ✓ En présence de poussières d'aciérie dans la nourriture (tableau 57, lignes 5 à 7 ; planche IV_7, figures 5 à 7), il y a, d'une part, confirmation d'une absorption de Si associé à Al avec Mg et Ca dans les vacuoles présentant un floculum peu osmiophile (tableau 57, ligne 5 ; planche IV_7, figure 6). Des phagolysosomes, à inclusion osmiophile, contiennent Na, Si, S, Ca, Zn, Al, Mg et Fe (tableau 57, ligne 6 ; planche IV_7, figure 7). Du côté basal de la cellule digestive en phase excrétrice, dans de plus grands phagolysosomes, des corps résiduels de formes variées contiennent Na, Zn, Ca, Mg, Si et Al (tableau 57, ligne 7 ; planche IV_7, figure 5 et figure 79).

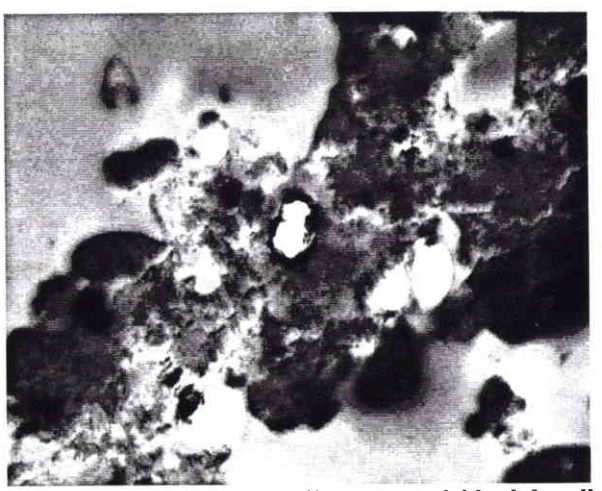
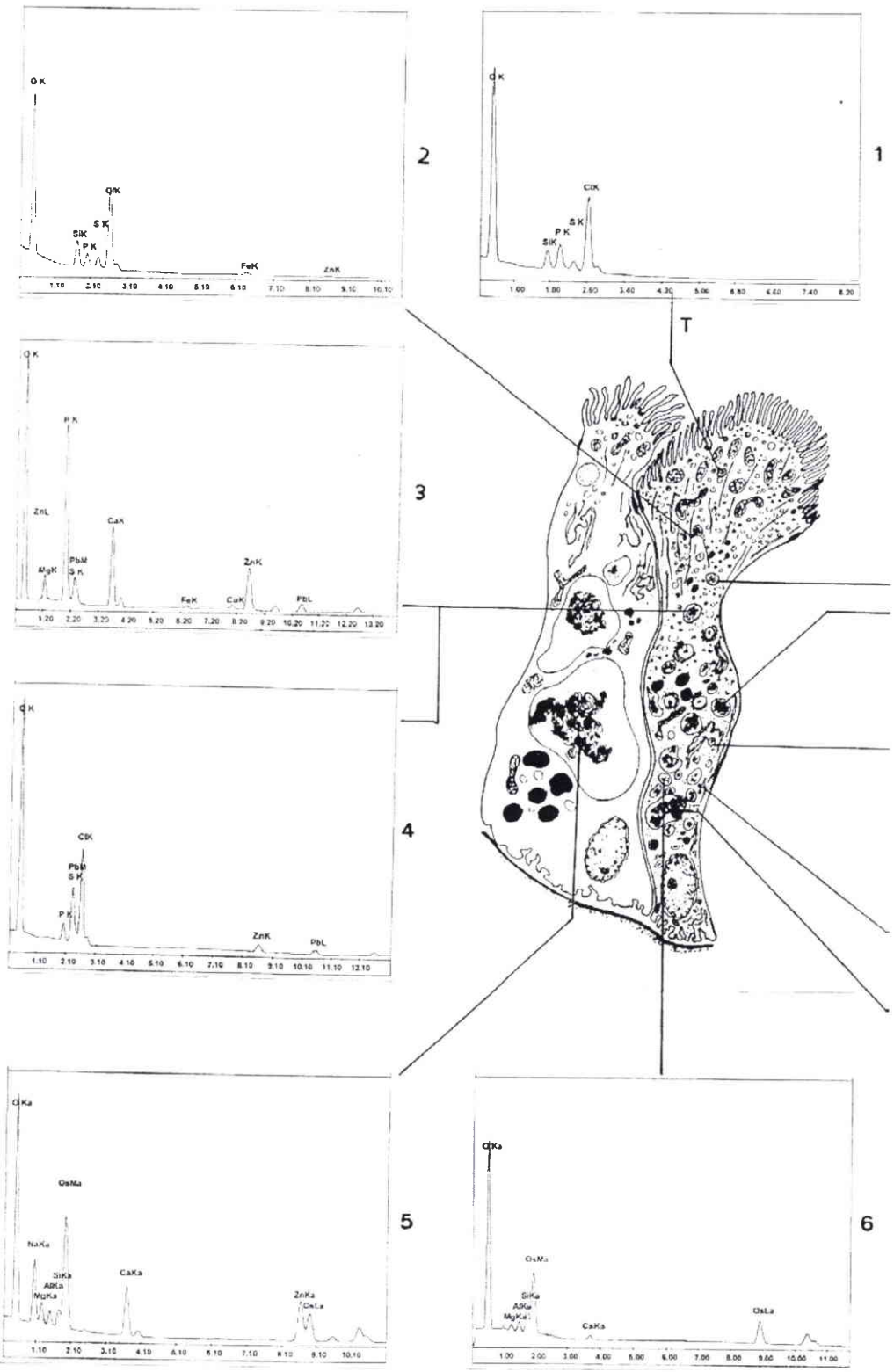
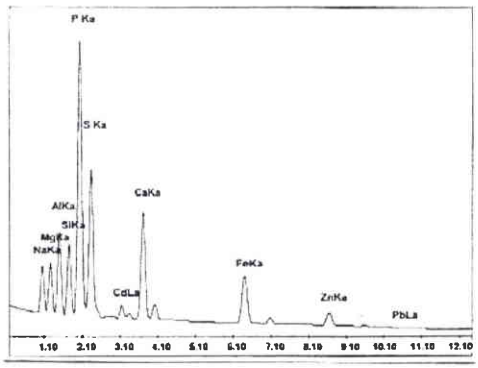


Figure 79 : Observation en microscopie électronique d'un corps résiduel de cellule digestive (G x 8.800)

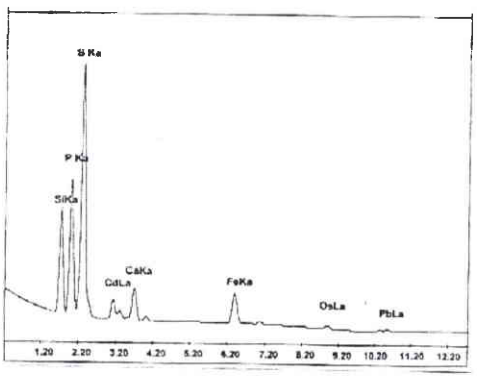
- ✓ Les escargots mis en présence de cadmium (444 ppm) dans le sol artificiel et pendant 4 semaines (planche IV_7, figure 8 à 11) présentent une grande diversité selon les organites étudiés :

Planche IV$_7$: Microanalyse de la localisation des métaux dans les cellules de la glande digestive

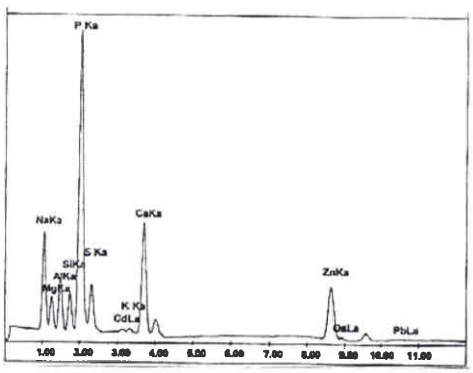



P Ka
S Ka
CaKa
AlKa
SiKa
MgKa
NaKa
CdLa
FeKa
ZnKa
PbLa
1.10 2.10 3.10 4.10 5.10 6.10 7.10 8.10 9.10 10.10 11.10 12.10

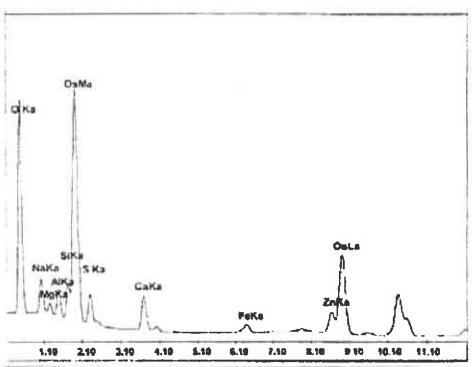
11


S Ka
P Ka
SiKa
CaKa
CdLa
FeKa
OsLa
PbLa
1.20 2.20 3.20 4.20 5.20 6.20 7.20 8.20 9.20 10.20 11.20 12.20

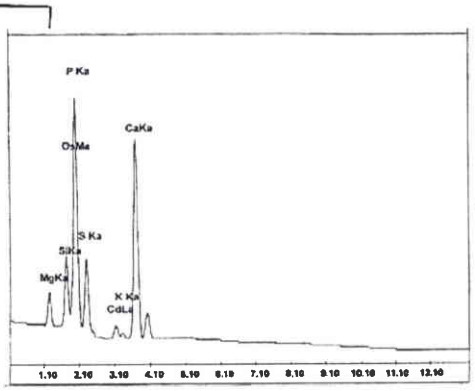
10


P Ka
NaKa
CaKa
S Ka
SiKa
AlKa
MgKa
K Ka
CdLa
ZnKa
OsLa
PbLa
1.00 3.00 4.00 5.00 6.00 7.00 8.00 9.00 10.00 11.00

9


OsMa
SiKa
NaKa
S Ka
AlKa
MgKa
CaKa
FeKa
OsLa
ZnKa
1.10 2.10 3.10 4.10 5.10 6.10 7.10 8.10 9.10 10.10 11.10

7


P Ka
OsMa
CaKa
S Ka
SiKa
MgKa
K Ka
CdLa
1.10 2.10 3.10 4.10 5.10 6.10 7.10 8.10 9.10 10.10 11.10 12.10

8

- Des grains électrondenses du cytoplasme (tableau 57, ligne 8 ; plancheIV$_7$, figure 8) riches en P et Ca contiennent aussi S, Si, Mg, Cd et K.

- Des vésicules lysosomiales à différents stades contiennent :

  ❖ Tableau 57, ligne 9 ; plancheIV$_7$, figure 9 : P, Na, Ca, Zn, Al, S, Si, Mg, Cd, K, (Pb) ;
  ❖ Tableau 57, ligne 10 ; planche IV$_7$, figure 10 : S, P, Si; Cd, Ca, Fe, Pb ;
  ❖ Tableau 57, ligne 11; planche IV$_7$, figure 11 : P, S, Ca, Al, Si, Na, Mg, Fe, Cd, Zn, (Pb).

I.3.1.2. Discussion

✓ Présence de Si et Al

Lorsque les animaux reçoivent comme nourriture, soit de la farine sans ajout, soit de la farine avec ajout de poudre de zinc et de plomb, l'élément Si est détecté, non associé à Al. En présence d'apport de sol naturel ou artificiel (poussières d'aciérie mélangées au sol et à la nourriture, sel de cadmium mélangé au sol artificiel contenant du kaolin) Si est très souvent associé à Al ce qui signale une origine terrigène de silicates d'alumine comprenant aussi K, Ca, Mg et Na.

✓ Présence de métaux

En dehors de l'élément ou des éléments métalliques fournis en ajout au sol ou à la nourriture (Zn, Pb, mélange de métaux dans le cas des poussières d'aciérie, Cd), d'autres métaux sont détectés et proviennent soit des éléments constitutifs de la farine soit des éléments constitutifs du sol artificiel (tourbe, kaolin).

Dans l'expérience d'ajout de poudre de zinc, le fer est détecté.

Dans l'expérience d'ajout de poudre de plomb, le fer et le cuivre sont détectés. La présence de cuivre est à rapprocher de la capacité de la cellule à réaliser la biosynthèse de l'hémocyanine.

En présence de poussières d'aciérie de composition variée, le zinc et le fer sont détectés. Le matériel analysé ayant fait l'objet d'un traitement au citrate de plomb, celui-ci n'a pas été retenu dans l'analyse du spectre.

En présence d'un sel de cadmium mélangé au sol artificiel, la diversité en autres métaux est maximale avec du zinc, du fer et du plomb à des niveaux bien supérieurs, pour le zinc et le fer, à ceux détectés lorsqu'il y a apport de farines. Il convient donc, dans l'avenir, de réaliser l'analyse des métaux présents dans les différents éléments constituant le sol artificiel.

✓ Présence de P, S et Ca

❖ Pour une grande proportion, il est convenu que les éléments P et S sont associés aux matières organiques. Cependant, la formation de sulfures métalliques est possible. Par ailleurs, le métabolisme particulier du calcium chez les gastéropodes explique la présence, au sein du cytoplasme, de grains en formation constitués de phosphates de calcium, de magnésium et de potassium (planche IV$_7$, figure 8). La présence simultanée de phosphates et de métaux lourds est fréquente :

- ❖ Planche IV_7, figure 3 : P, Ca, Fe, Cu, Zn, Pb
- ❖ Planche IV_7, figure 8 : P, Ca, Cd
- ❖ Planche IV_7, figures 9, 10 ou 11 : P, Ca, Cd, Zn, Fe, (Pb)

Aux éléments détectés par EDX, il convient d'ajouter le sodium détecté par analyse LAMMA dans le cas de la contamination par de la poudre de plomb (figure 80).

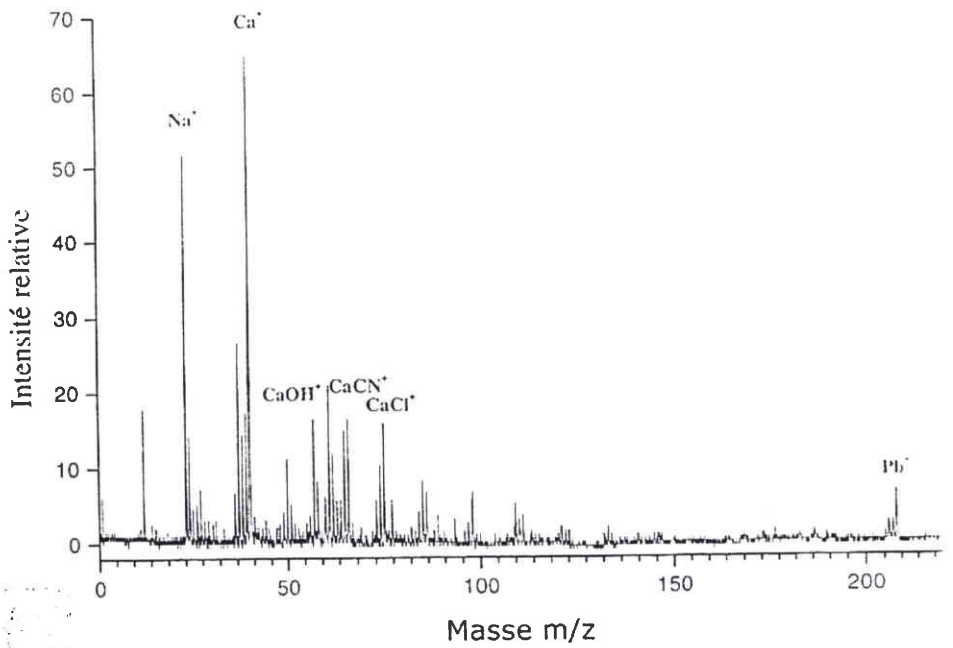


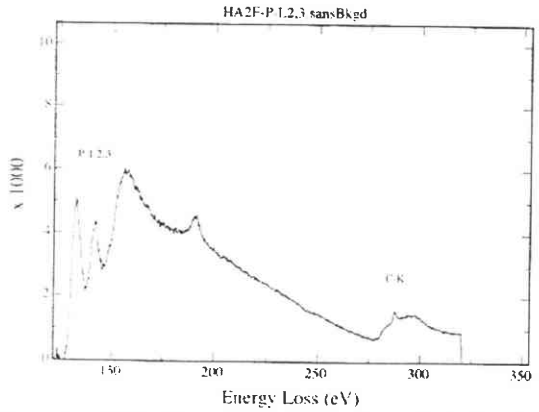
Figure 80 : Spectre LAMMA d'une cellule digestive

I.3.2. Les cellules à calcium

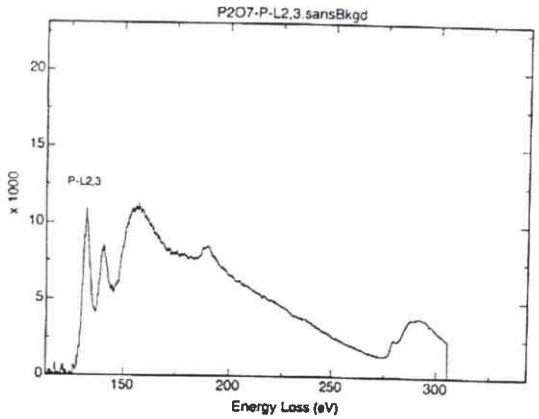
- ✓ Une étude plus approfondie concerne les constituants des concrétions qui présentent une alternance de couches claires, globalement peu osmiophiles, peu électrondenses, et de couches sombres, plus électrondenses et osmiophiles. Chez les témoins, la nature prépondérante phosphocalcique est confirmée avec présence de P, O, Ca, Mg et K avec des traces de Fe, Cu, Zn (tableau 57, ligne 12 ; planche IV_8, figure 1). Le spectre EEL permet d'obtenir le spectre caractéristique du phosphore. Sa nature «phosphate» PO_4^{3-} ou «pyrophosphate» $P_2O_7^{2-}$ a été précisée par référence à des étalons ; il s'agit de pyrophosphates (figures 81 a, b et c).

- ✓ En présence de poudre de zinc (25% dans l'aliment), la surcharge en zinc est constatée dans les concrétions avec O, P, Ca, Mg, Si, K et Zn (tableau 57, ligne 13 ; planche IV_8, figure 2). La présence simultanée de Si ne sera que rarement détectée dans les autres expériences.

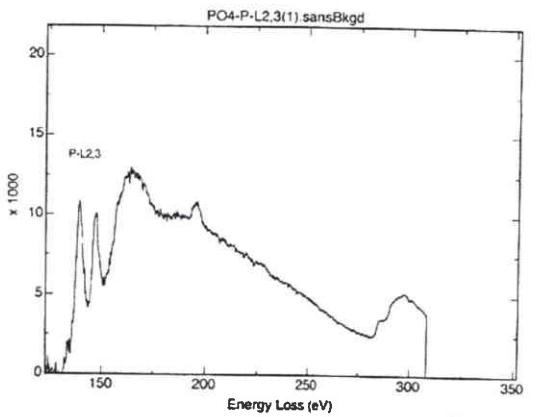
✓ En présence de poudre de plomb (25% dans l'aliment), la surcharge en plomb est constatée faiblement au centre de la concrétion (tableau 57, ligne 14 ; planche IV_8, figure 3) avec O, P, Ca, Mg, K et des traces de Pb, Cu et Zn. A la périphérie de la concrétion, la couche de pyrophosphates de calcium en formation contient beaucoup plus d'éléments dont des métaux Pb, P, O, Ca et des traces de Mg, Cu, Zn, Fe et Cd (tableau 57, ligne 15 ; planche IV_8, figure 4). Dans le cytoplasme, des grains électrondenses contiennent les futurs éléments constitutifs de la concrétion : Pb, O, P, Ca, Mg, Fe, Cu et traces de Zn (tableau 57, ligne 16 ; planche IV_8, figure 5).



a : Spectre EEL d'une concrétion de cellule à calcium



b : Spectre EEL d'un étalon $P_2O_7^{4-}$



c : Spectre EEL d'un étalon PO_4^{3-}

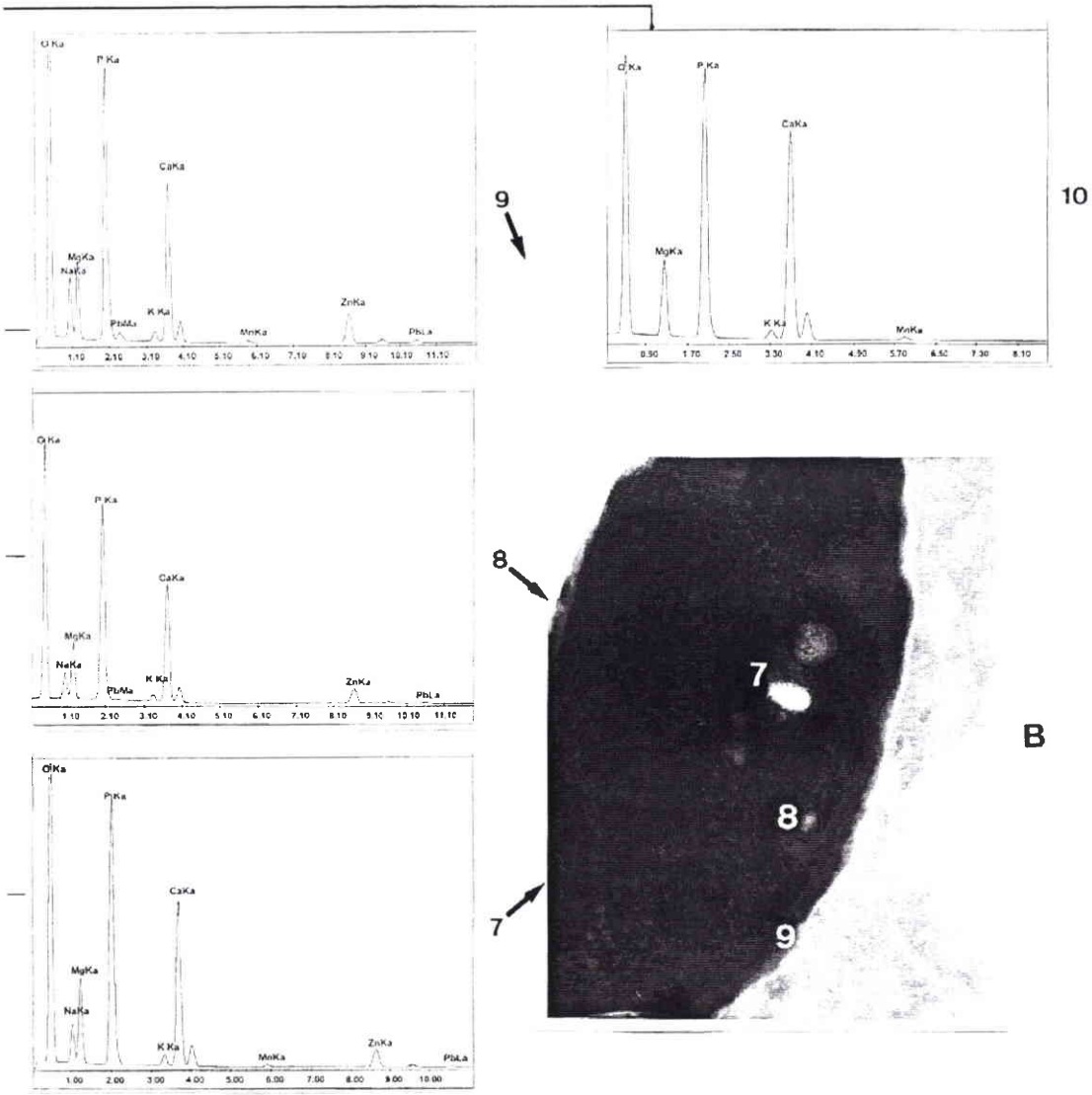
Figures 81 a, b et c : Identification des formes de phosphore des concrétions des cellules à calcium

- ✓ En présence de poussières d'aciérie en ajout dans le sol (25%) et l'aliment (25%), une diversité différente est mise en évidence dans les concrétions avec présence de O, P, Ca, Mg, Na, K, Zn et Pb mais aussi parfois de Mn (tableau 57, lignes 17 à 19 ; planche IV_8, figures 7 à 9). Ce dernier élément n'a pas été mis en évidence dans les autres types de contamination, exception faite de faibles traces lors de la contamination par le cadmium. La présence de zinc est d'autant plus importante que l'on effectue la microanalyse à la périphérie de la concrétion (planche IV_8, figures 7 à 9 et cliché B). Par ailleurs, des grains électrondenses du cytoplasme, très osmiophiles, sont très riches en S et Si avec moins de Ca et de Mg. La présence simultanée de Al, parfois nette, reste à confirmer (tableau 57, ligne 20 ; planche IV_8, figure 6 et cliché A x 11.500).

- ✓ En présence de cadmium (444 ppm dans l'aliment), celui-ci n'est jamais détecté dans les concrétions qui présentent les éléments suivants : O, P, Ca, Mg et K et de faibles traces de manganèse (tableau 57, ligne 21 ; planche IV_8, figure 10).

Planche IV_8 : Microanalyse de la localisation des métaux dans les cellules à calcium




O Ka
P Ka
CaKa
MgKa
NaKa
K Ka
PbMa
MnKa
ZnKa
PbLa
9
10
8
7
B
A
6

Chapitre II : Rôle de l'intestin proximal dans l'absorption des métaux

II.1. Etude histologique de l'intestin proximal chez le témoin (microscopie optique et électronique MET)

Compte tenu des données existantes et présentées dans l'étude bibliographique, l'observation des deux types cellulaires de l'épithélium intestinal a eu pour objectif d'établir les structures de référence permettant de préciser, par la suite, celles concernées par la présence de métaux (figure 82 et planche IV_9, figures 1 et 3 ; planche IV_{10}, figure 1).

II.1.1. L'entérohépatocyte

L'entérohépatocyte est une cellule épithéliale (planche IV_{12}, figure 1), prismatique, à bordure en brosse très développée avec une activité d'endocytose très intense au pôle apical. Du côté basal, des invaginations de la membrane plasmique signalent une activité de transfert vers la cavité générale et la circulation sanguine après passage à travers la lame basale. La cohésion de l'épithélium, du côté de la lumière intestinal, est réalisée par des *zonula adherens*. Le noyau est situé à mi-hauteur. Les organites cytoplasmiques sont des mitochondries de grande taille, un ergastoplasme rugueux bien développé et un appareil de Golgi particulièrement actif.

On peut suivre, de l'apex à la base de la cellule, une évolution des produits endocytés par coalescence avec des lysosomes primaires et formation successive de lysosomes secondaires puis tertiaires avec des corps résiduels. Dans le cytoplasme, des microtubules sont disposés selon le grand axe, formant le squelette cellulaire indispensable au soutien de la cellule. Les inclusions lipidiques sont nombreuses et un abondant glycogène forme des rosettes caractéristiques.

II.1.2. Le mucocyte

Le mucocyte est une cellule caliciforme, à noyau basal, dont le pôle apical, sans bordure en brosse, montre la coalescence des produits de sécrétion en voie d'être libérés dans la lumière intestinale. Les deux tiers apicaux de la cellule sont gorgés de ces grains de sécrétion.

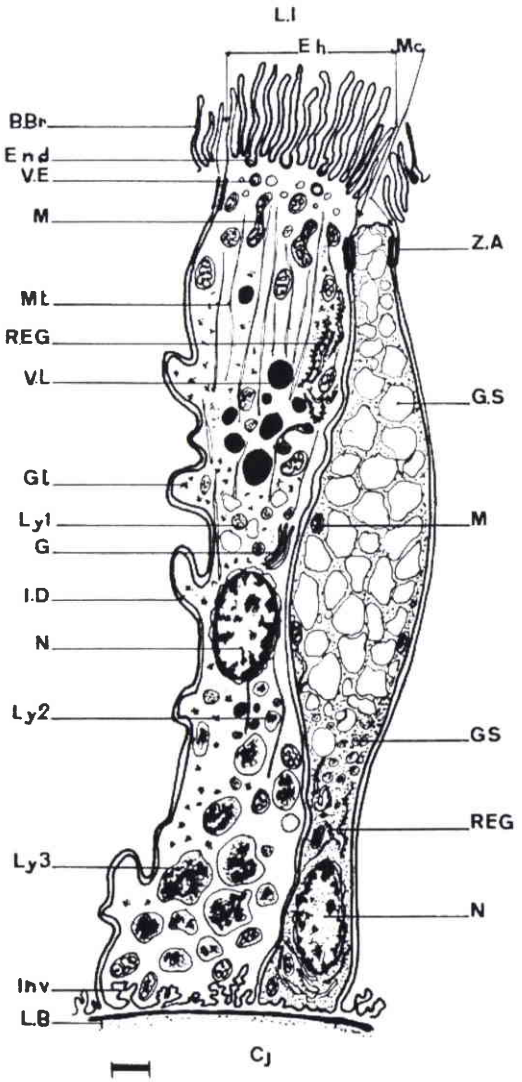


Figure 82 : Représentation d'un entérohépatocyte et d'un mucocyte de l'intestin proximal de *Helix aspersa aspersa*. (échelle = 1 µm)
Légendes : *Cf.* liste des abréviations

II.2. Etude histologique de l'intestin proximal d'escargots contaminés par des métaux particulaires

II.2.1. Microscopie optique

L'épithélium intestinal d'escargots transférés pendant un mois, à proximité d'une autoroute, présentent, après traitement au sulfure d'ammonium, des dépôts de sulfures métalliques soit au niveau des vacuoles digestives des entérohépathocytes (planche IV_9, figure 4b), soit dans la lumière intestinale parmi les concrétions de pyrophosphates de calcium libérées par la glande digestive (planche IV_9, figure 4a).

Chez les escargots contaminés par la nourriture avec un ajout de poudre de plomb, il y a une absorption importante de plomb avec présence de particules dans les vacuoles digestives (planche IV_9, figures 3 et 5 ; planche IV_{10}, figures 2, 3 et 4). Il y a transfert du métal dans les hémocytes (planche IV_{10}, figure 3) et dans les cellules spécialisées du tissu conjonctif péri-intestinal (planche IV_{10}, figure2).

Planche IV_9. : Histologie de l'intestin proximal (échelle = 10 µm)

1. **Coupe transversale d'une villosité de l'intestin proximal d'un animal témoin (coupe à la paraffine avec une coloration à l'hématoxyline et au bleu alcyan ; G x 250)**

   Présence d'un épithélium intestinal à bordure en brosse au niveau des cellules digestives ou entérohépatocytes. Il y a une intercalation de quelques mucocytes.
   Lame basale.
   Conjonctif avec sinus sanguin contenant des hémocytes.
   La lumière intestinale est remplie d'aliments en cours de digestion et de déchets alimentaires

2. **Détail d'une villosité de l'intestin en coupe transversale d'un animal témoin (coupe semifine après un traitement au sulfure d'ammonium et une coloration au bleu de toluidine ; G x 400)**

   Entérohépatocytes à bordure en brosse.
   Mucocytes se présentant dilatés au niveau du pôle apical.
   Aliment dans la lumière intestinale.
   Il n'y a pas de réaction positive avec formation de sulfures métalliques. Il y a cependant quelques vacuoles colorées en jaune-brun dans les entérohépatocytes.

3. **Détail d'entérohépatocytes en coupe tangentielle d'un animal contaminé par de la poudre de plomb (coupe semifine après un traitement au sulfure d'ammonium et une coloration au bleu de toluidine ; G x 400)**

   Présence de nombreuses vacuoles avec réaction positive mettant en évidence la formation de sulfure de plomb.
   La cellule intestinale absorbe les particules de plomb par endocytose.

4. **Détail de la lumière intestinale d'un animal contaminé par une exposition à proximité d'une autoroute (coupe semifine après un traitement au sulfure d'ammonium et coloration au bleu de toluidine ; G x 400)**

   4a Réaction positive autour des concrétions provenant des cellules à calcium de la glande digestive et qui sont évacuées avec les fécès.
   4b Réaction également positive au niveau de certains entérohépatocytes avec une coloration des vacuoles digestives.

5. **Coupe transversale de l'intestin d'un animal contaminé par de la poudre de plomb (coupe à la paraffine avec une coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 63)**

   Il y a une réaction positive qui démontre la présence de plomb dans l'aliment présent dans la lumière intestinale. Le bleu de toluidine masque, à ce grossissement, les vacuoles digestives des entérohépatocytes.
   L'épithélium intestinal présente des villosités
   Présence d'un conjonctif péri-intestinal creusé de sinus sanguins.
   Présence de la musculeuse qui complète la paroi intestinale.

Planche IV$_9$

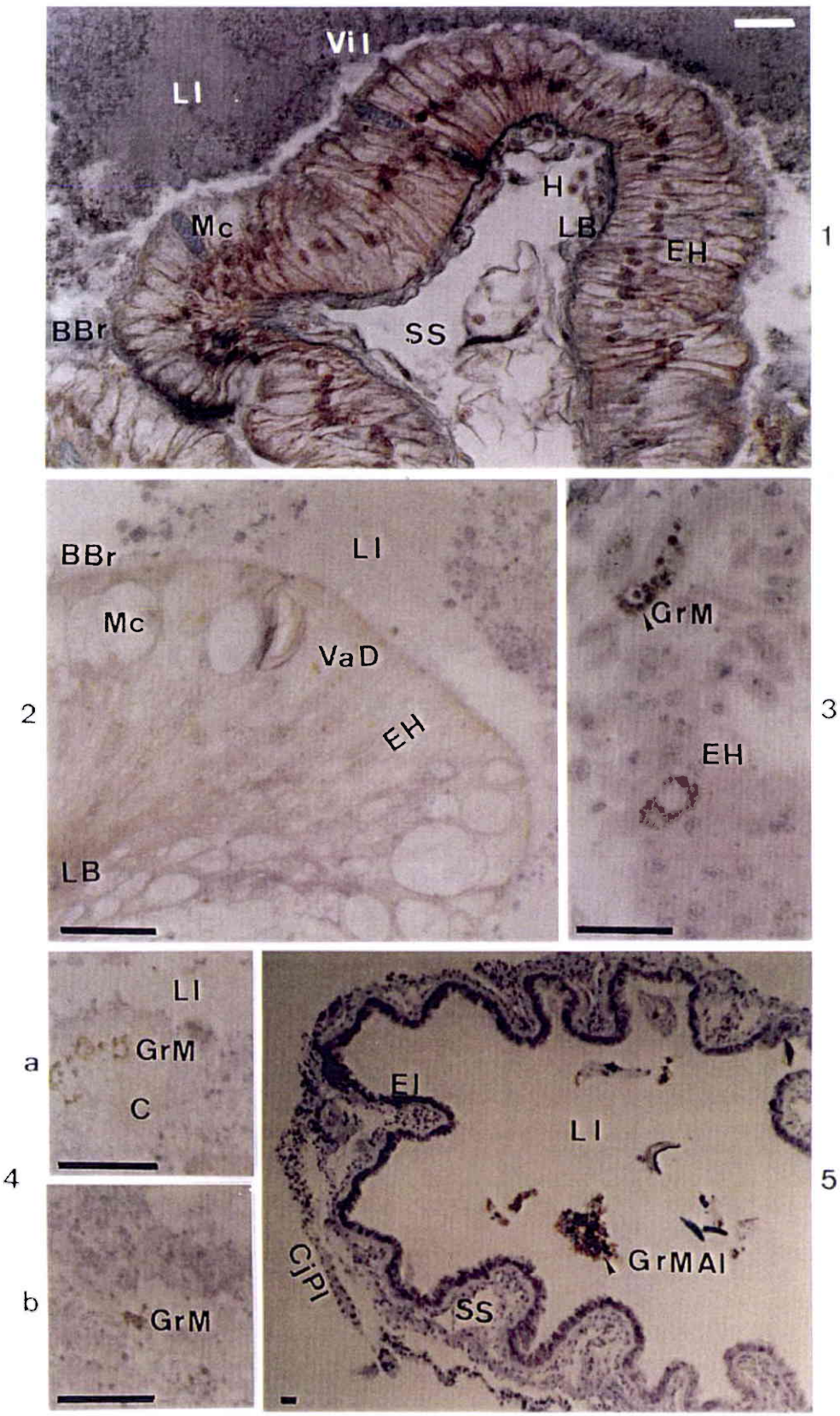

Vil
LI
H
Mc
LB
EH
1
BBr
SS
BBr
LI
Mc
VaD
2
EH
LB
GrM
3
EH
LI
a
GrM
C
4
b
GrM
El
LI
5
GrMAl
CjPl
SS

Planche IV_{10}. : Histologie de l'intestin proximal (échelle = 10 µm)

1. **Coupe longitudinale de l'intestin d'un animal témoin (coupe à la paraffine avec une coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 400)**

   L'épithélium intestinal à bordure en brosse est composé d'entérohépatocytes à noyau médian coloré en bleu.
   Les mucocytes à produits de sécrétion sont colorés en bleu-violet.
   La lame basale et le conjonctif péri-intestinal sont creusés de sinus sanguins.
   Il n'y a pas de réaction positive au Möller car il y a une absence de grains métalliques contenant du plomb.

2. **Coupe transversale de l'intestin d'un animal contaminé par de la poudre de plomb (coupe à la paraffine avec une coloration au Möller seul ; G x 160)**
   Il y a une réaction positive (présence de plomb) :

   a) au niveau des entérohépatocytes avec la présence de granules jaune-brun foncé.
   b) au niveau de quelques hémocytes du sinus sanguin péri-intestinal.
   c) au niveau des cellules du conjonctif de la cavité générale avec une nette accumulation.

3. **Détail d'une coupe transversale de l'intestin d'un animal contaminé par de la poudre de plomb (coupe à la paraffine avec coloration au Möller seul ; G x 400)**

   Il y a une très nette absorption apicale des granules de plomb de différentes tailles avec une réaction positive du liquide vacuolaire.
   Passage de quelques granules dans les hémocytes du sinus sanguin.

4. **Détail de quelques entérohépatocytes d'un animal contaminé par de la poudre de plomb (coupe à la paraffine avec une coloration au Möller seul ; G x 1000)**

   Il y a une intense absorption des granules métalliques (Pb) au niveau du pôle apical.
   Nette bordure en brosse.
   La lumière intestinale est vide.

Planche IV_{10}

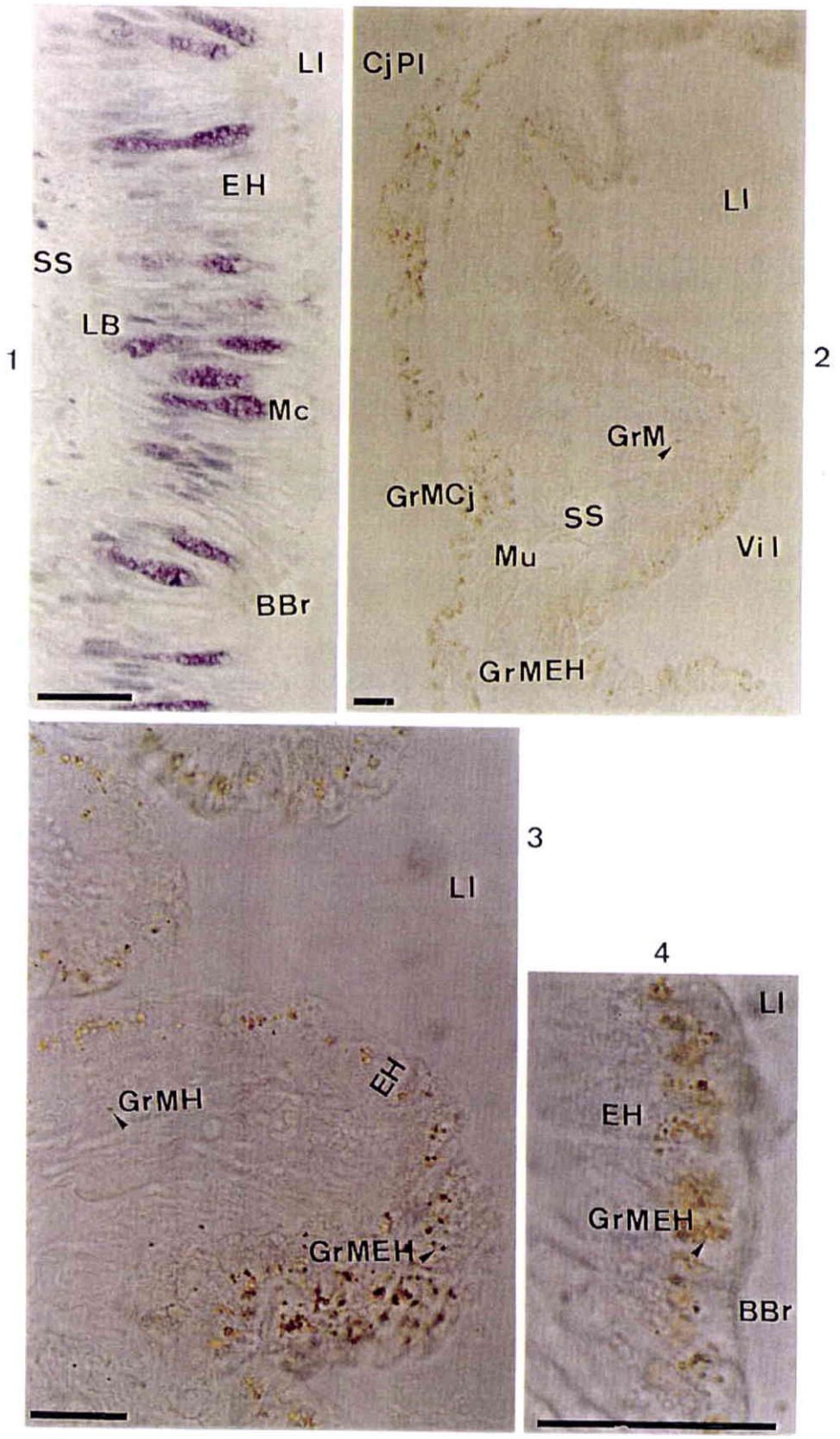


Planche IV_{11} : Histologie de l'intestin proximal (échelle = 10 µm)

1. **Coupe transversale d'une villosité intestinale d'un animal contaminé par de la poudre de plomb (coupe à la paraffine avec une coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 250)**

   Il y a une accumulation de granules de plomb dans la partie apicale des entérohépatocytes.
   Passage des granules vers le sinus sanguin.
   Il y a une accumulation des granules dans les cellules du conjonctif.
   Présence d'une tunique musculaire avec du conjonctif de la cavité interne dont les cellules accumulent les granules.

   Dans la musculeuse, coupe d'un nerf *

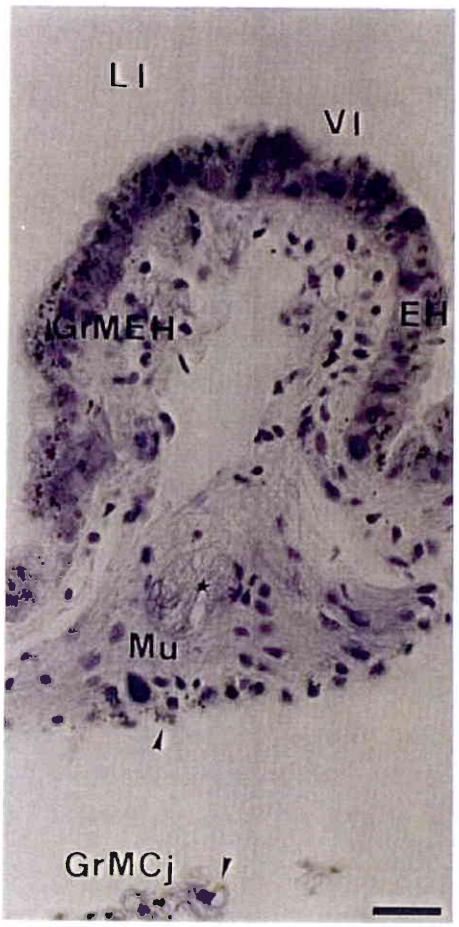
2. **Histologie de l'épithélium intestinal d'un animal contaminé par de la poudre de plomb (coupe à la paraffine avec une coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 400)**

   Il y a une absorption des granules de plomb par les entérohépatocytes dont certains présentent un noyau pycnotique, perte de l'adhésion inter-cellulaire.
   Par endroit, la lumière digestive touche la lame basale du fait de la perte de cellules épithéliales.
   Dans le sinus sanguin, présence d'un hémocyte chargé de granules de plomb.

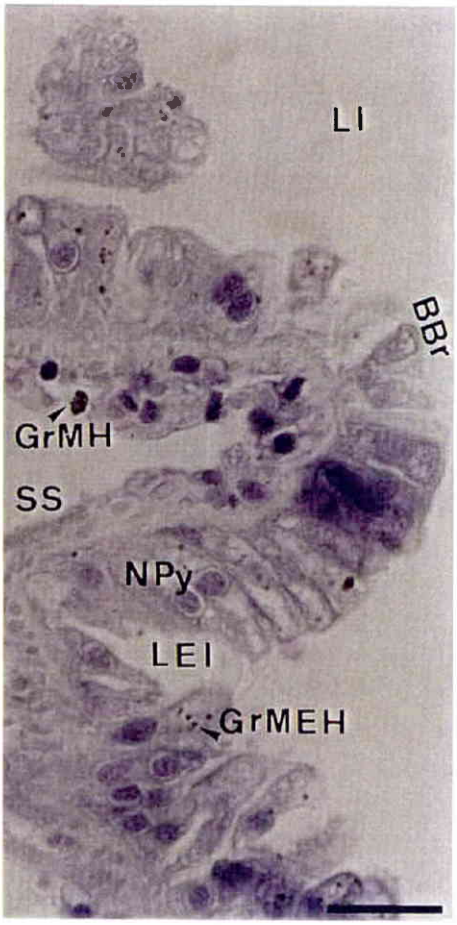
3. **Histologie de l'épithélium intestinal d'un animal contaminé par de la poudre de plomb (coupe à la paraffine avec une coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 400)**

   Lésion aggravée de l'épithélium intestinal.
   Présence de granules de plomb dans la lumière intestinale et le cytoplasme apical de certains entérohépatocytes. Présence de déchets cellulaires desquamés dans la lumière intestinale.

Planche IV_{11}



1



2

3

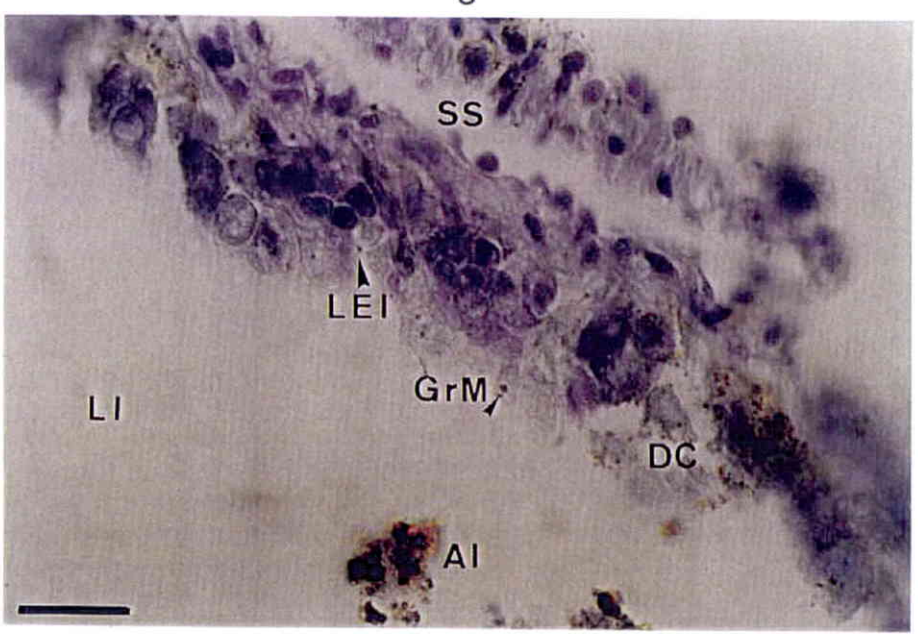


Planche IV_{12} : Ultrastructure de l'intestin proximal (échelle = 0,5 µm)

1. **Entérohépatocytes d'un animal témoin (G x 7.500)**

   Présence de microvillosités de la bordure en brosse.
   Formation de vésicules d'endocytose.
   Contact inter-cellulaire avec, du côté de la lumière intestinale, une zonula adherens puis des inter-digitations de la membrane plasmique latérale.
   Dans le cytoplasme apical, présence de vésicules à manteau, de très nombreuses mitochondries, du REG avec des saccules parallèles ainsi que des inclusions lipidiques et du glycogène.

2. **Détail d'un entérohépatocyte d'un animal transféré sur un site de proximité autoroutière (G x 20.000)**

   Présence d'hétérophagolysosomes à grains métalliques électrondenses, de lysosomes primaires, de mitochondries avec des grains de phosphate de calcium, du REG, des microtubules et du glycogène.

3. **Détail d'un entérohépatocyte d'un animal transféré sur un site de proximité autoroutière (traitement au sulfure d'ammonium ; G x 10.000)**

   Présence d'un mucocyte sans réaction positive
   Entérohépatocyte avec des vacuoles digestives contenant des métaux puis confluence dans des hétérophagolysosomes de composition hétérogène dont des métaux.

Planche IV_{12}

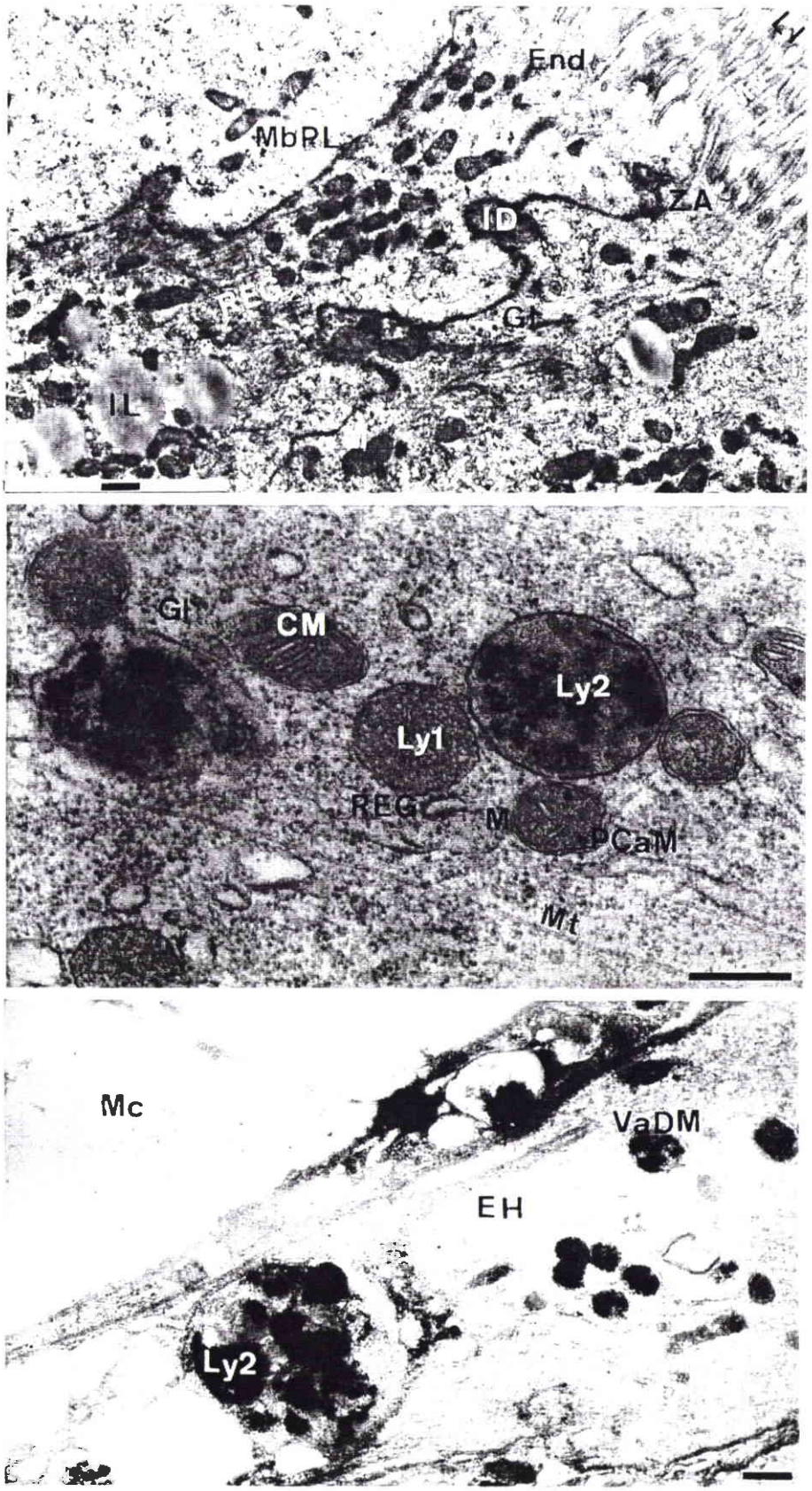


Planche IV_{13} : Ultrastructure de l'intestin proximal (échelle = 0,5 µm)

1. **Entérohépatocytes d'un animal contaminé par ajout de poudre de plomb à la nourriture (G x 5.000)**

   Il y a une bordure en brosse du côté de la lumière intestinale.
   Présence d'hétérophagolysosomes de nature complexe ou presque exclusivement contenant de la poudre de plomb.

2. **Détail d'un hétérophagolysosome du cliché 1 (G x 7.500)**

   La membrane lysosomale est bien visible.
   Présence de granules métalliques plus ou moins condensés.
   Présence d'un dictyosome.

3. **Entérohépatocytes anormaux d'un animal contaminé par ajout de poudre de plomb à la nourriture (G x 10.000)**

   Les microvillosités sont moins nombreuses et enflées.
   Le cytoplasme apical forme des protusions dans la lumière intestinale.
   Dans le cytoplasme, présence de vésicules d'endocytose à manteau, de mitochondries et de glycogène.
   Il y a des desmosomes avec l'espace inter-cellulaire dilaté.

4. **Détail d'une concrétion de la lumière intestinale (phosphate de calcium) provenant d'un animal transféré sur un site de proximité autoroutière (traitement au sulfure d'ammonium ; G x 13.000)**

   Les concrétions proviennent des cellules à calcium de la glande digestive.
   Il y a une réaction positive au niveau des couches électrondenses.

Planche IV_{13}

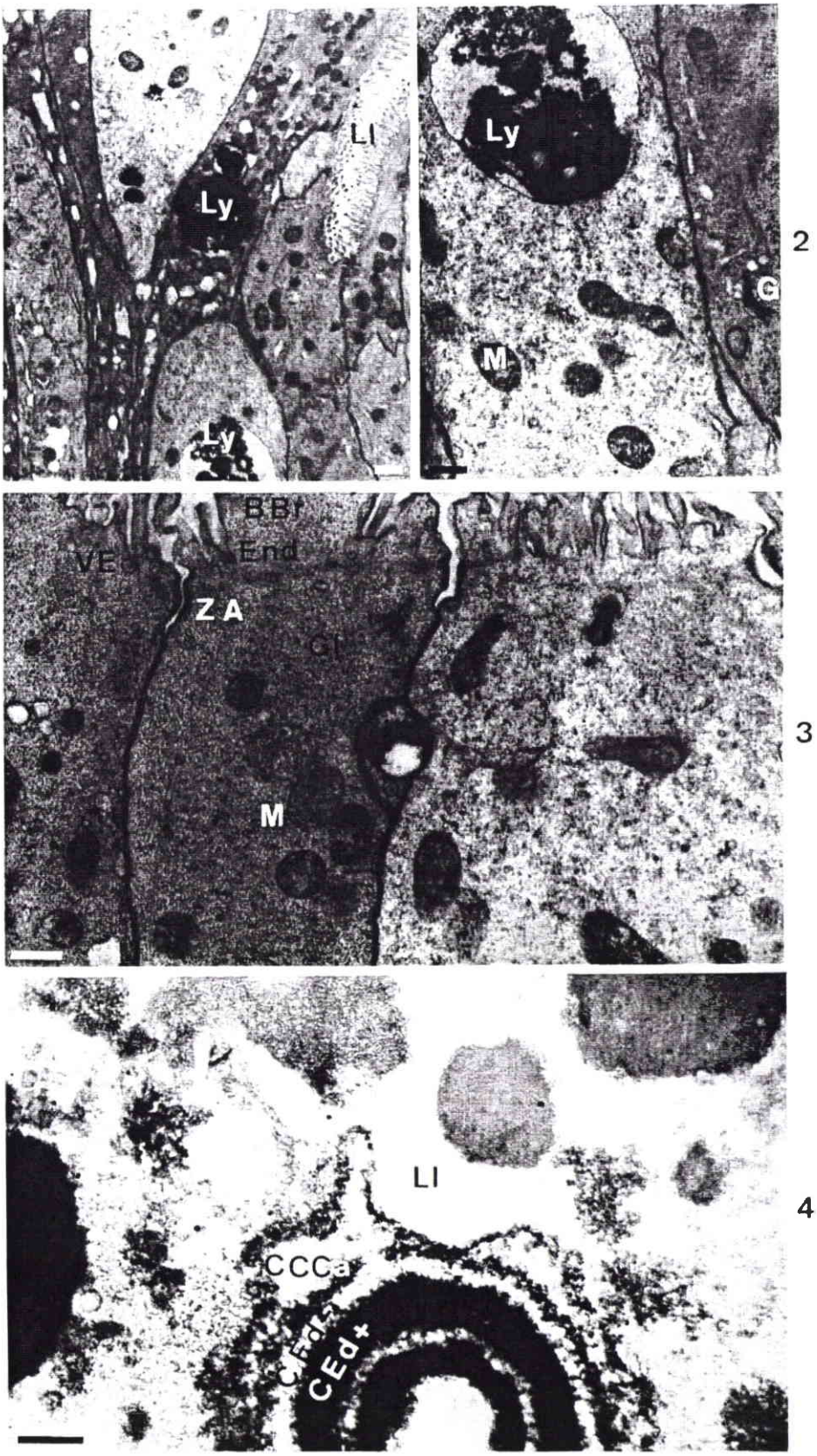
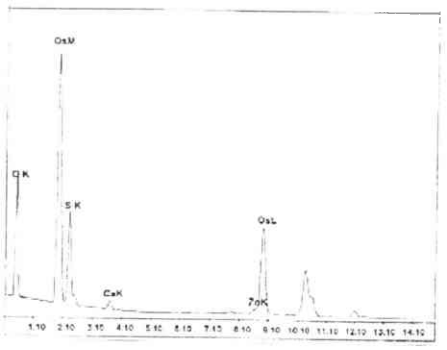
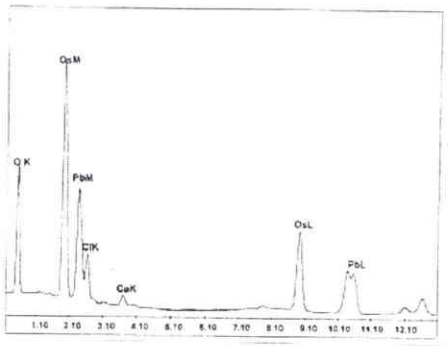


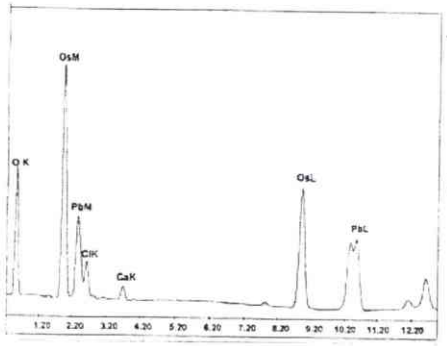
Planche IV_{14} : Microanalyse de la localisation des métaux dans les cellules de l'intestin proximal



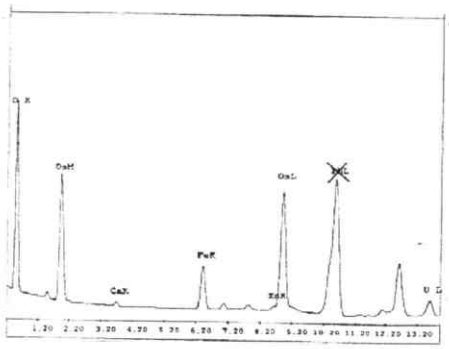
1



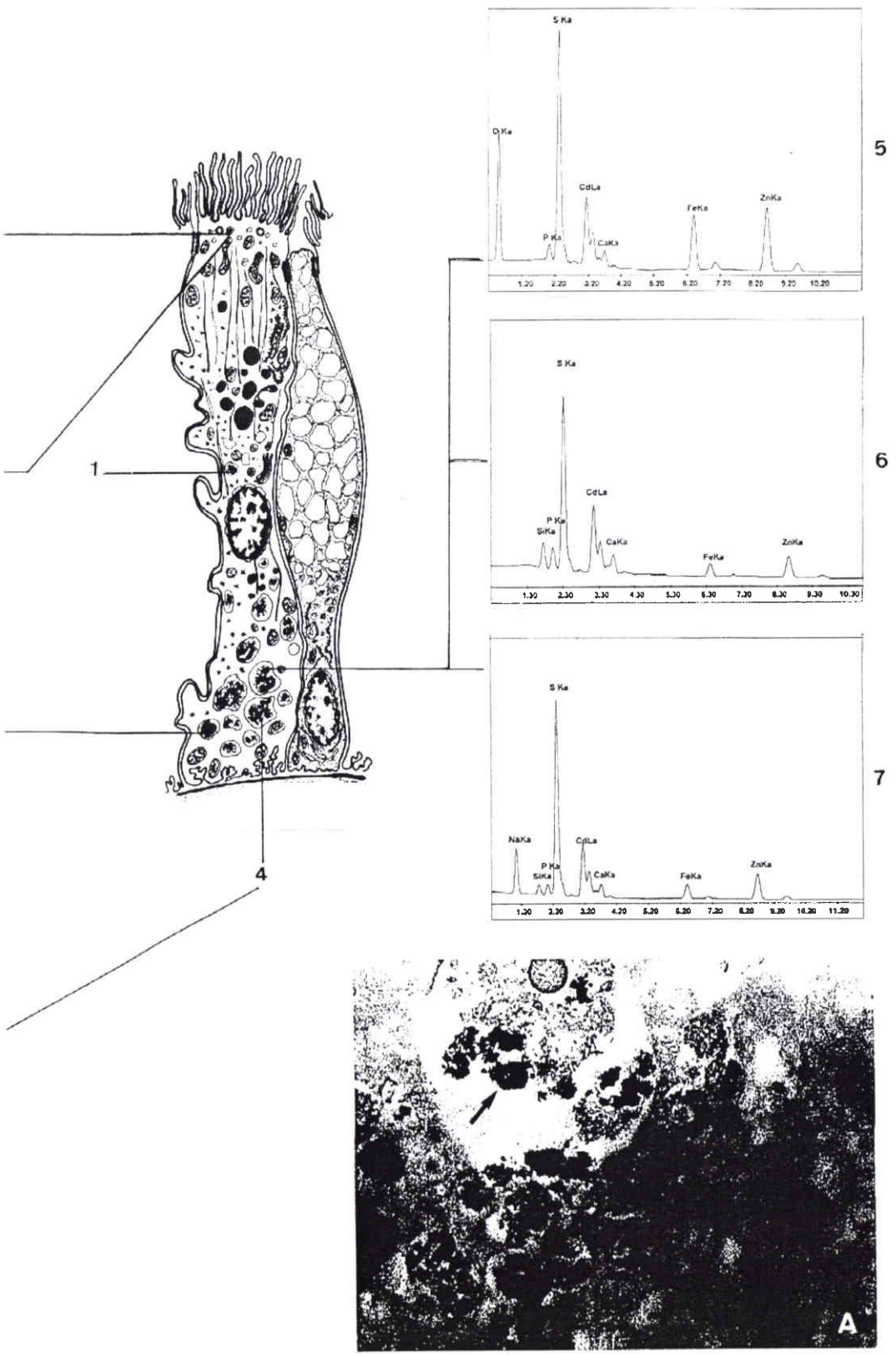
2



3



4


1
4
5
6
7
S Ka
O Ka
P Ka
CdLa
CaKa
FeKa
ZnKa
SiKa
NaKa
A

La présence de poudre de plomb provoque, chez certains individus, une érosion de l'épithélium avec nécrose et desquamation (planche IV_{11}, figures 1, 2 et 3).

Le cytoplasme est principalement basal avec un réticulum endoplasmique rugueux, des mitochondries et des grains de sécrétion en début de formation. L'activité cellulaire du mucocyte est orientée vers la lumière intestinale alors que celle de l'entérohépatocyte s'effectue principalement de l'apex vers la base.

II.2.2. Microscopie électronique (MET)

Les observations en microscopie électronique ont été réalisées afin de connaître les structures cellulaires avant microanalyse EDX ou EEL.

Les escargots transférés en proximité autoroutière présentent, dans les entérohépathocytes, un système lysosomal riche en inclusions électrondenses métalliques (planche IV_{12}, figures 2 et 3). Ces inclusions sont encore plus nombreuses lorsqu'il y a contamination par la poudre de plomb (planche IV_{13}, figures 1 et 2).

En présence de poudre de plomb, certains individus présentent une bordure en brosse anormale, boursouflée (comparaison de la figure 1, planche IV_{12} avec la figure 3, planche IV_{13}).

Dans la lumière intestinale, les concrétions, provenant des cellules à calcium de la glande digestive, présentent, après traitement au sulfure d'ammonium, une électrondensité importante qui indique la présence de sulfures métalliques, probablement de sulfures de plomb dont l'existence sera vérifiée par la microanalyse (planche IV_{13}, figure 4).

II.3. Etude par microanalyse de la localisation des métaux dans les cellules de l'intestin proximal

Les résultats obtenus en microanalyse confirment les observations faites en microscopie électronique à transmission en ce qui concerne la localisation cellulaire des métaux et permettent de connaître l'ensemble de la composition élémentaire des structures cellulaires ciblées lors de la microanalyse.

- ✓ L'analyse EDX du contenu des vacuoles d'endocytose des cellules intestinales des animaux témoins, en dehors de P et Ca, ne met pas en évidence la présence d'éléments métalliques (tableau 58, ligne 1). Par contre, l'analyse des mêmes cellules, chez les individus contaminés par de la poudre de zinc, met en évidence la présence de S, Ca et Zn auxquels il faut ajouter le phosphore confondu avec le pic d'osmium (tableau 58, ligne 2 ; planche IV_{14}, figure 1).

- ✓ De même, l'analyse des enthérocytes, chez les individus contaminés par de la poudre de plomb, met en évidence la présence de Ca et Pb en grande quantité et de P confondu avec le pic d'osmium (tableau 58, lignes 3 et 4 ; planche IV_{14}, figures 2 et 3).

- ✓ Afin de tester la sensibilité de la microanalyse, des coupes d'intestin proximal d'individus placés à proximité d'une autoroute ont été analysées avec mise en évidence de Fe, de Zn, de Ca et de P confondu avec le pic d'osmium. Le plomb n'a pas pu être recherché car les coupes avaient été contrastées au citrate de plomb (tableau 58, ligne 5 ; planche IV_{14}, figure 4).

Après contamination du sol avec une solution de cadmium (444 ppm), les éléments suivants sont toujours détectés dans les hétérophagolysosomes : S, P, Ca, Cd, Fe, Zn (planche 58, figures 5, 6 et 7) avec, parfois, une nette présence de Si et/ou de Na (tableau 58, lignes 6 à 8 ; planche IV_{14}, figures 6 et 7 et cliché A).

Ces analyses mettent en évidence l'existence d'une contamination métallique à partir de particules dont la dimension n'excède pas la capacité d'endocytose. La contamination, à partir de solutions métalliques, peut-être le résultat, soit du passage transmembranaire de formes cationiques, soit de particules alimentaires ayant absorbées le métal et endocytées.

Tableau 58 : Eléments organiques (MO : C, N et O) et minéraux détectés en EDX dans l'entérohépatocyte. Légendes : (?) : non retenu car la coupe a été traitée au citrate de plomb ; (a) P est confondu avec le pic d'osmium ; +++ : présence abondante ; ++ présence moyenne ; + présence faible ; P : présence fréquente mais à l'état de traces.

						Classe A					Transition				Classe B		
Intestin proximal	Lignes	M.O.	O	P	Si	Na	Mg	K	Ca	Al	Cd	Fe	Zn	Mn	Cu	Pb	S
Référence	1	+++	-	+	-	-	-	-	+	-	Pas d'éléments métalliques détectés						-
Zn 25 % dans la nourriture Phagolysosome	2	+++	-	+(a)	-	-	-	-	+	-	-	-	P	-	-	-	++
Pb 25% Dans la nourriture Grain apical Hétérophagolysosome	3 4	- +++	+ + +	+(a) - +(a)	- -	- -	- -	- -	+ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	++ ++	- -
Individu - Autoroute Vacuole digestive	5	+++	-	+(a)	-	-	-	-	(+)	-	-	++	P	-	-	(?)	-
Intoxication au cadmium (444 ppm dans la nourriture)	6 7 8	+++ +++ +++	- - -	+ + +	- + +	 - ++	- - -	- - -	+ + +	- - -	++ ++ ++	++ + +	++ + +	- - -	- - -	- - -	++ + ++ + ++ +

Chapitre III : Le rein de *Helix aspersa aspersa*

III.1. Anatomie du rein

Le rein d'*Helix aspersa aspersa*, comme celui de *Helix pomatia* (Bouillon, 1960), est constitué d'un sac rénal sans canal réno-péricardique évacuant les produits d'excrétion par une uretère primaire puis une uretère secondaire longeant l'intestin terminal et s'ouvrant sur un orifice très peu visible près de l'anus.

Le rein présente de nombreuses lamelles rénales supportant les néphrocytes (planche IV_{15}, figures 1 à 3). Autour du rein et au centre des lamelles, le conjonctif est parcouru par des vaisseaux puis des sinus sanguins avec des hémocytes circulants. Dans le conjonctif péri-rénal, il existe de nombreuses cellules à calcium, quelques « pore cells » (planche IV_{17}, figures 1) et des hémocytes macrophagiques (planche IV_{17}, figures 2, 3 et 4).

La lame basale, doublée de fibres de collagène, est très fine ; elle est le lieu, selon Sanchez *et al.* (1980) de l'ultrafiltration vers les néphrocytes. La présence de fibres musculaires facilitant l'expulsion des produits d'excrétion signalée par Sanchez *et al.* (1980) est confirmée (planche IV_{18}, figure 1).

L'infiltration hémocytaire à travers la lame basale puis entre les néphrocytes, avec leur passage direct dans la lumière rénale, est envisagée par certains auteurs. Il est également plausible que certains de leurs constituants soit absorbés par les néphrocytes (macropinocytose) (planche IV_{16}, figure 3 et planche IV_{17}, figure 4).

Compte tenu des données exposées dans l'analyse bibliographique, le néphrocyte de *Helix aspersa aspersa* nécessite une description plus approfondie faisant appel à la microscopie optique, électronique à transmission et à la microanalyse (EDX et EEL).

III.2. Le néphrocyte : étude en microscopie optique et électronique (MET)

Conformément aux observations de Sanchez *et al.* (1980), les néphrocytes présentent une évolution fonctionnelle de la base à l'apex (planche IV_{16}, figure 3 et planche IV_{18}, figure 1) des lamelles avec, à la base, des stades jeunes (stade J), sans vacuoles importantes et à rapport nucléo-cytoplasmique élevé ; vers le milieu des lamelles, des stades intermédiaires (stade M) avec début de vacuolisation et noyau central et un rapport nucléo-cytoplasmique diminuant ; à l'apex, des stades finaux matures (stade F) avec noyau sub-basal, un faible rapport nucléo-cytoplasmique, vacuole apicale importante ($\geq$ 50 % du volume cellulaire) et une concrétion globuleuse bien formée par cellule rénale. Contrairement à Sanchez *et al.* (1980), nous n'avons pas observé de figures mitotiques dans les cellules à la base des lamelles. Il conviendrait, soit de réaliser des fixations en période de réveil après l'hivernation, lorsque l'animal expulse tous les produits d'excrétion accumulés dans la lumière rénale et régénère l'épithélium rénal, soit, selon les conclusions de Bouillon (1960) pour *Helix pomatia*, de suivre l'évolution histologique sur un cycle de 15 jours pendant la vie active correspondant au cycle d'excrétion des concrétions avec régénération de l'épithélium. A ce sujet, les auteurs n'ont pas conclu définitivement sur le type de sécrétion mérocrine ou holocrine du néphrocyte. La présence, dans la lumière rénale, comme déjà décrit par Sanchez *et al.* (1980), d'une urine primaire chargée en concrétions, granules, débris cellulaires (corps myéliniques et noyau) (planche IV_{16}, figure 1 et planche IV_{19}, figure 2) milite en faveur du type holocrine nécessitant une régénération cyclique (Sanchez *et al.*, 1980).

La présence d'une bordure en brosse au pôle apical du néphrocyte souligne les possibilités d'échanges bi-directionnels entre le néphrocyte et l'urine primaire.

III.2.1. Description du néphrocyte au stade intermédiaire (figure 83 et planche IV_{18}, figure 1, planche IV_{23}, figure 2 ; figure 83)

Par comparaison avec le néphrocyte de l'apex des lamelles, le néphrocyte en position moyenne sur la lamelle, désigné néphrocyte intermédiaire (Ne.I.), présente un rapport nucléo-cytoplasmique plus élevé une partie basale à membrane plasmique invaginée puis successivement une zone à REL tubulaire lâche avec peu de mitochondries, une structure ovoïde de REL tubulaire (canaliculaire) dense entouré de vésicules de contenus variés (phagolysosomes), de citernes du REL avec des grains de sécrétion très électrondenses, de nombreuses mitochondries à crêtes sacculaires dont certaines en division, quelques péroxysomes et des dictyosomes golgiens avec des vésicules golgiennes associées.

Le noyau à hétérochromatine, marginale et à îlots centraux, est en situation médio-apicale, entouré d'une seule enveloppe de REL tubulaires puis d'une sphère de REL lamellaire et quelques éléments sacculaire de REG. Le pôle apical présente une membrane plasmique à microvillosités nombreuses avec des figures d'endocytose, mais surtout de nombreuses mitochondries et encore plus de vacuoles d'endocytose et de citerne du REL de contenus variés avec formation de condensas. Dans une des vacuoles apicales commence à se former une concrétion avec peu de couches concentriques.

Les jonctions intercellulaires ne présentent pas de différences avec celles du néphrocyte âgé. Les différences majeures avec le néphrocyte au stade final sont donc l'absence de la vacuole apicale qui résultera de la coalescence des multiples vacuoles apicales en formation, la présence en faible quantité de péroxysomes, l'absence de REL ondulé, l'absence de corps résiduels résultant d'une activité lysosomiale intense. La multiplication des mitochondries est en cours. Le néphrocyte, en phase de maturation, est déjà en phase d'excrétion mais aussi de biogénèse des structures propres au stade néphrocyte apical ou final (Ne.F.).

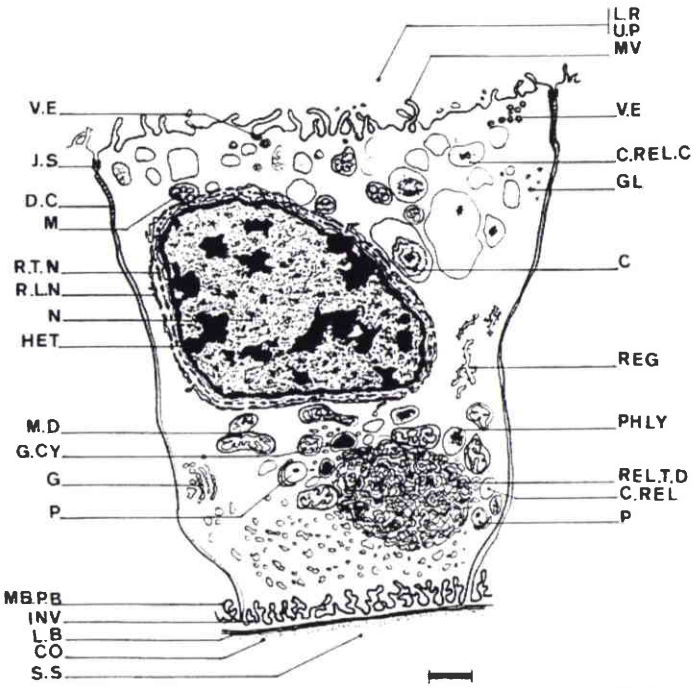


Figure 83 : Schéma synthétique d'un néphrocyte en situation moyenne sur la lamelle rénale (néphrocyte au stade intermédiaire (Ne.I.). (échelle = 1 µm). Légendes : *Cf.* liste des abréviations.

Planche IV_{15} : Rein (microscopie optique) (Echelle = 10 µm)

1. **Rein témoin (coupe à la paraffine (épaisseur 7 µm) avec une coloration au bleu alcyan, hématoxyline de Groat, orange G ; G x 250)**

   Néphrocytes, à grande vacuole apicale contenant une concrétion, avec un noyau central et une couche périphérique colorée en bleu (présence de mucopolysaccharides).
   Dans le sinus sanguin axial de la lamelle rénale, présence d'hémocytes.

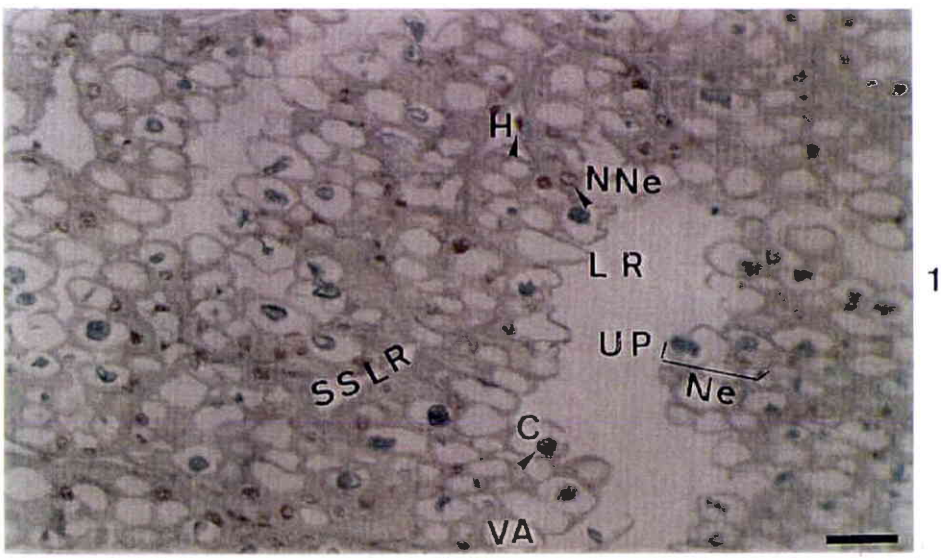
2. **Rein témoin (coupe semifine avec une coloration au bleu de toluidine ; G x 400)**

   Les concrétions sautent pendant la coupe sauf celles de petite taille. Certaines concrétions sont présentes dans la lumière rénale (flèche)
   Les noyaux des néphrocytes et des hémocytes sont colorés en bleu.

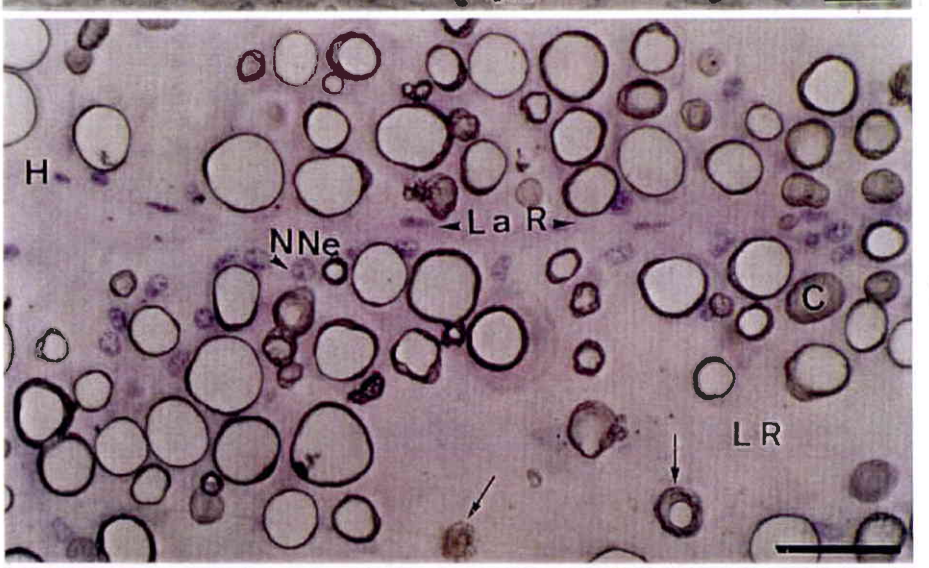
3. **Rein témoin (coloration de Möller, bleu de toluidine – épaisseur 7 µm – G x 250)**

   Absence de réaction au Möller (coloration jaune en présence de plomb). Comparez avec la figure 3 de la planche IV_{16}.
   Les noyaux des néphrocytes et des hémocytes sont colorés en bleu.

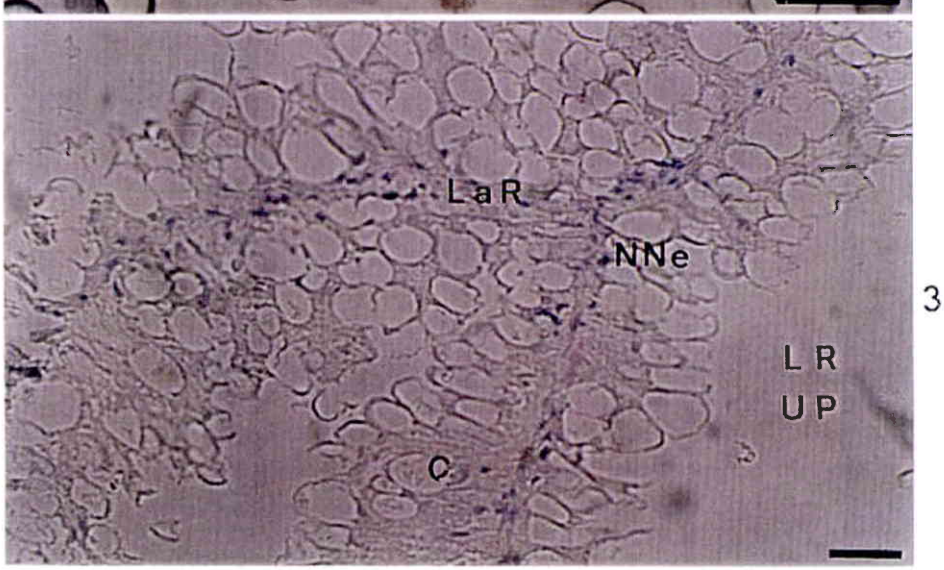
Planche IV_{15}



1



2



3

Planche IV_{16} : Rein (microscopie optique) (Echelle = 10 µm figures 1 et 2 ; 1 µm figure 3)

1. **Rein d'un animal transféré à proximité d'une autoroute (coupe semifine avec une coloration au bleu de toluidine et au sulfure d'ammonium ; G x 400)**

   Réaction positive de granules dans le coagulum d'urine primaire de la lumière rénale et dans les vacuoles apicales des néphrocytes. *Nota* : la couche périphérique des concrétions donne également une réaction positive moins nette, mais la présence de plomb n'est pas vérifiée en microanalyse.

2. **Rein d'animal contaminé en présence de poudre de plomb à 25% dans la nourriture Helixal® (coupe semifine avec une coloration au bleu de toluidine et au sulfure d'ammonium ; G x 250)**

   Présence de granules métalliques dans le cytoplasme des néphrocyte et dans la vacuole apicale. *Nota* : la couche périphérique des concrétions donne une réaction positive mais la présence de plomb n'est pas vérifiée en microanalyse.

3. **Détail de la base des lamelles rénales : rein d'animal contaminé en présence de poudre de plomb à 25% dans la nourriture Helixal® (coupe à la paraffine (épaisseur 7µm) avec une coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 1000)**

   Infiltration de la paroi ventrale du sac rénal par des cellules pigmentées (macrophages) contenant des granules métalliques. Les néphrocytes, en situation basale (stade jeune) présentent des concrétions en début de formation et des granules positifs au Möller indiquant la présence de plomb. Ces granules ne sont pas incorporés aux concrétions mais se trouvent à leur périphérie.

Planche IV$_{16}$

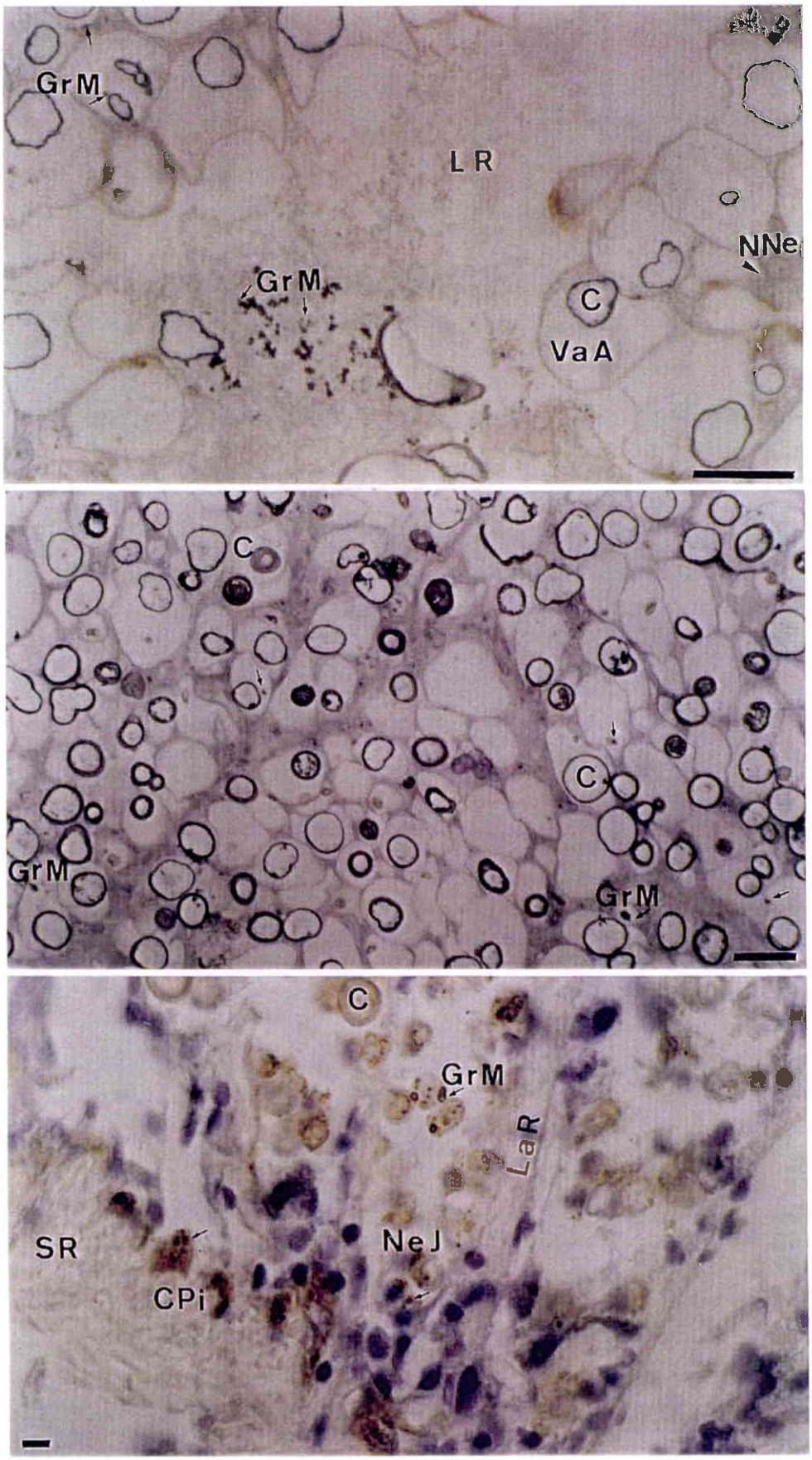


Planche IV_{17} : Histologie des types cellulaires, localisés à proximité du rein, et intervenant dans le métabolisme des métaux. Animaux contaminés par ajout de poudre de plomb dans la nourriture (échelle = 10 µm pour les figures 1 à 3 ; 1 µm pour la figure 4)

1. Conjonctif péri-rénal avec réaction au Möller et coloration au bleu de toluidine (G x 400). Notez la présence de plomb dans les cellules du conjonctif péri-rénal

Ces cellules sont entourées de sinus sanguins. Quelques granules de plomb sont également observés dans les néphrocytes localisés à la base des lamelles rénales (flèches noires étroites)

2 et 3. Accumulation de plomb dans des hémocytes (granulocytes) circulant dans les sinus sanguins à proximité du péricarde (2) et du rein (3). Réaction au Möller et coloration au bleu de toluidine (G x 400)

4 Invasion de l'épithélium rénal ventral par de nombreux hémocytes à fonction macrophagique et transportant le plomb jusqu'au contact des néphrocytes et de la lumière rénale. Réaction au Möller et coloration au bleu de toluidine (G x 1.000)

Ces cellules présentent chez le témoin des inclusions métalliques. La coloration jaune dénote la présence de plomb. Le rein est entouré d'une capsule conjonctive et musculaire.

Planche IV_{17}

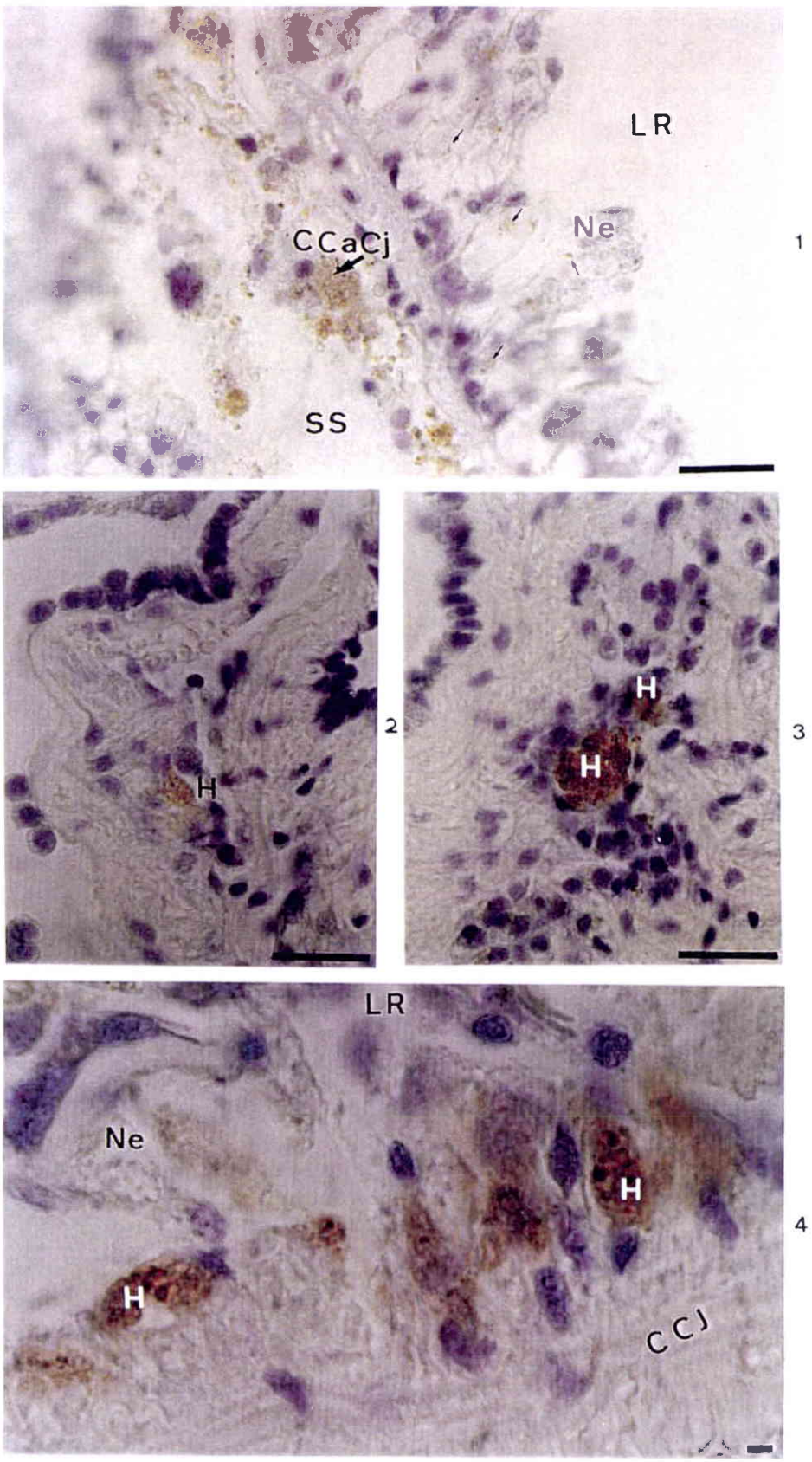


Planche IV_{18} : Rein (microscopie optique) (Echelle = 10 µm figure 1 ; 1 µm figures 2 et 3)

1. **Rein d'animal contaminé en présence de poudre de plomb à 25% dans la nourriture Helixal® (coupe à la paraffine (épaisseur 7 µm) avec une coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 400)**

   Néphrocytes en situation basale (stade jeune) moyenne (stade intermédiaire) et apicale (stade final) sur les lamelles rénales avec des concrétions en formation (C1) ou nettement formées C2).
   Réaction positive au Möller avec une coloration des granules contenant du plomb. Ces granules sont soit cytoplasmique et appartiennent au système lysosomal (flèche blanche), soit déjà présents dans la vacuole apicale mais non incorporés dans la concrétion avec une situation pouvant être adjacente (flèche noire).

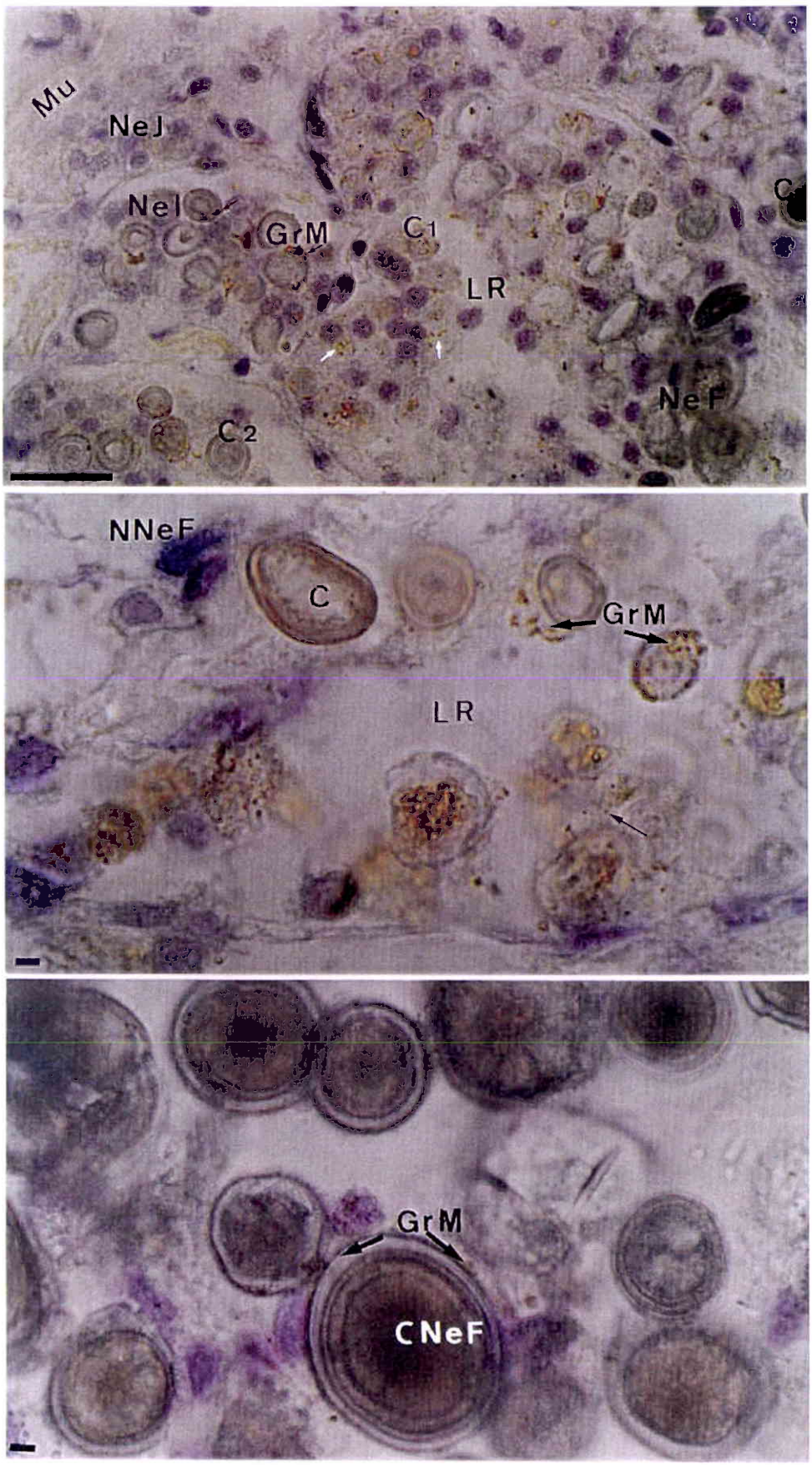
2. **Détail du cliché 1 (G x 1.000)**

   Situation intra-cytoplasmique (flèche fine) puis péri-concrétionnaire (flèches épaisses) des grains Möller positifs signalant la présence de plomb.

3. **Rein d'animal contaminé en présence de poudre de plomb à 25% dans la nourriture Helixal® (coupe à la paraffine (épaisseur 7 µm) avec une coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 1.000)**

   Concrétions en phase finale de biogénèse. Taille à comparer avec celle des concrétions en début de formation. Pas de réaction Möller positive dans les concrétions. Quelques grains en périphérie des concrétions.

Planche IV18



1

2

3

Planche IV_{19} : Rein (microscopie optique) (Echelle = 10 µm)

1. **Rein d'animal contaminé en présence de poudre de plomb à 25% dans la nourriture Helixal® (coupe à la paraffine (épaisseur 7µm) avec une coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 250)**

   Mise en évidence dans la lumière rénale de déchets cellulaires néphrocytaires associés à des granules Möller positifs (présence de plomb).
   Désorganisation de l'épithélium rénal avec libération des concrétions Möller négatives (C).

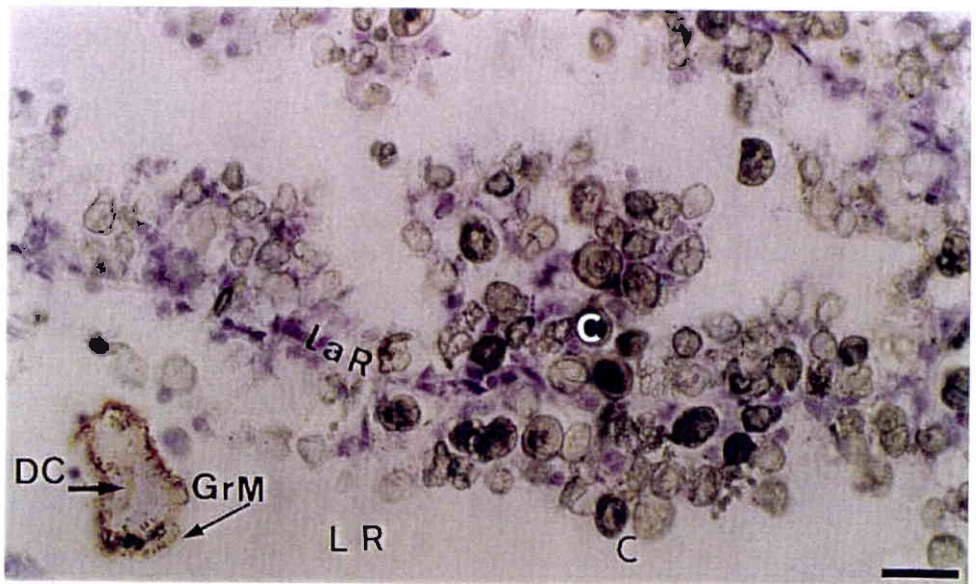
2. **Rein d'animal contaminé en présence de poudre de plomb à 25% dans la nourriture Helixal® (coupe à la paraffine (épaisseur 7µm) avec une coloration au Möller et au bleu de toluidine ; G x 400)**

   Corps résiduels dans la lumière rénale avec des granules Möller positifs. Il y a également des granules, Möller positifs, dans la vacuole apicale.

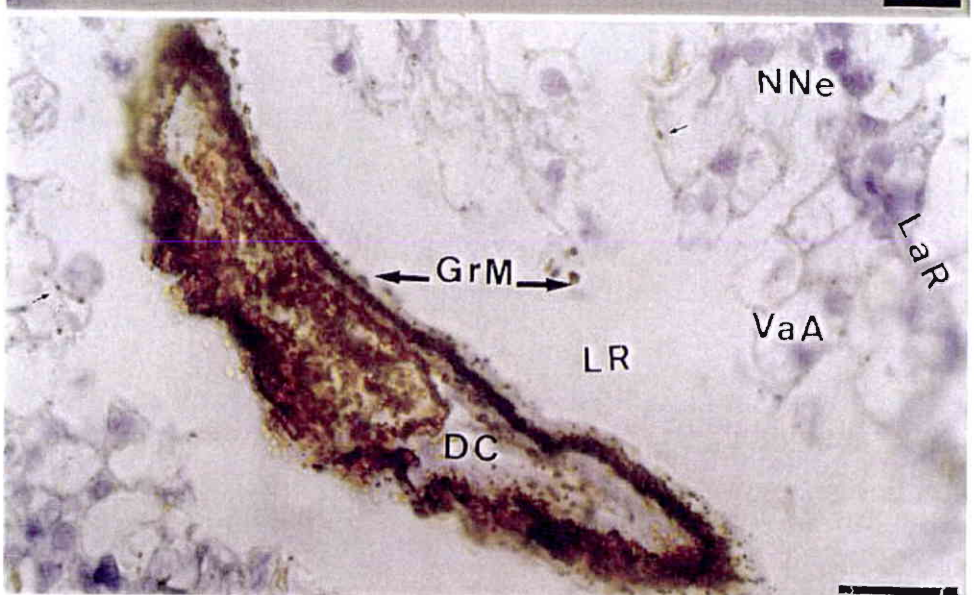
4. **Canal urinaire d'un animal contaminé en présence de poudre de plomb à 25% dans la nourriture Helixal® (coupe à la paraffine (épaisseur 7µm) avec une coloration au Möller seul ; G x 400)**

   Présence de granules Möller positifs dans des vacuoles d'endocytose apicale. Mise en évidence d'une réabsorption de plomb par les cellules de l'uretère primaire.

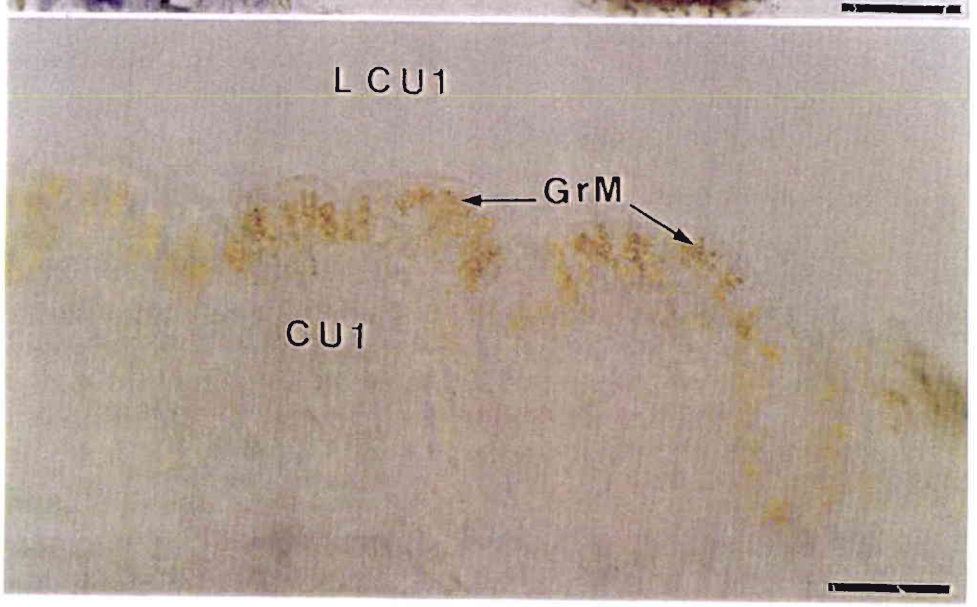
Planche IV$_{19}$



1



2



3

III.2.2. Description du néphrocyte au stade final (figure 84 et planches IV_{20}, IV_{21} et IV_{22})

a. Liaisons intercellulaires – Membrane plasmique basale – organites du cytoplasme basal

Chaque néphrocyte est relié aux néphrocytes voisins et du côté apical, par des desmosomes cloisonnés (« septate junctions »). L'espace intercellulaire, bien visible, permet le passage d'un ultrafiltrat pouvant traverser les jonctions cloisonnées (Skelding, 1973), et contient même chez *Arion ater* des corps membranaires pouvant être déchargés dans la vacuole apicale (Angulo et Moya, 1985 et 1989).

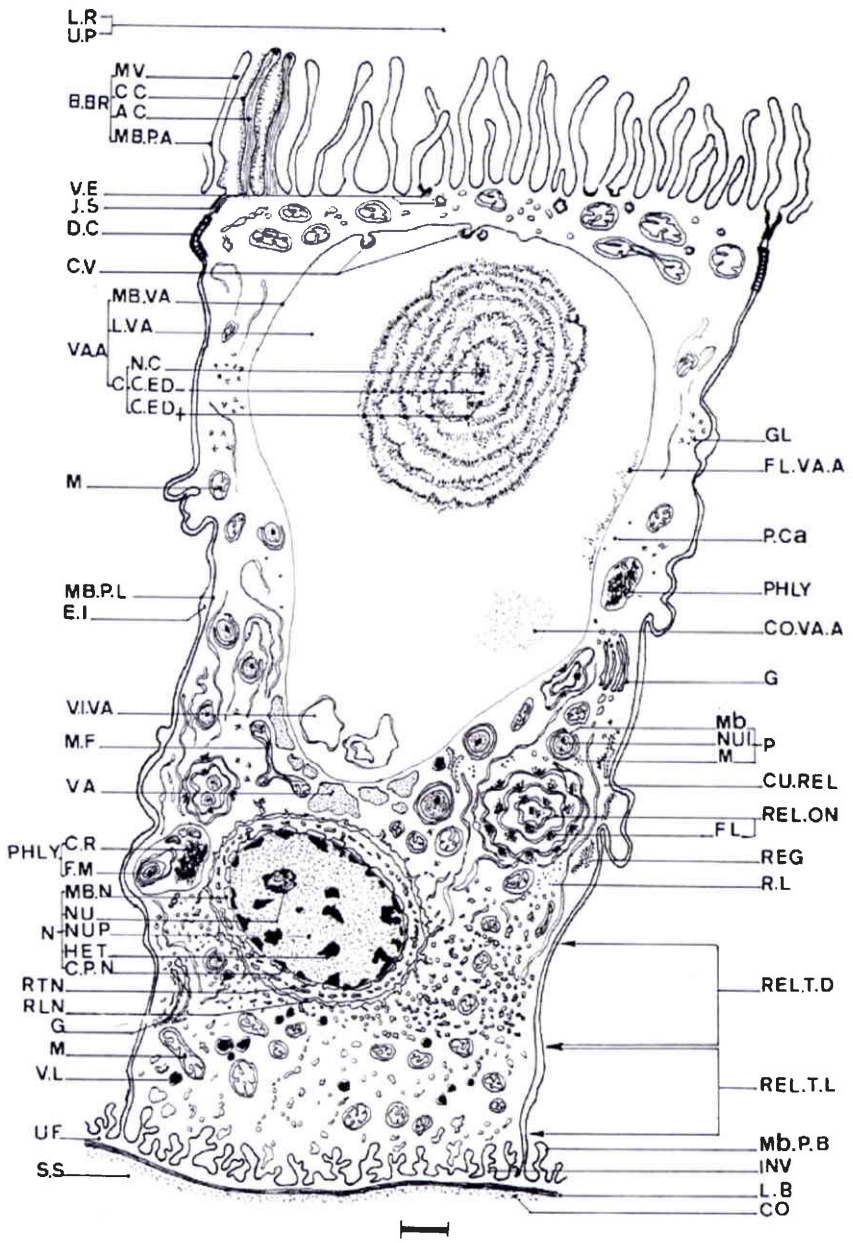


Figure 84 : Schéma de l'ultrastructure d'un néphrocyte de *Helix aspersa aspersa* au stade final, en situation apicale sur la lamelle rénale. (échelle = 1µm)
légende : *Cf.* listes des abréviations.

La membrane plasmique basale présente de nombreuses invaginations comme déjà décrites chez les gastéropodes par Bouillon (1960), Skelding (1973) Martoja (1975) Sanchez *et al.* (1980). Les vésicules d'endocytose (vésicules à manteau) sont nombreuses et de même que Sanchez *et al.* (1980) l'ont montré, il y a confluence ultérieure avec des lysosomes primaires. Comme souligné par Martoja (1975) chez le prosobranche *Pomatias elegans*, les mitochondries ne sont pas étroitement associées aux invaginations de la membrane plasmique basale comme c'est le cas pour les cellules du tube contourné proximal du rein des vertébrés, assurant entre autres, le passage de Na^+ du milieu intracellulaire au liquide interstitiel (Maillet, 1986).

Cette zone d'invaginations se prolonge par un réseau de réticulum endoplasmique lisse tubulaire lâche avec intercalation de mitochondries et de gouttelettes lipidiques dont l'origine est la dégénérescence mitochondriale, comme cela a été mis en évidence antérieurement, chez les gastéropodes, par Skelding (1973), Martoja (1975), Sanchez *et al.* (1980) avec mise en évidence de lipofuscines

b. Zone nucléaire et péri-nucléaire

Au quart inférieur du néphrocyte se situe la zone nucléaire et péri-nucléaire.

b_1 Le noyau

Le noyau, à hétérochromatine marginale, présente une membrane nucléaire en contact avec un réticulum endoplasmique lisse tubulaire péri-nucléaire, lui-même prolongé par un réticulum endoplasmique lisse lamellaire péri-nucléaire se prolongeant, du côté basal, par un ensemble de réticulum endoplasmique lisse tubulaire très dense avec quelques mitochondries, de rares structures golgiennes et quelques péroxysomes qui seront décrits ultérieurement dans le cytoplasme infra-vacuolaire et péri-vacuolaire.

Le cytoplasme péri-nucléaire infra-vacuolaire présente les organites les plus spécifiques et originaux du néphrocyte de *Helix aspersa aspersa* à savoir :

- ✓ Un réticulum endoplasmique lamellaire ondulé
- ✓ De nombreux péroxysomes avec leur cupule de réticulum endoplasmique lisse
- ✓ Des ribosomes libres et peu de réticulum endoplasmique granuleux
- ✓ Des vacuoles ou citernes du réticulum endoplasmique lisse lamellaire
- ✓ Des dictyosomes
- ✓ Des autophagolysosomes ou hétérophagolysosomes
- ✓ Quelques globules lipidiques
- ✓ Des mitochondries géantes et fourchues
- ✓ Des rosettes de glycogène

La description des ces organites sera effectuée en comparaison des données bibliographiques.

b_2. Le réticulum endoplasmique lamellaire ondulé, les péroxysomes et les ribosomes libres

Le cytoplasme péri-nucléaire, situé entre le noyau et la vacuole apicale, présente des structures concentriques ondulées du réticulum endoplasmique lisse pouvant être comparées, d'une manière imagée, à des coupes de «bourgeons floraux». A leur périphérie immédiate ou au centre, existent de nombreux péroxysomes.

Ce **réticulum ondulé,** en association étroite avec les péroxysomes, n'a, selon nos données bibliographiques, jamais été observé dans les néphrocytes de gastéropodes. Par contre, la présence de péroxysomes est connue depuis 1973 (Skelding chez *Achatina achatina*).

Bubel (1989) cite, parmi les différentes structures dérivant du réticulum endoplasmique lisse, le réticulum ondulant des invertébrés et des vertébrés. De telles structures sont jugées responsables, par exemple, de la synthèse et de l'accumulation de cholestérol, du stockage de vitamine A, du métabolisme et du transfert de photopigments. L'ondulation est considérée comme un moyen de réaliser une grande surface dans un faible espace. Chez le gastéropode *Spirilla neapolitana*, un réticulum endoplasmique ondulant est observé dans la spermatide en association avec un complexe de Golgi (Eckelbarger in Bubel, 1989) ; un floculum électrondense est associé avec le réticulum endoplasmique (figure 84), il y a continuité entre les membranes du réticulum endoplasmique granuleux, du réticulum endoplasmique lisse et des citernes ondulantes.

Nos observations chez *Helix aspersa aspersa* montrent une proximité très étroite avec les péroxysomes dont on sait que, parmi les hypothèses de biogénèse (Berkaloff *et al.*, 1981 ; Theret *et al.*, 1985), ils peuvent se former, par accumulation d'enzymes de la matrice et du nucléoïde dans des citernes du réticulum endoplasmique lisse. L'interprétation la plus plausible est que dans le néphrocyte de *Helix aspersa aspersa* qui présente un renouvellement des péroxysomes rapide et intense, le réticulum endoplasmique lisse ondulé représente un stade de formation des péroxysomes à savoir celui où les protéines enzymatiques, synthétisées dans le cytosol par les ribosomes libres, se fixent sur des récepteurs du réticulum endoplasmique lisse (floculum électrondense) avant de pénétrer dans une citerne, en cours de bourgeonnement, du réticulum endoplasmique lisse en donnant naissance à un nouveau péroxysome.

Les deux autres hypothèses de biogénèse du péroxysome sont une pré-existence avec multiplication par bourgeonnement ou une origine mixte, avec bourgeonnement et néoformation, à partir du réticulum endoplasmique lisse.

Les **péroxysomes** sont de grande dimension avec une matrice et un nucléoïde rhomboïde central très électrondense comme décrit dans la partie bibliographique. Ils sont entourés par une cupule du réticulum endoplasmique lisse. Ils ont été décrits successivement par Skelding (1973) chez *Achatina achatina* et *Helix pomatia*, par Diaz-Cosin (1977) chez *Theba pisana* et par Sanchez *et al.* (1980) chez *Helix aspersa*. D'un diamètre de 0,5 µm à 1,2 µm, ils sont toujours associés au réticulum endoplasmique lisse. Selon les auteurs cités ci-dessus, ils sont le lieu de la synthèse des urates à partir des purines (figure 85).

De fait, les escargots terrestres pulmonés sont uricotéliques, effectuant la synthèse d'acide urique transformé ensuite en urate en présence de cations. Par contre, le gastéropode terrestre prosobranche *Pomatias elegans* (Martoja, 1975) n'excrète par d'acide urique par le rein dont les néphrocytes ne présentent pas de péroxysomes.

Les gastéropodes marins sont ammonotéliques de même que *Hydrobia jenkensi* qui aurait colonisé récemment les eaux douces (Bouillon, 1960).

Rappelons que les enzymes du péroxysomes (figure 85) sont dans la matrice, la xanthine oxydase permettant la synthèse d'acide urique à partir des bases puriques et de la xanthine en même temps que des catalases transforment le péroxyde d'hydrogène. La présence du nucléoïde, riche en une enzyme flavinique contenant du cuivre (l'urate oxydase ou uricase) indique la capacité de poursuivre la dégradation des déchets puriques jusqu'à l'allantoïne puis en présence d'allantoïnase et d'allantoïcase avec hydratations successives jusqu'à l'acide allantoïque et l'urée dont on connaît la présence chez l'escargot en période d'activité. L'escargot *Helix aspersa aspersa* présente donc un catabolisme azoté préférentiellement uricotélique allant, en période d'activité, jusqu'à l'uréotélie (Delaunay, 1931 *in Bouillon*, 1960). Certains organismes possèdent une uréase dégradant l'urée en NH_4^+ et CO_2, c'est le cas des invertébrés marins ammonotéliques.

Rappelons que l'Homme possède un catabolisme azoté uréotélique et une dégradation des bases puriques de type uricotélique, avec excrétion d'une urine de composition « normale » suivante :

Substances organiques :	Urée	20 à 30 g/l
	Créatinine	1,2 g/l
	Acide urique	0,6 g/l
	NH_4	0,5 à 0,9 g/l
Substances minérales :	Na^+	6 g/l
	Cl^-	7 g/l
	K^+	2 g/l
	SO_4^{2-}	1,8 g/l
	PO_4^{3-}	1,7 g/l
	Ca^{2+}	0,2 g/l

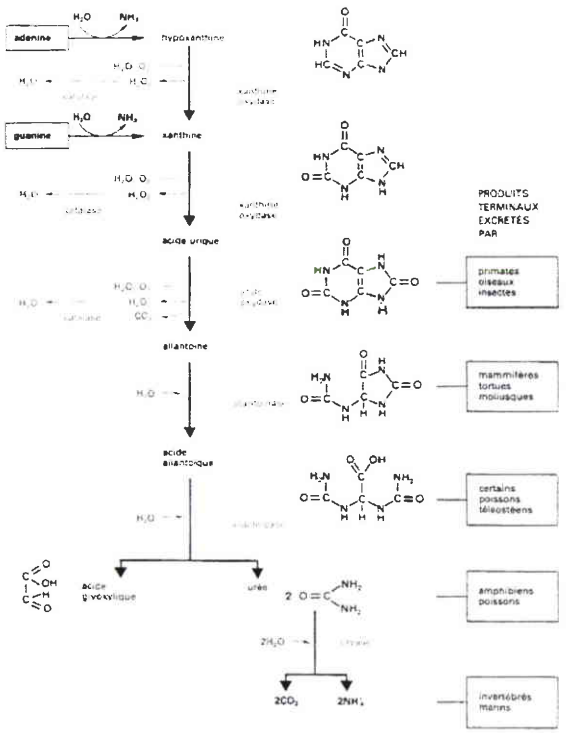


Figure 85 : Catabolisme des purines et des produits terminaux chez les animaux (d'après Berkaloff *et al.*, 1981).

Planche IV_{20} : Rein (microscopie électronique) (Echelle = 0,5 µm)

1. **Coupe dans trois néphrocytes témoins, en situation apicale sur une lamelle rénale, contenant une concrétion dans la vacuole apicale (G x 4.000)**

   Lumière rénale avec des microvillosités du pôle apical ; cytoplasme basal en cupule contenant le noyau ; cytoplasme apical et pariétal peu épais ; vacuole apicale avec un espace ayant contenu la concrétion ; citerne du REL ; REL ondulé ; Péroxysomes ; mitochondries filamenteuses ; vésicules lipidiques.

2. **Détail de la figure 1, néphrocyte témoin (G x 7.500)**

   Invagination de la membrane cytoplasmique du pôle basal.
   REL tubulaire – Péroxysome entouré de REG en continuité avec le REL (uricases dans le nucléoïde et catalases dans la matrice) ; mitochondries filamenteuses ; citernes du REL.
   REL périnucléaire lamellaire puis tubulaire.
   Membrane nucléaire, hétérochromatine.

3. **Détail de l'ultrastructure de la cupule cytoplasmique basale. Néphrocyte témoin (G x 5.000)**

   Collagène basal, membrane cytoplasmique basale invaginée.
   REL tubulaire lâche, REL tubulaire dense, REL lamellaire ondulé avec centres de biosynthèse.
   Mitochondries, péroxysomes, noyau et vacuole apicale.

Planche IV_{20}

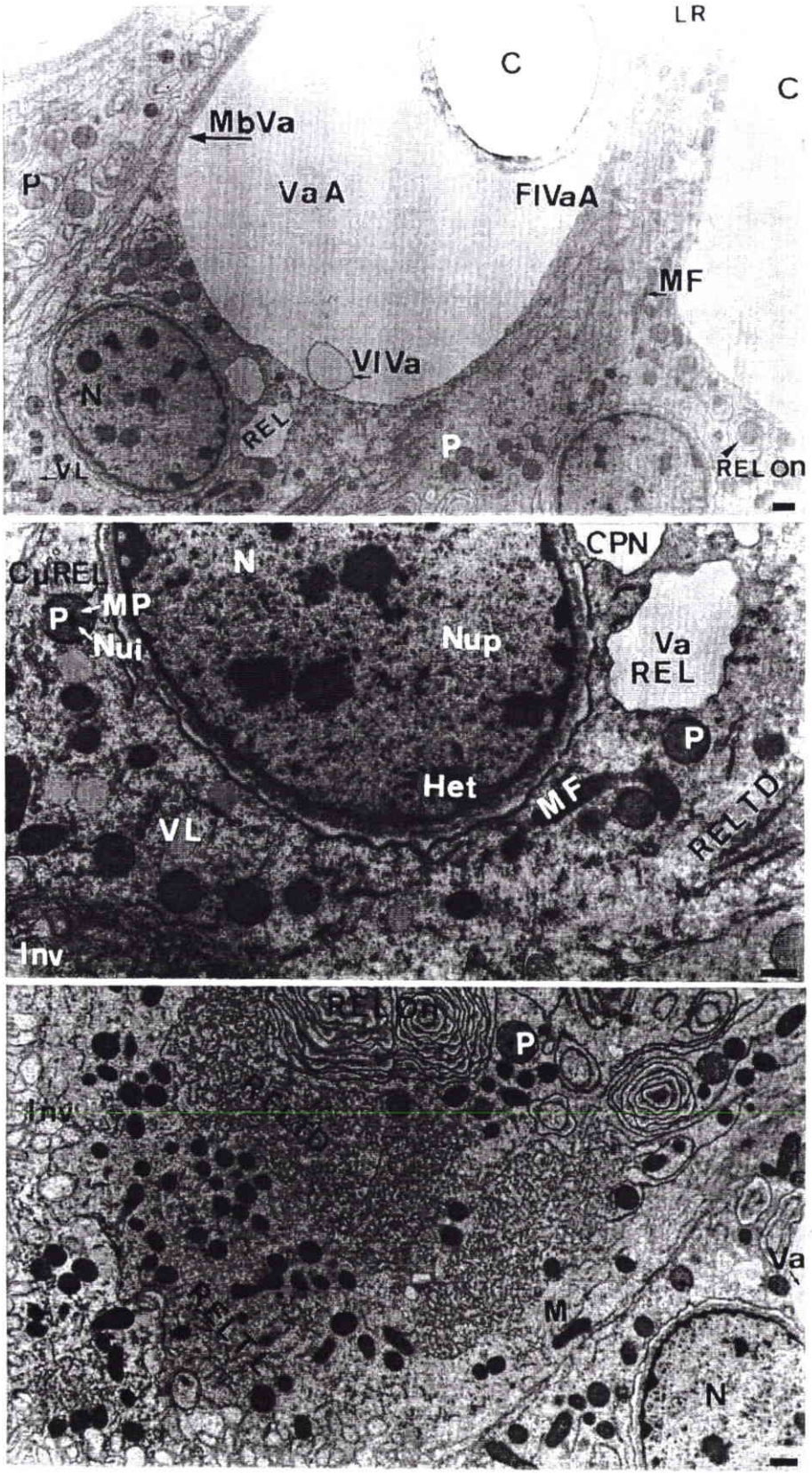


Planche IV_{21} : Rein (microscopie électronique) (Echelle = 0,5 µm)

1. **Détail de la figure 3, planche IV_{20} : néphrocyte témoin (G x 13.000)**

   REL lamellaire ondulé avec floculum de biosynthèse régulièrement espacé avec une convergence du floculum vers des centres électrondenses (*) interprétés comme des péroxysomes en formation ; mitochondries.

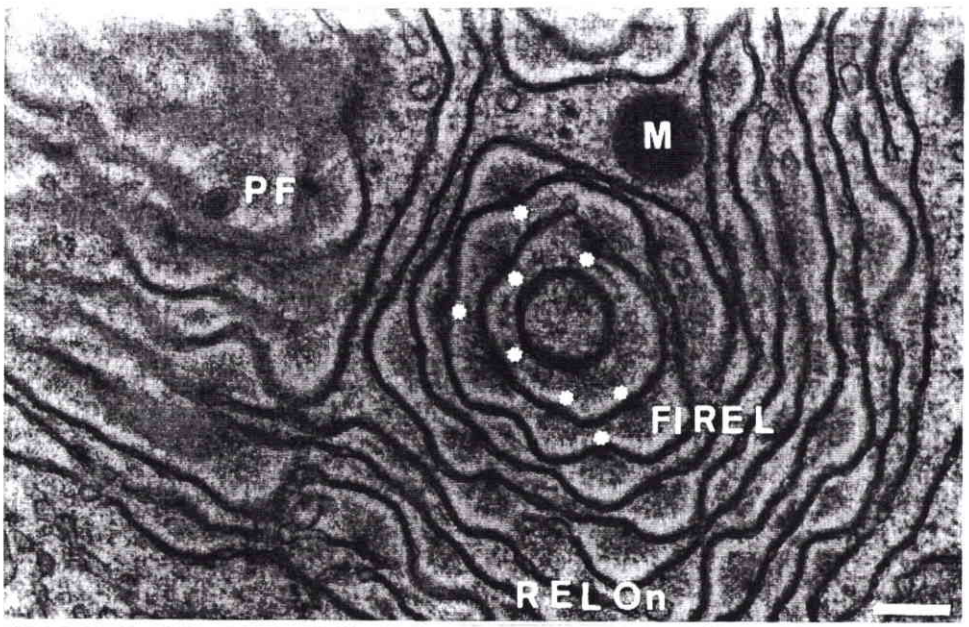
2. **Néphrocyte témoin (G x 10.000)**

   Pôle apical, lumière rénale, microvillosités avec de l'actine ; endocytose et formation de vésicules tapissées (VE_1 et VE_2), mitochondries filamenteuses, vacuole apicale et REL. Des vésicules confluent avec la vacuole apicale

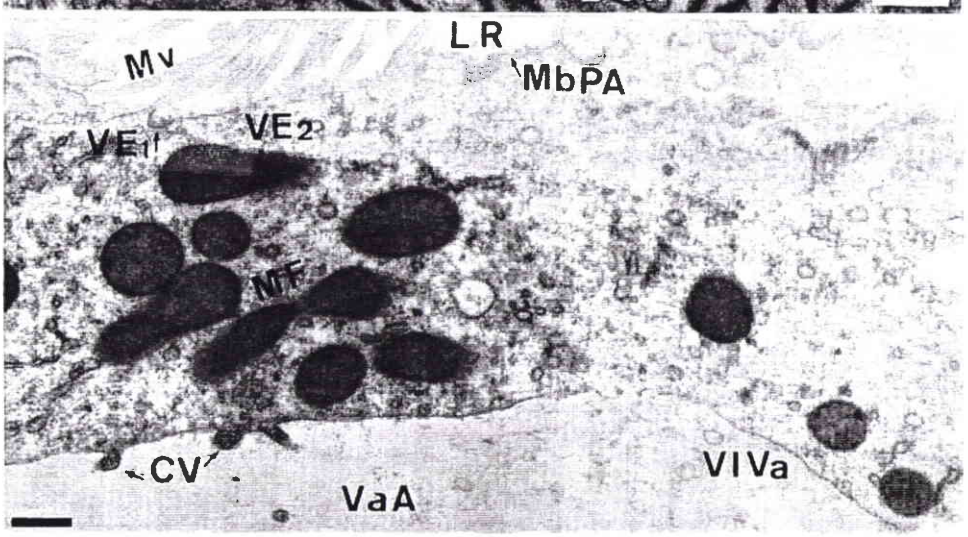
3. **Détail de la concrétion siliceuse : néphrocyte témoin (G x 7.500)**

   Noyau de la concrétion, couches concentriques avec une alternance de couches électrondenses et non électrondenses, couche en formation, vacuole apicale.

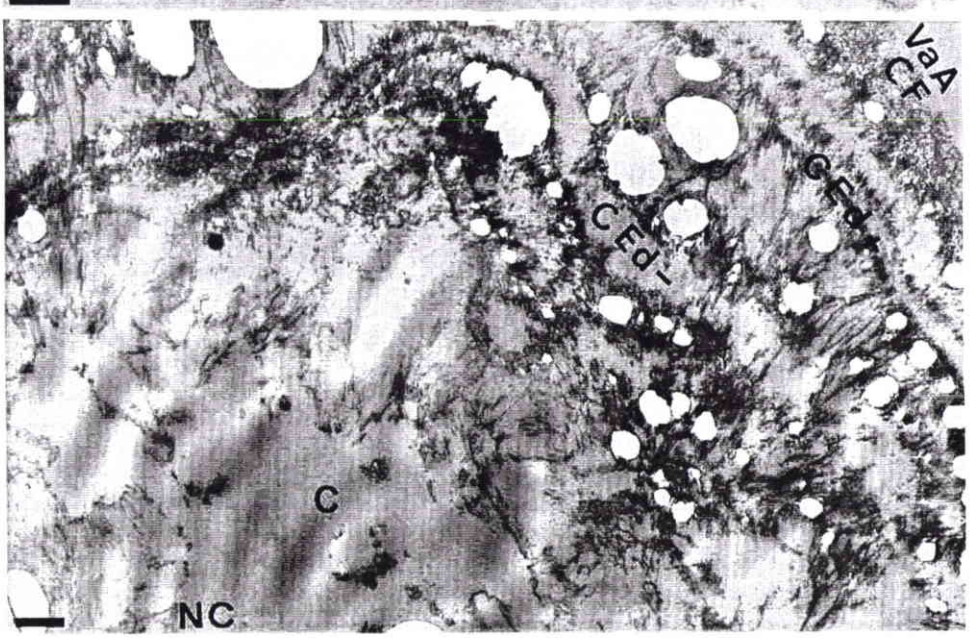
Planche IV_{21}



1



2



3

Planche IV_{22} : Rein (microscopie électronique) (Echelle = 0,5 µm)

1. **Détail d'une mitochondrie filamenteuse : néphrocyte témoin (G x 13.000)**

   Membrane externe mitochondriale ; membrane interne et crêtes ; granule mitochondrial de phosphate de calcium ; citerne du REL, glycogène en rosette.

2. **Néphrocyte témoin (G x 10.000)**

   Phase de destruction avec hétérophagolysosomes (corps résiduels, corps multi-vésiculaires), figures myéliniques, mitochondries, espace intercellulaire.

3. **Néphrocytes d'un animal nourri avec une addition de plomb particulaire dans la nourriture (G x 4.000)**

   Phagolysosomes avec du plomb, vacuoles apicales, emplacements des concrétions de silice, noyau de néphrocyte.

Planche IV_{22}

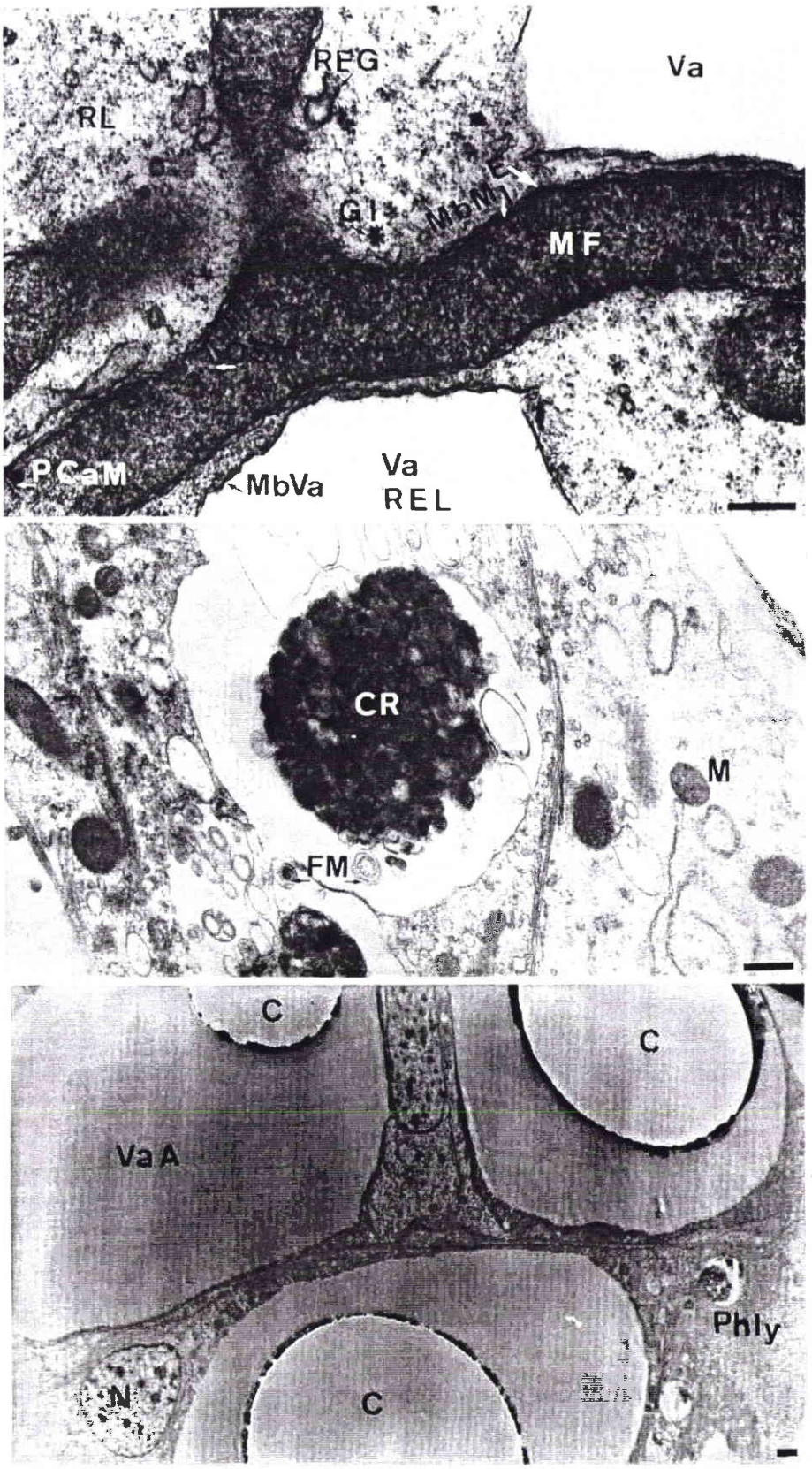


Planche IV_{23} : Rein (microscopie électronique) (Echelle = 0,5 µm)

1. **Détail du cytoplasme pariétal : néphrocyte d'un animal nourri avec une addition de plomb particulaire dans la nourriture (G x 10.000)**

   Hétérophagolysosomes avec du plomb à proximité de la vacuole apicale ; mitochondries ; figures myéliniques ; REG ; noyau.

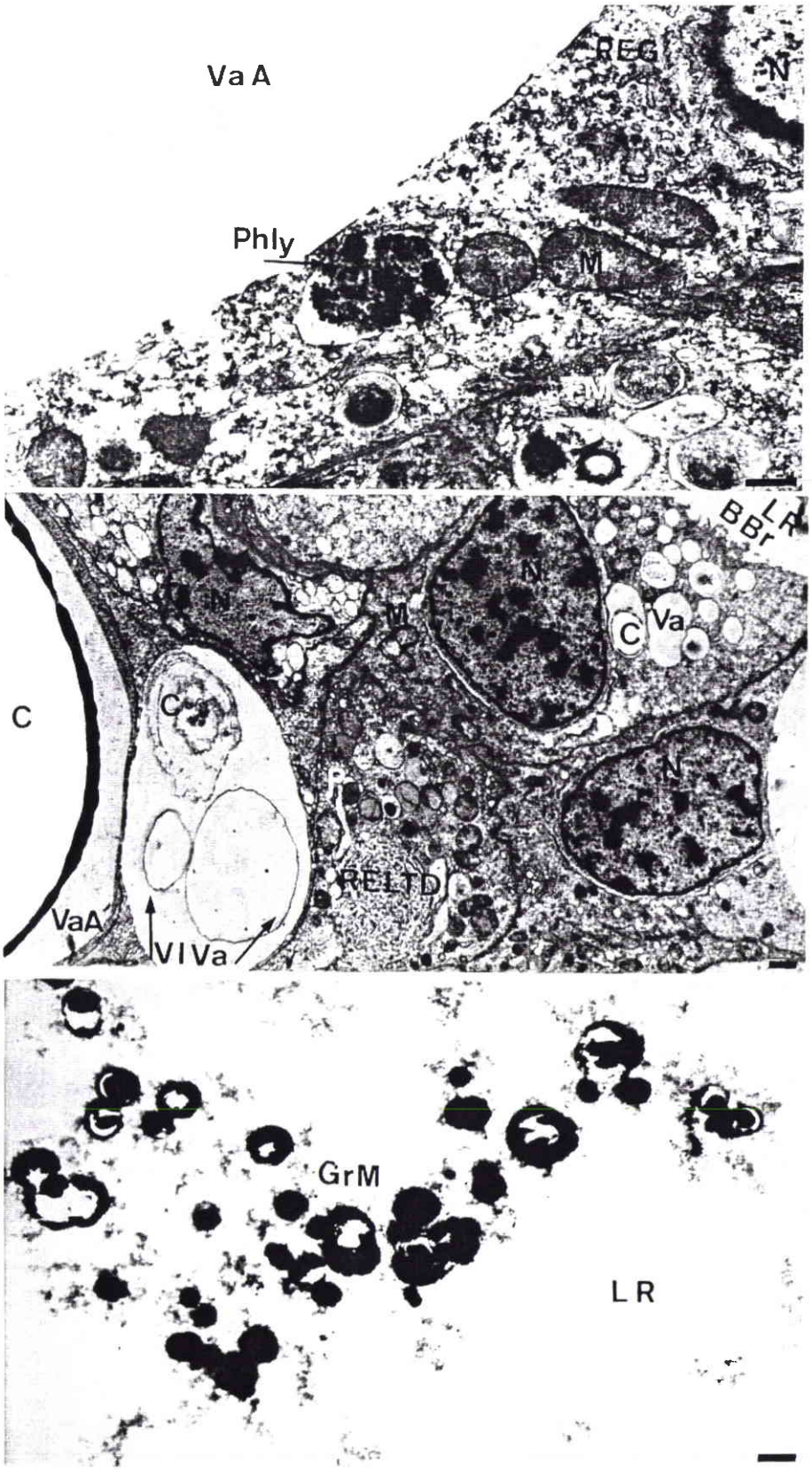
2. **Néphrocyte, en position moyenne sur la lamelle rénale, d'un animal nourri avec une addition de plomb particulaire dans la nourriture (G x 5.000)**

   Lumière rénale et microvillosités de la bordure en brosse ; noyaux (3) ; mitochondries ; grande vacuole apicale avec emplacement de la concrétion de silice. Corps multi-vésiculaires avec début de formation de la concrétion ; REL tubulaire dense, grains électrondenses métalliques ; augmentation du nombre de vacuoles au pôle apical, péroxysomes.

3. **Animal transféré à proximité d'une autoroute (G x 7.500)**

   Grains métalliques au centre de la lumière rénale.

Planche IV_{23}



b_3 Vésicules, vacuoles et citernes du réticulum endoplasmique lisse

La présence dans le cytoplasme péri-nucléaire de vacuoles confluant avec la vacuole apicale indique un transfert possible des produits du catabolisme azoté dans l'espace ergastoplasmique puis leur transfert dans la vacuole apicale avec formation de réseaux membranaires intra-vacuolaires. Ceci est conforme aux observations de Skelding (1973) chez *Achatina achatina*, de Diaz-Cosin (1977) chez *Theba pisana* et de Angulo et Moya (1985 – 1989) chez *Arion ater*.

b_4 Dictyosomes ; phagolysosomes et globules lipidiques péri-vacuolaires

L'activité golgienne se révèle par l'existence de phagolysosomes contenant des corps résiduels à figures myéliniques et de globules lipidiques péri-vacuolaires provenant de stades de destruction des mitochondries. Ces observations sont en accord avec les observations de Bouillon (1960) chez *Helix pomatia*, de Skelding (1973) chez *Achatina achatina*, de Martoja (1975) chez *Pomatias elegans* et d'Angulo et Moya (1984 – 1989) chez *Arion ater*. En présence de poudre de plomb, de nombreux phagolysosomes contiennent du plomb (planche IV_{18}, figures 2 et 3 et planche IV_{23}, figure 1).

b_5 Mitochondries et rosettes de glycogène

Les mitochondries de la zone péri-vacuolaire sont géantes, polymorphes, parfois ramifiées ou «branchues» comme déjà désignées par Skelding (1973) chez *Achatina achatina*.

Les rosettes de glycogènes, abondantes dans le cytoplasme, représentent la source d'énergie. Cette réserve a été déjà observée par Skelding (1973) chez *Achatina achatina*, par Diaz-Cosin (1977) chez *Theba pisana* et par Sanchez *et al.* (1980) chez *Helix aspersa*.

Des grains électrondenses de phosphate de calcium sont disséminés dans le cytoplasme.

c. La vacuole apicale et la concrétion

c_1 La vacuole apicale

La vacuole apicale, formée du côté basal par l'activité du réticulum endoplasmique lisse, et confluence de certains phagolysosomes, occupe au moins 50 % du volume du néphrocyte de l'apex des lamelles. Elle est également formée, du côté apical, par la confluence de vésicules d'endocytose de la membrane plasmique apicale.

Le liquide vacuolaire présente, à la face interne de la membrane vacuolaire, un floculum de matières organiques vraisemblablement formées par les produits du catabolisme azoté et, dans certains néphrocytes, une suspension colloïdale dont la nature se révèle être, en microanalyse EDX, de la silice colloïdale (cf. chapitre suivant). Par ailleurs, on peut suspecter la présence d'électrolytes divers.

c_2 La concrétion

La concrétion unique, globuleuse, peut occuper la presque totalité de la vacuole apicale ou une fraction. En coupe, qui s'avère toujours difficile, une concrétion se révèle formée d'une succession de couches électrondenses et non électrondenses. Nous préférons le terme de concrétion à celui de sphérocristal car la structure est amorphe et non cristalline.

Chez les gastéropodes pulmonés, les auteurs (Bouillon, 1960 ; Skelding, 1973 ; Diaz-Cosin, 1977 ; Sanchez *et al.*, 1980 et Angulo et Moya, 1984 – 1989) s'accordent tous sur la présence d'acide urique et d'urates du fait de la présence de cations tels que K^+ et Ca^{2+}. Certains auteurs mettent en évidence également la présence de guanine, de mucopolysaccharides et de lipides. Nous approfondirons cette étude dans le chapitre réservé à la microanalyse.

Les néphrocytes des gastéropodes prosobranches ne possèdent pas d'acide urique dans les inclusions néphrocytaires mais des corps résiduels variés, riches en phosphate de calcium associant aussi Mn, Mg, K, S, Zn, Fe et Cu (Martoja, 1975).

Une observation à un grossissement x 2 (figure 86) du cliché n°3 (planche IV_{21}), soit un grossissement x 15.000, permet de voir des structures tubulaires très fines présentes dans les couches électrondenses (a) mais aussi, en moins grande quantité, dans les couches non électrondenses (b), donnant lieu, à un grossissement inférieur, à une interprétation radiaire microfibreuse. La nature de la concrétion sera étudiée par microanalyse EDX et EEL.

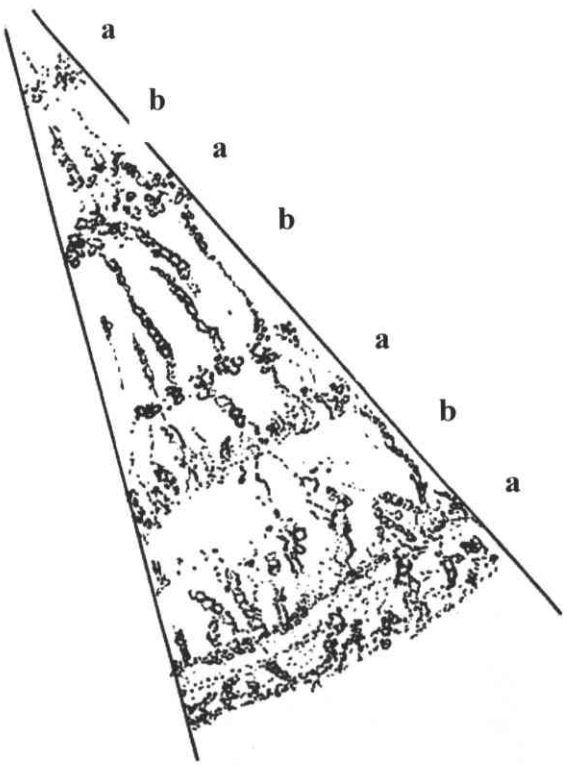


Figure 86 : Détail d'une concrétion rénale (x 15.000). a : couches électrondenses ; b : couches non électrondenses.

d. Le cytoplasme apical et la membrane plasmique apicale

Le néphrocyte des gastéropodes pulmonés terrestres présente une bordure en brosse bien développée du moins chez le néphrocyte jeune et intermédiaire. Cette bordure en brosse diminue chez les néphrocytes de l'apex des lamelles.

Nous observons, au sein des microvillosités, des fibres d'actine et des figures d'endocytose à la base des microvillosités. Certaines de ces vésicules à manteau confluent avec la vacuole apicale. Les mitochondries sont nombreuses.

Il y a donc chez *Helix aspersa aspersa* une activité de réabsorption de certains constituants de l'urine primaire au niveau du pôle apical. Chez le gastéropode prosobranche *Pomatias elegans*, Martoja (1975) signale l'absence de bordure en brosse et une faible activité de réabsorption.

III.2.3. La lumière rénale et l'urine primaire

Nous avons observé (planche IV_{19}, figures 1 et 2 et planche IV_{23}, figure 3), au centre de la lumière rénale, des débris cellulaires (corps myéliniques) et en cas de contamination par de la poudre de plomb, des particules de plomb avec, selon le cas, la présence ou non de concrétions. Ceci est conforme aux observations des auteurs déjà cités.

Rappelons que selon Sanchez *et al.* (1980), il y a, chez *Helix aspersa*, fonte totale de la cellule rénale en fin de vie (holocrinie) avec libération de la concrétion et des débris cellulaires.

III.3. L'uretère primaire

Nos observations de réabsorption de certains constituants de l'urine primaire (planche IV_{19}, figure 3), au niveau de l'uretère primaire, sont conformes à celles de Bouillon (1960) chez *Helix pomatia* et de Skelding (1973) chez *Achatina achatina*. Cette réabsorption se fait au niveau des cellules ciliées entraînant l'urine vers l'extérieur.

L'étude cytochimique, en cas d'intoxication par de la poudre de plomb, met en évidence la présence de grains de plomb au pôle apical des cellules en bâtonnets.

Cette appellation dérive du fait de la présence, en microscopie électronique à transmission, d'invaginations importantes de la membrane plasmique basale associées, dans ce cas, avec des mitochondries très nombreuses et très développées.

III.4. Etude par microanalyse de la localisation des métaux dans le néphrocyte (tableau 59 et planches IV_{24} à IV_{28})

Les microanalyses EDX et EEL permettent de préciser la localisation cellulaire de certains composés organiques et des éléments minéraux du néphrocyte.

Nous présenterons d'abord les éléments minéraux du néphrocyte puis les composés organiques constitutifs des concrétions.

III.4.1. Eléments minéraux du néphrocyte

Nous traiterons successivement et dans l'ordre de progression des produits d'excrétion vers la lumière rénale, du cytoplasme et des organites cytoplasmiques, de la vacuole excrétrice apicale et des concrétions.

a. Cytoplasme et organites cytoplasmiques

- Le réticulum endoplasmique ondulé a pu faire l'objet d'une étude par microanalyse des produits liés à une des membranes du réticulum. Il s'agit de substances organiques sans présence, à un niveau détectable, de silice ou de métaux (ligne 1 du tableau 59) ce qui renforce notre hypothèse sur la participation indirecte de ce réticulum spécifique dans le catabolisme des produits azotés en étant l'un des organites responsables de la biogenèse des péroxysomes. Les relations de proximité entre le réticulum endoplasmique ondulé, les mitochondries et les péroxysomes sont également un fait renforçant l'hypothèse. Parmi les hypothèses actuelles, il y aurait soit un bourgeonnement de nouveaux péroxysomes à partir de péroxysomes préexistants soit une origine mixte par bourgeonnement et biogenèse à partir du réticulum endoplasmique ondulé.

- Le système lysosomal montre, dans le cas d'une contamination par ajout de poudre de plomb à l'aliment (25%), la présence des éléments suivants dans les phagolysosomes : O, Pb, Si, P, Ca, Na et K (ligne 6 du tableau 59 ; Planche IV_{24}, figures 11, 12 et 13). Ca, Na et K ayant été détectés en analyse LAMMA.

- Des grains électrondenses du cytoplasme présentent plusieurs constituants, variables selon le type de contamination.

  - Après contamination par de la poudre de plomb en ajout à l'aliment (25%), deux cas sont à distinguer :

- Présence de grains essentiellement minéraux avec O, Pb, P, Si et Ca (ligne 7 du tableau 59 ; planche IV_{24}, figures 6 et 9).

- Présence de grains associant composés organiques dominants et éléments minéraux en traces : (C, N, O), Si, P, K et Ca (ligne 8 du tableau 59 ; planche IV_{24}, figure 10).

  - Après contamination par de la poudre de zinc en ajout à l'aliment (25%), des grains cytoplasmiques associent à de la matière organique les éléments O, P, K, Cu, Ca et Zn (ligne 14 du tableau 59 ; planche IV_{25}, figure 4). Par ailleurs, certaines structures identifiables à de l'hémocyanine présentent les éléments O, K, Cu, P, Ca et Zn (ligne 15 du tableau 59 ; planche IV_{25}, figure 5).

  - Après contamination par des poussières d'aciérie (25% dans le sol et 25% dans l'aliment), des grains de phosphate de calcium sont associés à d'autres éléments : O, P, Ca, Mg, Si et Zn avec rarement du plomb (ligne 18 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figure 11). Des vésicules, riches en substances carbonées, contiennent également les éléments O, Si et S (ligne 17 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figure 10).

Ainsi, les grains de phosphate de calcium peuvent être associés, après contamination par des métaux particulaires à du plomb et du zinc ainsi qu'à des métalloprotéines telles que l'hémocyanine contenant du cuivre.

Tableau 59 : Eléments organiques (M.O. avec C, N et O) et minéraux détectés en EDX dans le néphrocyte témoin dans diverses conditions de contamination (25% de poudre de plomb ou de poudre de zinc dans l'aliment ; 25% de poussières d'aciérie dans le sol et l'aliment ; 444 ppm de sel de cadmium en solution dans le sol). Lignes numérotées de 1 à 27 ; +++ : Présence abondante ; ++ : présence moyenne ; + : présence faible ; P : présence fréquente mais à l'état de traces ; R : rarement détecté

							Classe A					Transition				Classe B		
			M.O.	O	P	Si	Na	Mg	K	Ca	Al	Cd	Fe	Zn	Mn	Cu	Pb	S
Néphrocyte témoin																		
RE ondulé		1	+++	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Concrétion																		
Néphrocyte jeune	Couche électrondense	2	+++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P
	Couche non-électrondense	3	+	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Néphrocyte. final	Couche électrondense	4	+++	+	-	+	-	-	+	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	Couche non-électrondense	5	+	++	-	+++	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Contamination 25% Pb (aliment)																		
Phagolysosome		6	++	+++	+	+	(+)	-	(+)	(+)	-	-	-	-	-	-	+++	-
Grains cytoplasmiques		7	-	+	+	+	-	-	-	P à +	-	-	-	-	-	-	++à+++	
		8	+++	+	P	P	-	-	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-
Vacuole apicale	Grains	9	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-
	Floculum	10	+++	+	-	+	-	-	P	P	-	-	-	-	-	-	-	-
Concrétion	Couche externe	11	+++	+	-	++	-	-	P	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Couche électrondense	12	+++	+	-	+	-	-	+	P	-	-	-	-	-	-	-	-
	Couche non-électrondense	13	+	++	-	+++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Contamination 25% Zn (aliment)																		
Grains cytoplasmiques		14	+	++	++	-	-	-	+	P	-	-	-	P	-	+	-	-
Hémocyanine		15	+	++	+	-	-	-	+	P	-	-	-	P	-	+	-	-
Concrétion		16	+	++	-	+à+++	-	-	++	+à++	-	-	-	-	-	-	-	-
Contamination par de poussières d'aciérie (25% sol et aliment)																		
Vésicules cytoplasmiques		17	+++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P
Grains cytoplasmiques		18	-	++	++	+	-	+	-	++	-	-	-	P	-	-	R	-
Vacuole apicale	Floculum	19	+++	+	-	P	-	P	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P
Concrétion	Bordure	20	+++	+	-	++	-	+	+	P	-	-	-	P	-	-	-	P
	Couche électrondense	21	+++	+	P	+ à ++	-	+àP	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Couche non-électrondense	22	+	+++	-	+++	-	+/-	+	+	-	-	P/-	P/-	-	-	-	P/-
Contamination par des poussières d'aciérie (75% sol)																		
Concrétions		23	++	+	-	+++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		24	++	+	-	++	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Contamination par un sel de cadmium (444 ppm dans le sol)																		
Concrétion	Couche la plus externe	25	+++	+	-	+	-	-	+	+	-	P	-	-	-	-	-	-
	Couche électrondense	26	+++	+	-	+	-	+	+	+	+	P	-	-	-	-	-	-
	Couche non-électrondense	27	+	++	-	+	-	-	++	+	-	P	-	-	-	-	-	-

b. Vacuole excrétrice apicale et la concrétion

b_1 Liquide vacuolaire

Dans le liquide vacuolaire, la présence de certains éléments a pu être constatée :

- En cas de contamination par ajout de poudre de plomb dans l'aliment (25%), on a pu identifier :

- Des grains contenant Pb et Si (SiO_2) (ligne 9 du tableau 59 ; planche IV_{24}, figure 7).
- Un floculum intra-vacuolaire contenant plus de matière organique et les éléments O et Si ainsi que des traces de K et de Ca (ligne 10, tableau 59 ; planche IV_{24}, figure 8).

- En cas de contamination par ajout de poussières d'aciérie (25% dans le sol et 25% dans l'aliment), on peut détecter, dans le floculum riche en matières organiques, des traces de Si, S et Mg (ligne 19 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figure 9).

b_2 La concrétion

Une des caractéristiques des concrétions rénales de *Helix aspersa aspersa* est la présence de silice à l'état amorphe (pas de diffraction), probablement faiblement hydratée (SiO_2nH_2O ou opale). Rappelons qu'une contribution importante de la silice est peu fréquente chez les organismes supérieurs. Elle constitue la frustule des diatomées, le squelette des radiolaires et des héliozoaires, les spicules des acanthaires avec un mélange de silicates d'aluminium et de calcium. La silice présente dans la vacuole apicale du néphrocyte (planche IV_{24}, figure 8) flocule, précipite et s'incorpore en couches successives à la concrétion.

Dans les concrétions en début de formation, la silice n'est pas associée à des cations ; occasionnellement, du soufre est détecté dénotant la présence de composés organiques soufrés, principalement dans les couches électrondenses (ligne 2 du tableau 59). Dans les couches non-électrondenses, il y a présence de plus de silice et peu de matière organique (ligne 3 du tableau 59). Par contre, dans les couches périphériques des concrétions des néphrocytes au stade final, il y a présence, dans les couches non-électrondenses, des cations K^+ et, à un moindre degré, Ca^{2+} (planche IV_{24}, figure 2 et planche IV_{26}, figure 1) et, dans certains cas, absence totale de matière organique. Il s'agit alors de silice amorphe avec possibilité de formation de silicates de potassium et de calcium (ligne 13 du tableau 59) qui peut, pour certaines observations, devenir très importante (ligne 16 du tableau 59 ; planche IV_{25}, figures 1 à 3). Dans des couches électrondenses (ligne 12 du tableau 59 ; planche IV_{24}, figure 5), la quantité de matière organique est prépondérante avec des traces de silice, de potassium et encore moins de calcium.

La distinction entre la constitution élémentaire des couches électrondenses et non-électrondenses n'est pas tranchée car, selon le point d'impact en analyse EDX, on détecte des secteurs de transition (planche IV_{24}, figures 3 et 4) avec une diminution progressive de silice. L'étude des composantes organiques de la concrétion fait l'objet du prochain paragraphe et des propositions seront alors faites en ce qui concerne les relations possibles entre la matière organique et les constituants minéraux.

- Par rapport à cette constitution élémentaire de référence chez les individus témoins ou contaminés mais, dans ce cas, sans changement notable des éléments (contamination par les poudres de plomb et de zinc à 25% dans l'aliment) des modifications ont été constatées en présence d'autres contaminations avec toujours addition d'éléments minéraux sans soustraction d'éléments déjà cités (matière organique, O, Si, K et Ca).

- Lors d'une contamination par les poussières d'aciérie en ajout dans le sol (25%) et dans l'aliment (25%), il y a présence de Mg en plus ou moins grande quantité selon la localisation de l'impact EDX :

  - ✓ Présence faible dans la couche périphérique en formation (ligne 20 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figure 2).

  - ✓ Présence presque permanente, parfois au même niveau que le potassium et le calcium, dans les couches non-électrondenses (ligne 22 du tableau 59 ; planche IV_{26}, présence en figures 3, 4, 5 et absence en figure 6).

  - ✓ Présence faible ou à l'état de traces dans les couches électrondenses (ligne 21 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figures 7 et 8).

  - ✓ On note également la présence des métaux (Zn et Fe), à l'état de traces, qui sont associés ou non dans les couches non-électrondenses (lignes 20 et 22 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figures 3, 4 et 6) ou en bordure de la concrétion pour Zn (ligne 20 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figure 2) mais jamais dans les couches électrondenses (ligne 22 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figures 7 et 8). La présence de S est notée conjointement à la présence de Zn (lignes 20 et 22 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figures 2, 5 et 6) ou de Fe et Zn (ligne 22 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figure 6).

  - ✓ Enfin, il a été noté la présence en traces de P lors de certains impacts dans les couches électrondenses (ligne 21 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figure 8).

- Lors de la contamination par ajout de poussières d'aciérie au sol (75%), la présence simultanée de Si et Al est notée lors de certains impacts (ligne 24 du tableau 59 ; planche IV_{27}, figures 2 et 3 à comparer avec la ligne 23 du tableau 59 ; planche IV_{27}, figure 1 ;). L'aluminium provient, dans ce cas et très vraisemblablement, de la composition à dominante argileuse du sol utilisé dans l'expérience ; son absence dans l'expérience avec contamination mixte du sol et de la nourriture avec 25% de poussières d'aciérie peut s'expliquer par une moindre prise du sol.

Planche IV_{24} : Microanalyse de la localisation des métaux dans le néphrocyte d'un escargot contaminé par l'ajout de poudre de plomb dans la nourriture (figures 1 à 13)

- ✓ La concrétion ne renferme pas de plomb (figure 1 à 5).
  La couche en formation, à la périphérie de la concrétion, est formée de matière organique (C, N et O), Si, Ca et K (figure 1).
  Un couche non-électrondense est presque exclusivement constituée de silice amorphe (Si et O) avec K et Ca (figure 2).
  Dans d'autres secteurs de la couche non-électrondense, la matière organique est présente (C, N et O) avec plus ou moins de Si, K et Ca (figures 3 et 4).
  Dans la couche électrondense, la matière organique domine (C, N et O) avec peu de Si, K et Ca (figure 5).

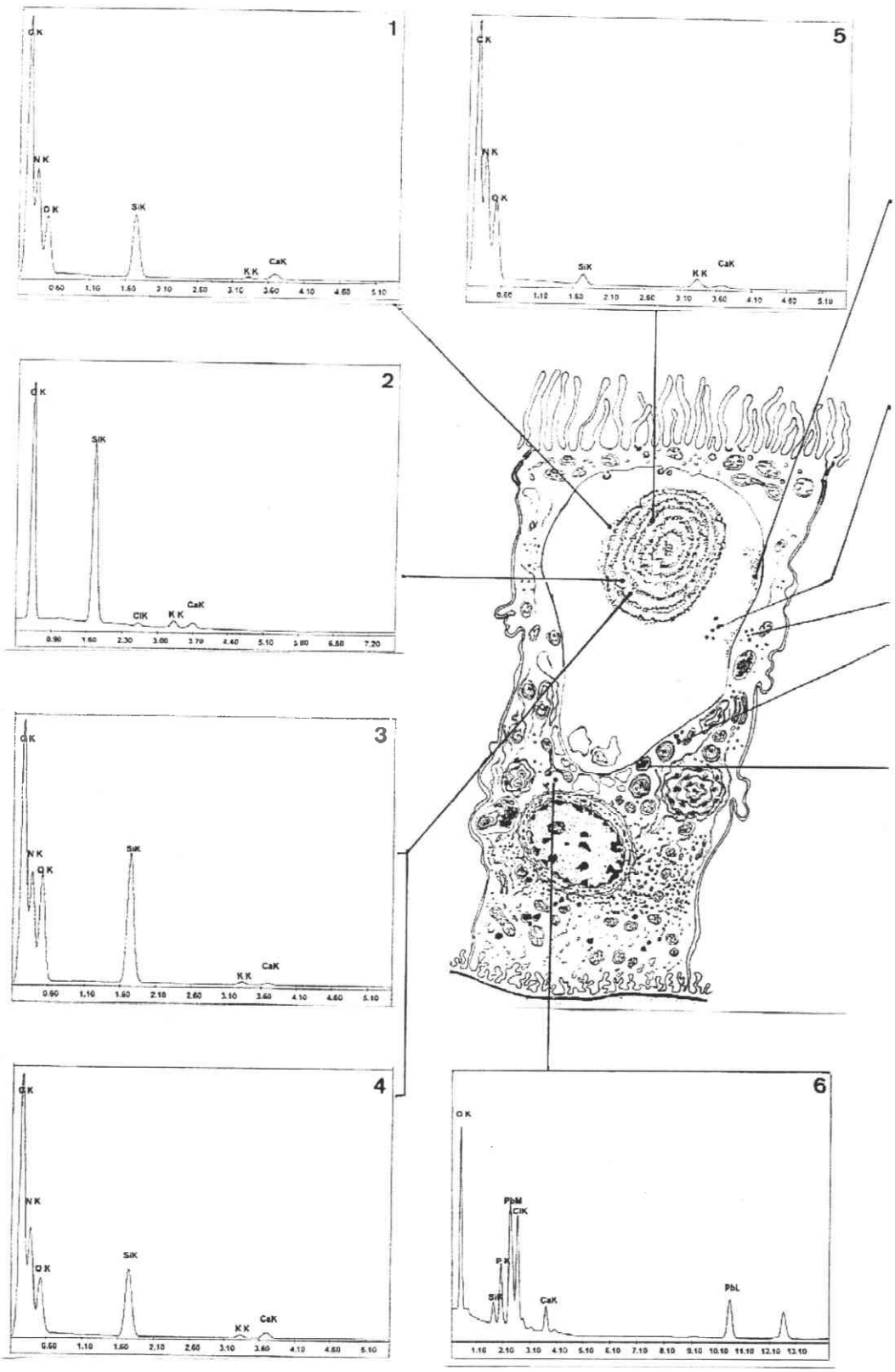
- ✓ Dans la vacuole apicale, certains grains électrondenses montrent la présence de plomb associé à Si et O (figure 7). En périphérie de la vacuole, un floculum contient Si, O et des traces de K et Ca (figure 8).

- ✓ Dans le cytoplasme la recherche de Pb et de Si est positive, d'une part dans certains grains cytoplasmiques électrondenses (figures 6 et 9 : présence de O, Pb, P, Si et Ca), d'autre part, dans certains phagolysosomes (figure 11 : présence de Pb, O et Si ; figure 12 : présence de C, O, Pb, Si et P). La présence de plomb a été vérifiée en analyse laser (figure 13) alors qu'il n'est pas détecté chez les témoins.

En conclusion, le plomb particulaire, absorbé par voie alimentaire, présente une voie d'élimination par le rein. Dans le néphrocyte, il est détecté dans des grains cytoplasmiques en association avec du phosphate de calcium (figures 6 et 9) et dans le système lysosomal (figures 11, 12 et 13). Son devenir est le passage sous forme de grains dans le liquide de la vacuole apicale (figure 7) sans incorporation à la concrétion. La libération dans la lumière rénale résulte de la lyse du néphrocyte. Certains phagolysosomes peuvent également expulsé leur contenu directement au pôle apical du néphrocyte.

Cette étude, orientée vers le devenir du plomb particulaire, permet également de suivre les différentes localisations et association de la silice. Dans le cytoplasme du néphrocyte, la silice est détectée dans les grains majoritairement constitués de phosphate de calcium (figures 6 et 9) contenant du plomb, mais aussi dans des grains riches en matière organique avec les éléments C, N, O, Si et P (figure 10). Elle est également détectée dans les corps résiduels des phagolysosomes (figures 11 et 12). Son élimination transite par le liquide vacuolaire soit dans des floculum contenant C, O, Si, K et Ca (figure 8), soit en association avec des grains chargés en plomb (figure 7). Sa précipitation finale (figures 1 à 5) se fait au contact de la concrétion en association avec des mucopolysaccharides acides et les protéines associées (coloration au bleu alcyan, cf. planche IV_{15}). A ce stade de précipitation de la silice, le plomb n'est pas associé aux composantes de la concrétion et suit une voie différente d'élimination.

Planche IV_{24}



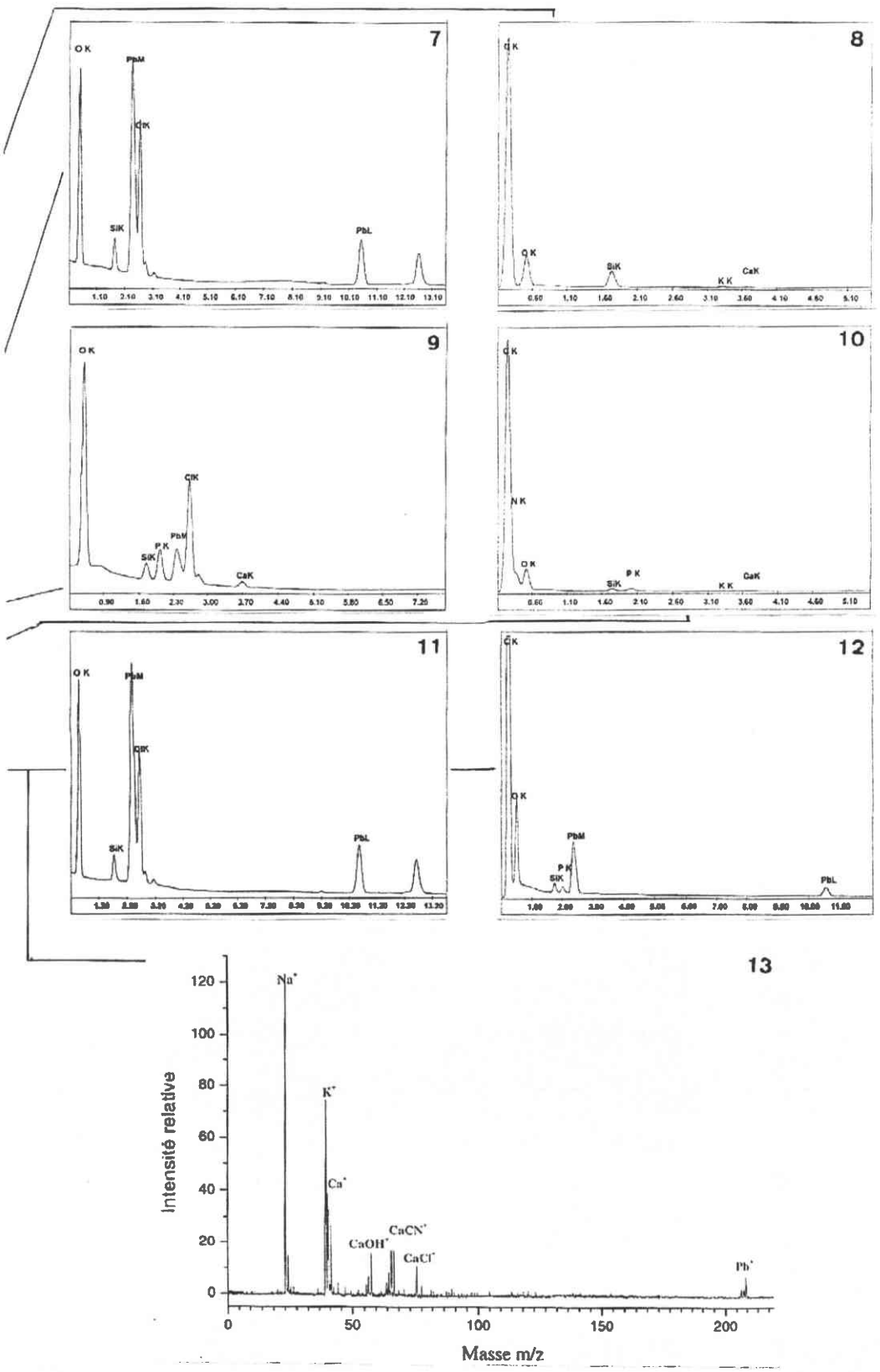
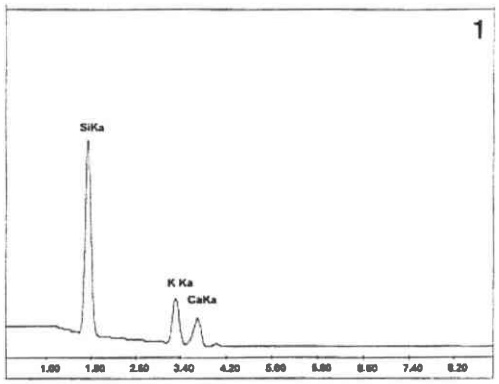

7
O K
PbM
Cl K
Si K
Pb L
8
C K
O K
Si K
K K
Ca K
9
O K
Cl K
Si K
P K
Pb M
Ca K
10
C K
N K
O K
P K
Si K
K K
Ca K
11
O K
PbM
Cl K
Si K
Pb L
12
C K
O K
PbM
P K
Si K
Pb L
13
Intensité relative
Masse m/z
Na+
K+
Ca+
CaOH+
CaCN+
CaCl+
Pb+

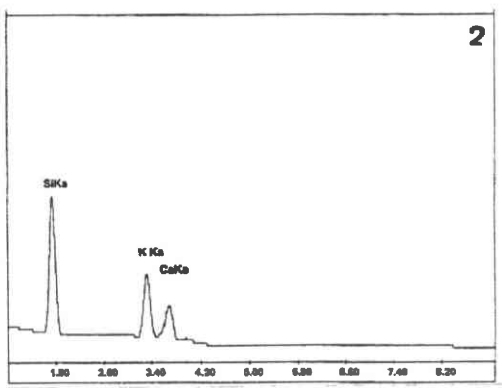
Planche IV_{25} : Microanalyse de la localisation des métaux dans le néphrocyte d'un escargot contaminé par l'ajout de poudre de zinc dans la nourriture (25% de zinc) après 4 semaines

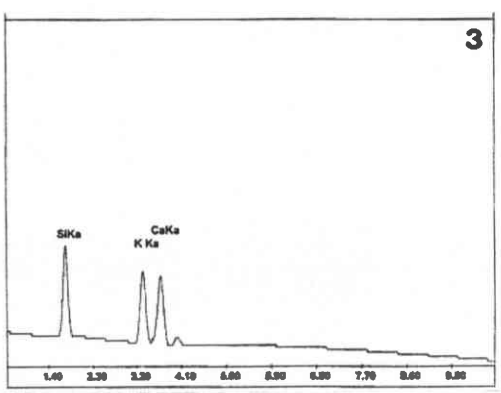
La concrétion du néphrocyte ne renferme pas de zinc, la présence de matière organique ne diffère pas des autres cas étudiés mais les teneurs en Si, K et Ca varient d'une nette dominance de Si par rapport à K et Ca (figure 1) a une dominance moindre (figure 2), enfin à une égalité (figure 3).

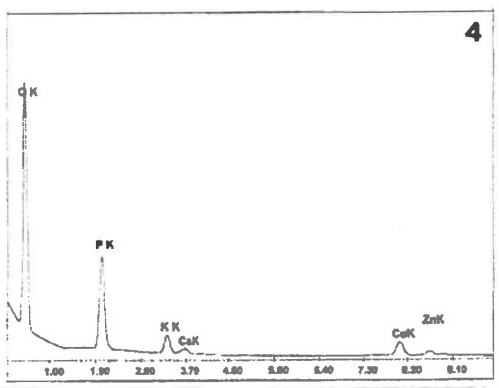
Dans le cytoplasme, au niveau de grains de polyphosphates, il y a détection de O, P, Cu, K, Zn et Ca (figure 4) et au niveau de structures interprétées comme principalement de l'hémocyanine O, K, Cu, P, Ca et Zn (figure 5).

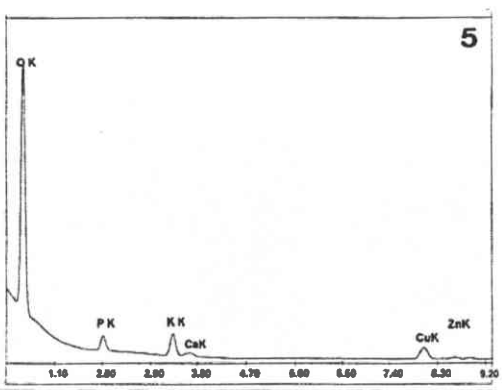
Planche IV$_{25}$











- Lors de la contamination du sol par 444 ppm de cadmium, celui-ci est détecté en trace et fréquemment (planche IV_{28}, figures 1, 2 et 3). Les cations associés à Si sont, dans tous les cas, K^+ et Ca^{2+} (lignes 25 à 27 du tableau 59) mais avec une prédominance de K^+ qui peut-être présent à un niveau égal à Si dans la couche en formation ou une couche électrondense (planche IV_{28}, figures 1 et 3) ou à un niveau nettement supérieur à Si dans une couche non-électrondense (ligne 27 du tableau 59 ; planche IV_{28}, figure 2) ce qui est le premier cas observé ayant cette caractéristique.

Dans certains cas, les éléments Mg et Al détectés dans la couche électrondense (ligne 26 du tableau 59 ; planche IV_{26}, figure 3) proviennent du kaolin entrant dans la composition du sol artificiel (tourbe + sable + kaolin) utilisé lors de cette expérience.

Discussion

La nature siliceuse de la concrétion représente une économie d'eau lors de l'excrétion ainsi qu'une économie de calcium et de phosphore formant les pyrophosphates de calcium décrits dans les concrétions des cellules à calcium de la glande digestive. L'animal mobilise ses réserves de pyrophosphates de calcium vers la constitution de la coquille et en excrète peu au niveau du rein. Par ailleurs, la silice puisée dans les constituants du sol est excrétée par la cellule rénale qui présente donc un métabolisme spécifique vis-à-vis de cet élément. Après l'étude des constituants organiques, la discussion sera élargie à l'ensemble des constituants de la concrétion et à une comparaison avec les connaissances sur la nature et les fonctions des concrétions chez les invertébrés.

III.4.2. Etude des composés organiques des concrétions rénales

Du fait de l'activité uricotélique des gastéropodes (avec présence d'urée signalée seulement par certains auteurs) nous avons établi par analyse EEL les valeurs des rapports C/N et N/O (planches IV_{29} à IV_{33}) de molécules de référence susceptibles de participer à la fraction organique des concrétions pour les comparer aux mêmes rapports des composés organiques de la concrétion.

Les produits de référence choisis sont la calmoduline, la guanine, l'acide urique et l'urée.

La calmoduline (P.M. = 17 kDa), dont le rôle a été évoqué dans la formation des concrétions de phosphate de calcium de la cellule à calcium de la glande digestive, est une protéine acide formée de 148 acides aminés avec 8 hélices α et 4 brins β. La calmoduline peut lier 4 Ca^{2+}. La région centrale est un domaine de liaison (LD) avec les protéines cibles. En effet, la calmoduline peut réguler l'activité de nombreuses enzymes. Il en est ainsi de la stimulation des protéines kinases (CaM-kinase II) et des phosphatases par le complexe Ca^{2+}/CaM qui change de conformation et permet la liaison avec la protéine cible qui d'inactive devient active. La phosphorylation sur les résidus sérine et thréonine diminue l'affinité pour la protéine kinase alors que la phosphorylation de la tyrosine n'altère pas l'affinité. La séquence des acides aminés de la calmoduline CaM_1 est connue chez *Aplysia californica* (gastéropode marin) (Karabinos et Battacharya, 2000). Cette calmoduline est identique à celle de *Drosophila* (insecte), de *Halocynthia* (tunicier) et de *Branchiostoma* (procordé). Swanson *et al.* (1990) ont décrit la structure et l'expression du gène responsable.

Planche IV_{26} : Microanalyse de la localisation des métaux dans le néphrocyte d'un escargot contaminé par l'ajout de poussières d'électrofiltres d'aciérie dans la nourriture (25%) et le sol (25%)

- ✓ La figure 1 visualise les éléments présents chez un individu témoin O, Si (silice amorphe SiO_2), K et Ca. Cl est un constituant de la résine.

- ✓ La concrétion ne renferme pas de plomb (figures 2 à 6)

- ✓ La couche en formation, à la périphérie, est formée de matière organique (C, N et O) et Si, K, Mg et Ca avec des traces de S (figure 2) et de Zn (non représenté sur le spectre).

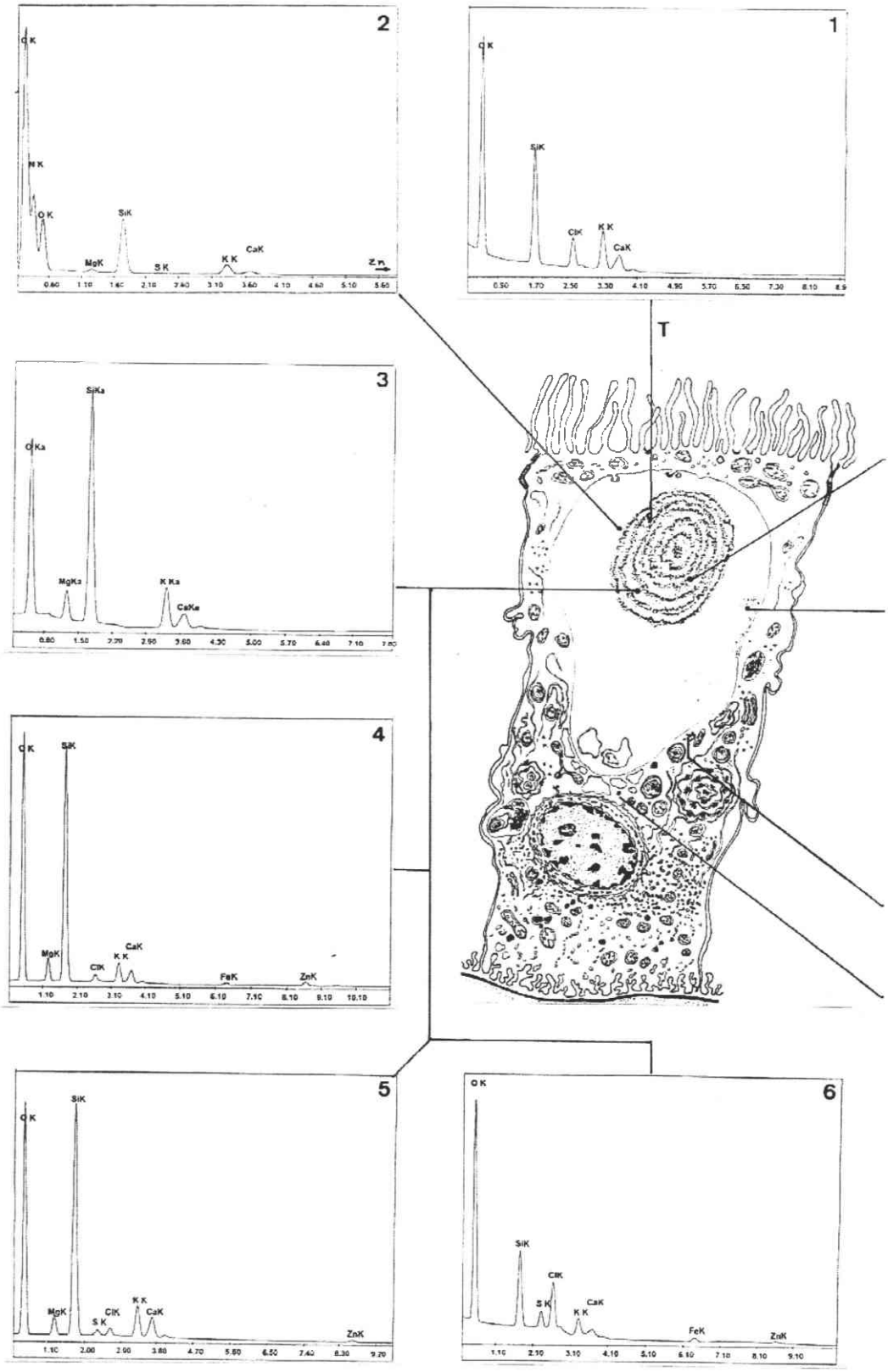
- ✓ La couche non électrondense est presque exclusivement constituée de silice amorphe (Si et O) avec K, Mg et Ca (figure 3) et pour certains spectres, présence simultanée de Fe et Zn (figures 4 et 6), ou de seulement de Zn (figure 5).
  La présence de S (figures 5 et 6) n'a pas été détectée chez les témoins (figure 1) ni celle de Fe, Zn et Mg. La formation de sulfates peut-être envisagée.

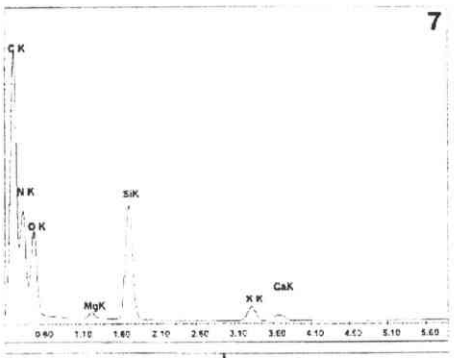
- ✓ Les couches électrondenses fournissent des spectres se rapprochant de ceux obtenus en périphérie de la concrétion avec présence de matière organique (C, N et O) et Si, K, Mg et Ca. La quantité de Si diminue lorsque le faisceau est bien focalisé sur les secteurs électrondenses (figures 7 et 8).

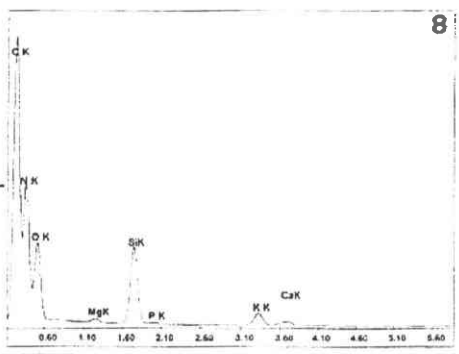
- ✓ Dans le liquide de la vacuole apicale, on peut détecter des précipités riches en carbone et oxygène avec des traces de Si, Mg et S (figure 9).

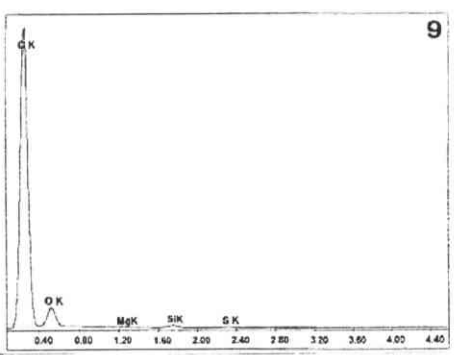
- ✓ Dans le cytoplasme, certaines vésicules sont riches en matière organique, O, Si et peu S (figure 10) et des grains de phosphates de calcium et de magnésium (O, P, Ca et Mg) sont associés à Si, Zn (figure 11).
  Du plomb est détecté rarement et très faiblement à l'état de trace dans les mêmes structures cellulaires que celles décrites dans le cas de contamination par la poudre de plomb dans la nourriture (planche IV_{24}).

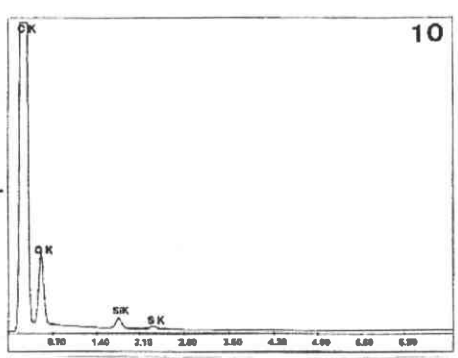
Planche IV$_{26}$




7
C K
N K
O K
Si K
Mg K
K K
Ca K


8
C K
N K
O K
Si K
Mg K
P K
K K
Ca K


9
C K
O K
Mg K
Si K
S K


10
C K
O K
Si K
S K

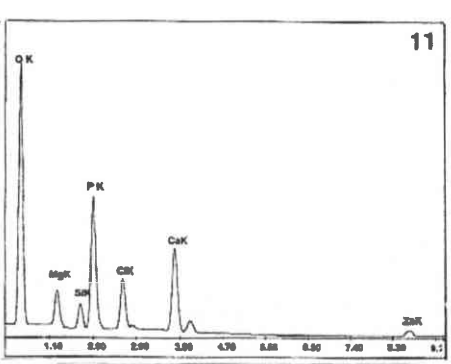
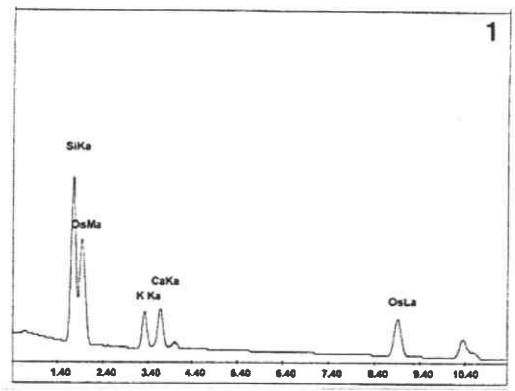
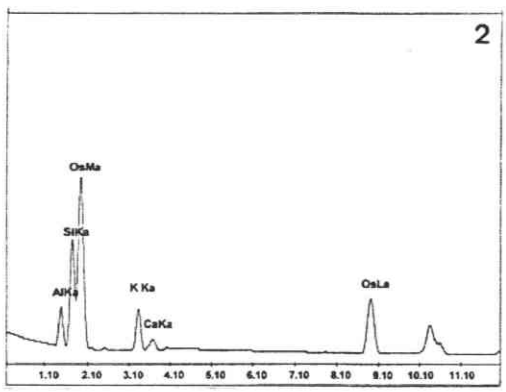

11
O K
P K
Mg K
Si K
Ca K
Zn K

Planche IV_{27} : Composition des concrétions rénales en présence de sol contenant 75% de cendres d'aciérie (nourriture Helixal® 2ème âge)

Les spectres EDX révèlent deux types de composition élémentaire, l'un avec (O), Si, K et Ca (figure 1), l'autre avec (O), Si, Al, K et Ca (figures 2 et 3). D'autres métaux autres que l'aluminium, tels que le fer et le zinc ou le plomb, ne sont pas détectés. La présence de Al s'explique par l'utilisation d'un sol naturel désigné So, riche en argiles.





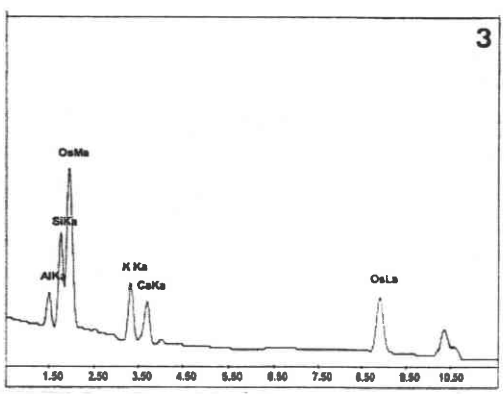


Planche IV_{28} : Composition élémentaire des concrétions rénales après intoxication par un sel de cadmium additionné dans un sol artificiel

Après contamination du sol par une solution contenant 444 ppm de cadmium, les spectres EDX révèlent trois type de composition élémentaire en plus de la matière organique, le premier avec (O), Si, K, Ca et Cd dans la couche en formation (figure 1), le deuxième avec, dans la couche non électrondense, (O), K, Si, Ca, Cd ; K étant plus abondant que Si (figure 2), la troisième avec (O), Si, K, Mg, Ca, Al et Cd dans une couche électrondense (figure 3).

Il y a donc une faible incorporation du cadmium aux concrétions (3 à 7% de la masse atomique totale des éléments). La présence d'aluminium s'explique par la présence de kaolin dans la composition du sol artificiel.

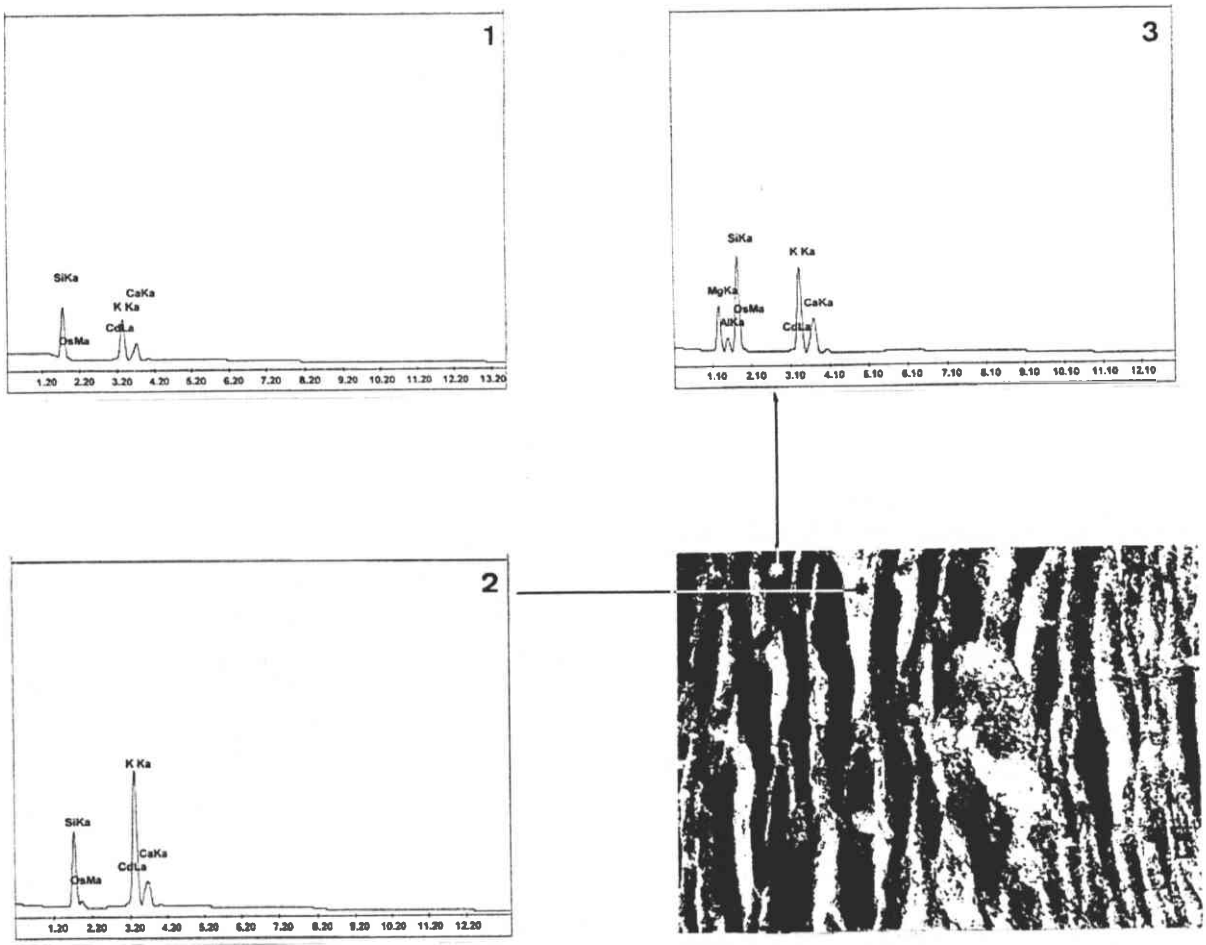


Planche IV_{29}

1. **Spectre EEL de la guanine :**

   - A : C/N = 1,02
   - B : N/O = 6,5

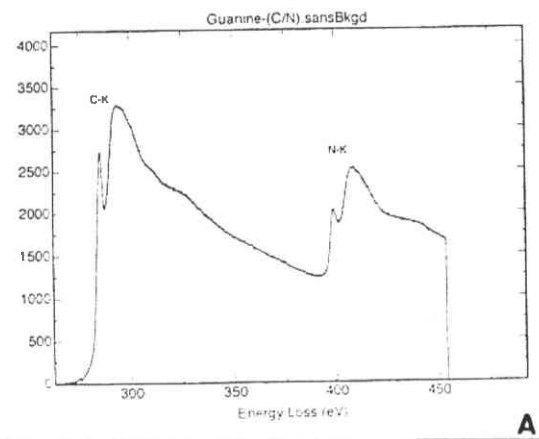
2. **Spectre EEL de l'acide urique :**

   - A : C/N = 1,10
   - B : N/O = 2,00

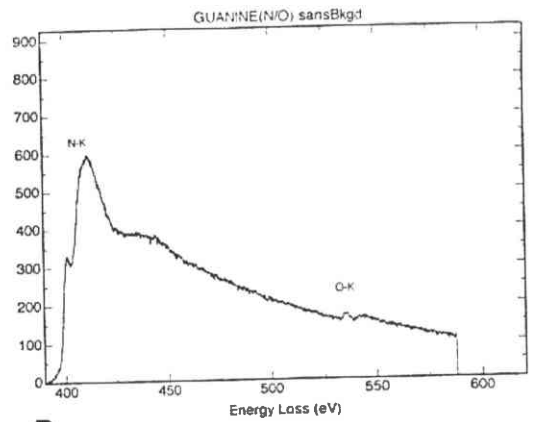
3. **Spectre EEL de l'urée**

   - A : C/N = 0,74
   - B : N/O = 4,98

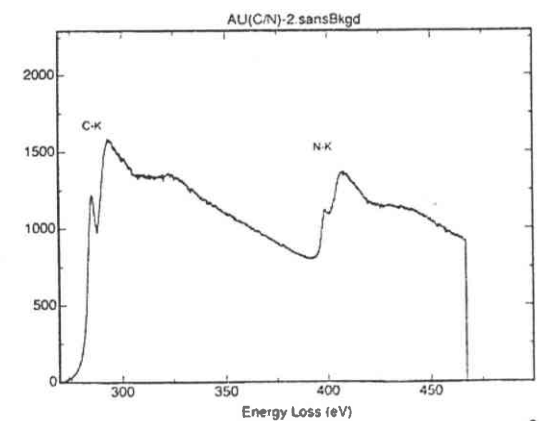
Planche IV_{29}



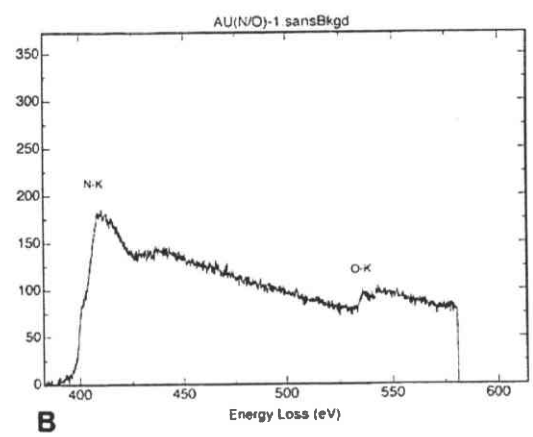
A 1



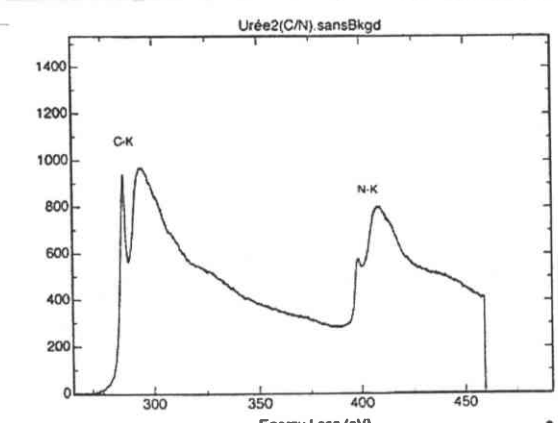
B



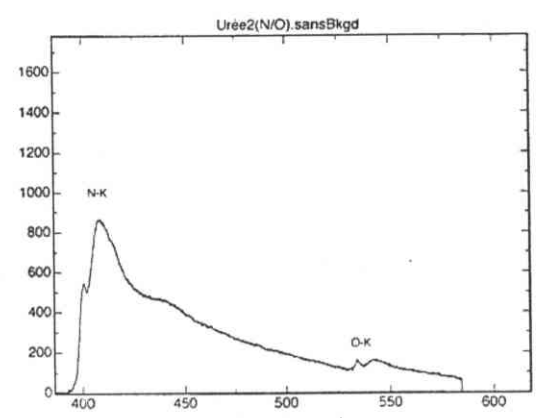
A 2



B



A 3



B

Planche IV_{30}

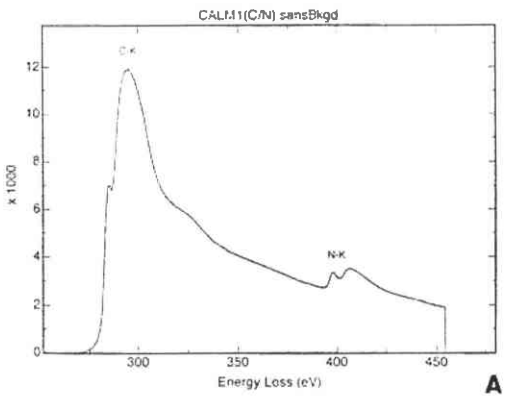
4. 5 et 6 : spectres EEL de la calmoduline

- 4 A : C/N = 4,42 ; B : N/O = 5,52
- 5 A : C/N = 3,75 ; B : N/O = 5,28
- 6 A : C/N = 4,52 ; B : N/O = 5,58

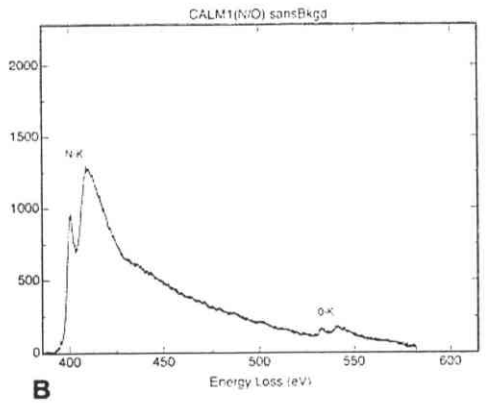
moyenne C/N = 4,23 et N/O = 5,46

7 Spectre EDX de la calmoduline avec détection du soufre (acides aminés soufrés)

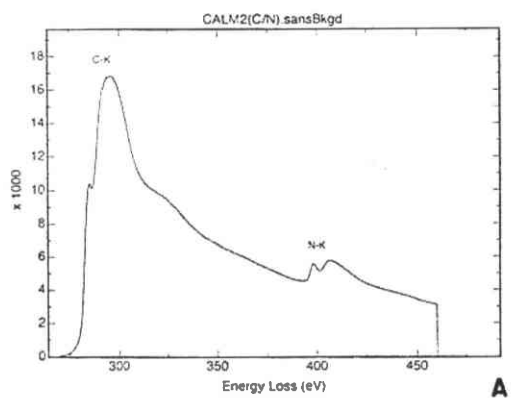
Planche IV$_{30}$



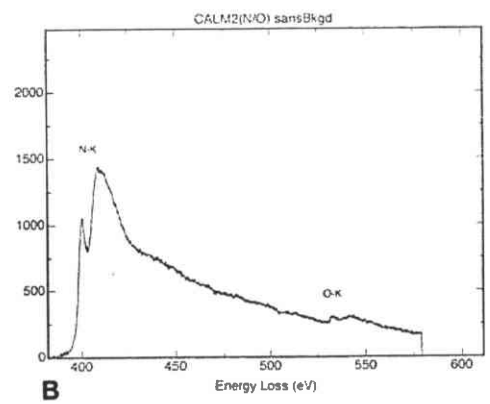
A 4



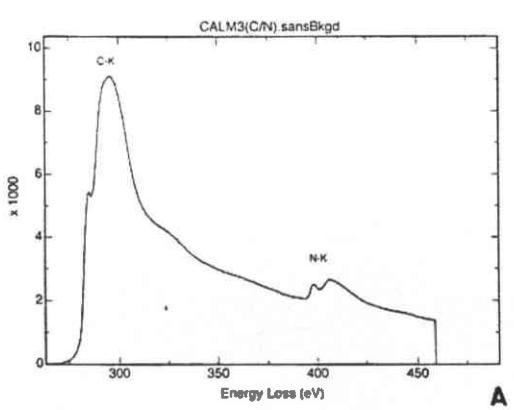
B



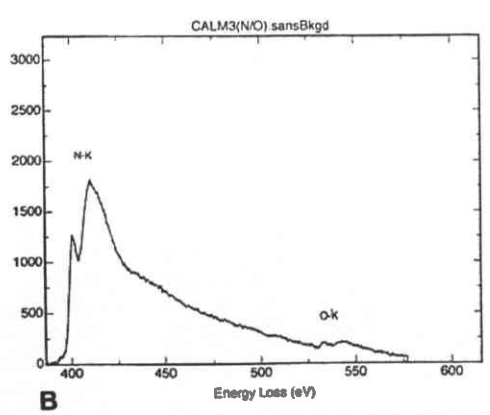
A 5



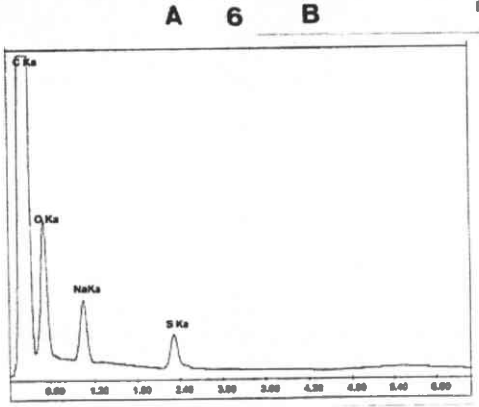
B



A 6



B



7

Planche IV_{31} : Spectres EEL d'une concrétion rénale de *Helix aspersa aspersa* témoin d'élevage. Figure N : schéma d'un néphrocyte et localisation des spectres EEL correspondant aux figures 8, 9 et 10

8 Couche non-électrondense. Spectres à comparer avec les spectres 1A et 1B de la planche IV_{29}. Présence de guanine :

- A : C/N = 1,13 et présence de calcium
- B : N/O = 3,60
- C : richesse en silice (SiO_2)

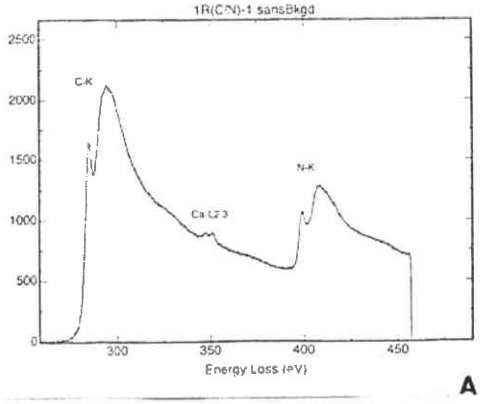
9 Couche électrondense :

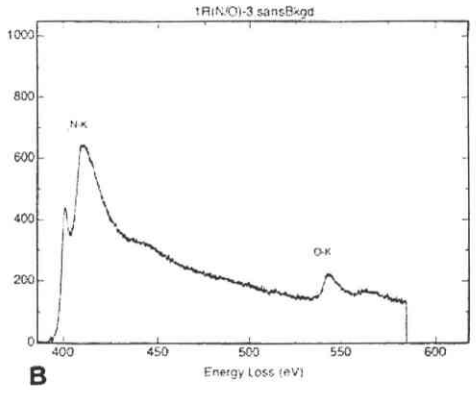
- A : C/N = 1,41 et présence de calcium
- B : N/O = 11
  Par rapport au spectre 8C présence de très peu de silice et prédominance de matière organique. Spectres à comparer avec les spectres 1A et 1B de la planche IV_{29}. **Présence de guanine.**

10 Autre secteur de couche électrondense. Spectres à comparer avec les spectres 1A et 1B de la planche IV_{29}. Présence de guanine :

- A : C/N = 1,19
- B : N/O = 6,84

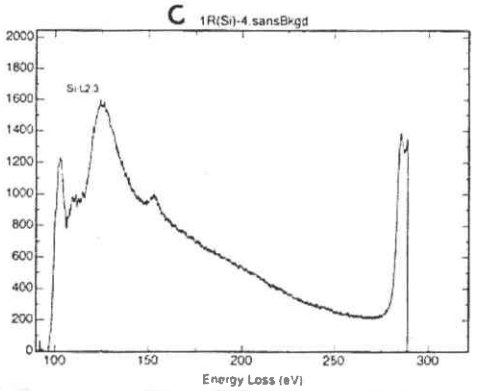
Planche IV_{31}

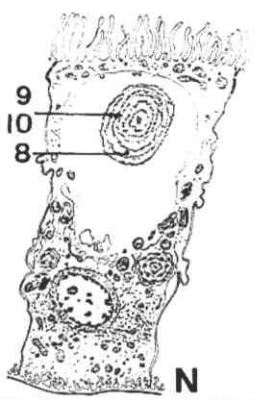


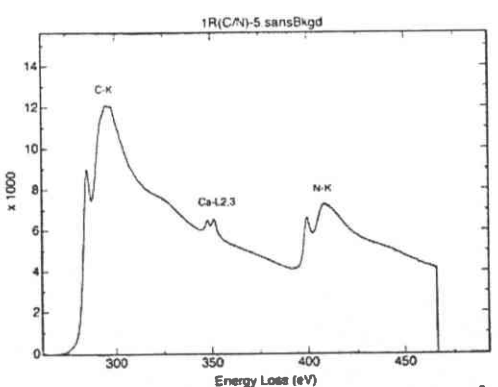


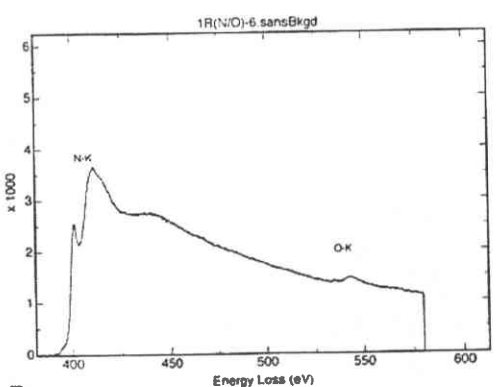
A 8 B

C

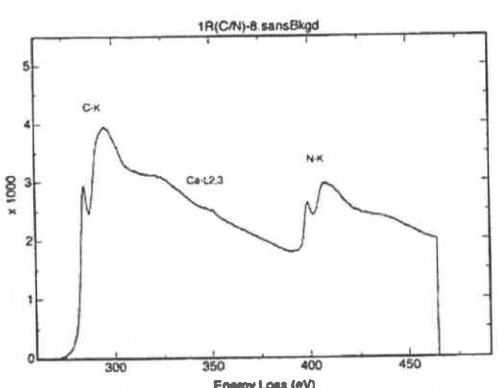


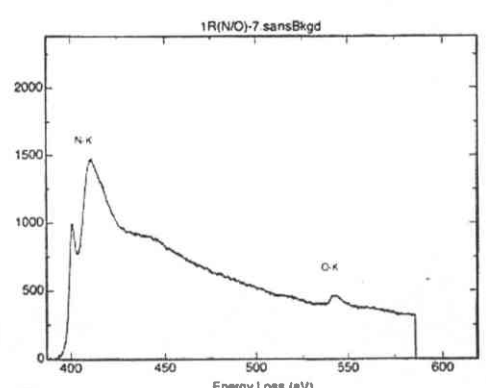






A 9 B





A 10 B

Planche IV_{32}

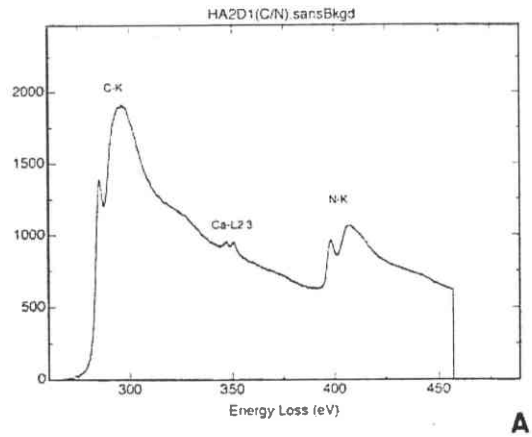
11 Spectre EEL d'une couche non-électrondense d'une concrétion de *Helix aspersa aspersa* en présence d'une nourriture contaminée au plomb (25% dans la nourriture). A comparer avec les spectres 1A et 1B de la planche IV_{29}. Présence de guanine :

- A : C/N = 1,49
- B : N/O = 6,75

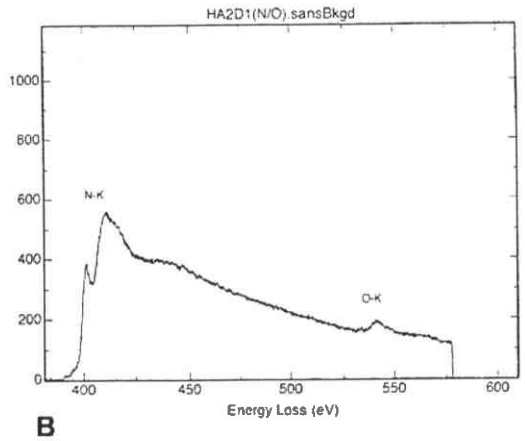
12 et 13 Spectre EEL d'une couche électrondense d'une concrétion de *Helix pomatia* :

- 12 A : C/N = 3,00 et B : N/O = 3,88
  Spectres à comparer avec les spectres 4A et 4B de la planche IV_{30}. Présence de calmoduline.
- 13 A : C/N = 1,53 et B : N/O = 13
  Spectres à comparer avec les spectres 1A et 1B de la planche IV_{29}. Présence de guanine.

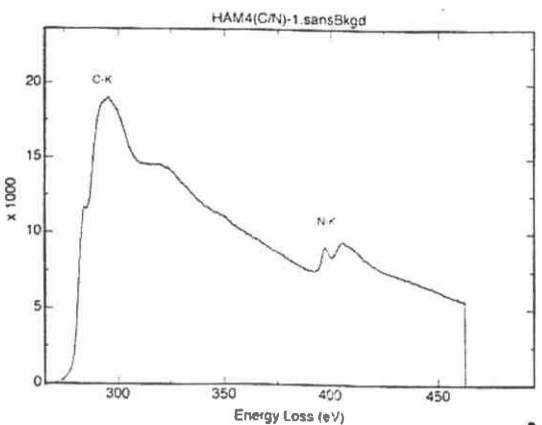
Planche IV$_{32}$



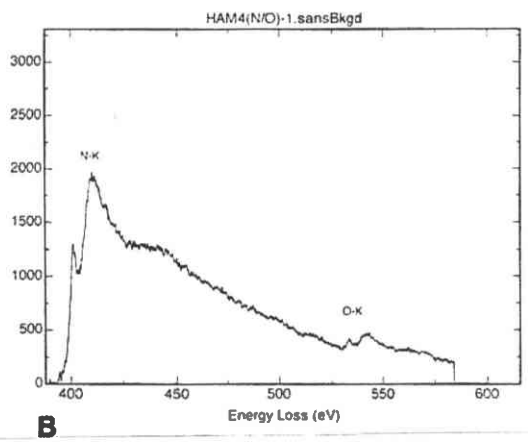
A 11



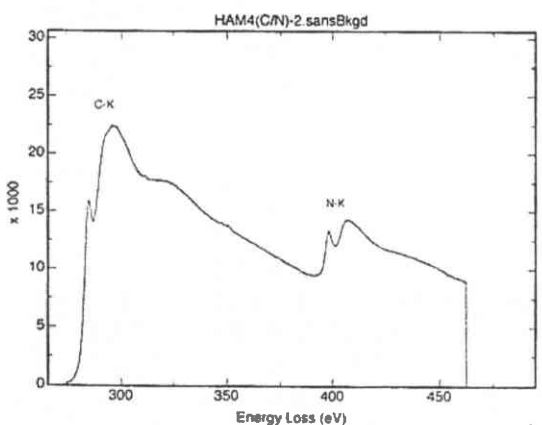
B



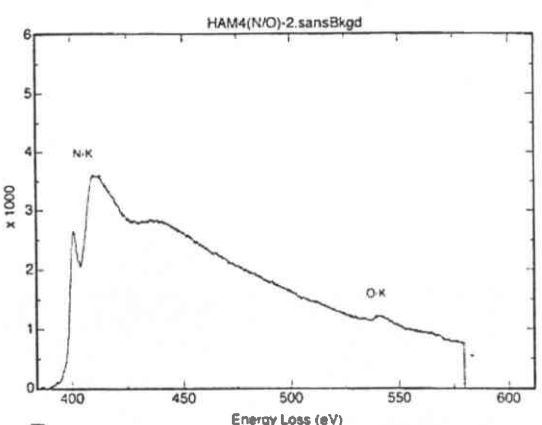
A 12



B



A 13



B

La guanine ($C_5H_5N_5O$), base purique (tableau 60), présente un rapport théorique C/N de 1 et un rapport théorique N/O de 5. L'acide urique ($C_5H_4N_4O_3$), présente un rapport théorique C/N de 1,25 et un rapport théorique N/O de 1,33. L'urée (CH_4N_2O ; tableau 60) présente un rapport théorique C/N de 0,5 et un rapport théorique N/O de 2,00 (tableau 60).

Dans les conditions d'analyse (*Cf.* 2ème partie), les valeurs obtenues (tableau 60 et planche IV_{29}, figure 1 : guanine ; figure 2 : acide urique ; figure 3 : urée) à partir des étalons, sont légèrement différentes des valeurs théoriques car l'oxygène migre rapidement ce qui augmente le rapport N/O. Ceci est particulièrement net pour l'urée avec un doublement du rapport.

La calmoduline analysée (phospho-diestérase de cerveau de bovin ; 3'5' cyclic nucléotide activator de chez Sigma) présente un rapport C/N moyen de 4,23 et un rapport N/O moyen de 5,46 (planche IV_{30}, figures 4 à 6). Enfin, pour les mucopolysaccharides dont la co-présence a été mise en évidence en histologie, on peut estimer le rapport théorique C/N à 12 et le rapport théorique N/O à 0,09, ceci d'après la composition moyenne connue.

En ce qui concerne la calmoduline, la migration de l'oxygène doit être également très rapide puisque la moyenne N/O des 20 acides aminés connus est de 0,65 variant de 0,25 pour les acides aspartique et glutamique à 2 pour l'arginine et l'histidine. Selon la composition en acides aminés de la calmoduline prise pour référence, la moyenne obtenue de 5,46 est au moins 2,5 fois supérieure à la valeur attendue.

La présence d'acides aminés soufrés, constitutifs de la calmoduline, est vérifiée en EDX (planche IV_{30}, figure 7). Dans la suite de ce chapitre, c'est donc la valeur du rapport C/N qui sera d'abord pris en considération puis, avec précaution, la valeur du rapport N/O même si, au moment de l'analyse, le temps d'exposition a été réduit au minimum. Il faut, par ailleurs, tenir compte des artéfacts liés à la fixation du tissu puis son inclusion dans la résine (apport de carbone augmentant le rapport C/N) et à l'environnement chimique de la structure étudiée, par exemple la présence de matière organique incluse dans de la silice amorphe.

L'analyse de la composante organique des concrétions rénales de *Helix aspersa aspersa* met en évidence (planche IV_{31}, figures 8 à 10 et planche IV_{32}, figure 11) dans les couches non-électrondenses, riches en silice amorphe (SiO_2) (planche IV_{31}, figure 8C) avec du potassium et peu de calcium (analyse EEL, figure 87), des valeurs C/N de 1,13 et N/O de 3,60 (planche IV_{31}, figure 8A et 8B) compatibles, avec celles obtenues pour la guanine (C/N = 1,02 et N/O = 6,50), mais non compatibles avec celles de l'acide urique, de l'urée ou de la calmoduline. On peut émettre l'hypothèse d'une co-précipitation de la silice (dominante) avec de la guanine. L'hypothèse de la présence de l'allantoïne (rapports théoriques C/N de 1 et N/O de 1,33) peut être formulée compte tenu de l'existence, dans les péroxysomes, d'un cristalloïde normalement formé d'urate-oxydases ou uricases.

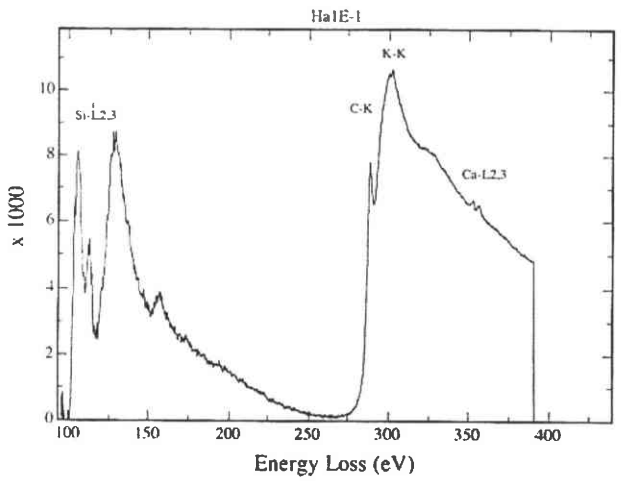


Figure 87 : Spectre EEL au niveau d'une couche non-électrondense de la concrétion

Dans les couches électrondenses, les spectres se différencient principalement par le rapport N/O variant de 6,84 à 11, ce qui milite pour une hétérogénéité de la matrice organique. Une caractéristique commune est l'absence ou la faible présence de silice amorphe. Les spectres sont compatibles avec celui de la guanine (planche IV_{31}, figures 9A et B et figures 10A et B) et il en est de même chez les individus contaminés par 25% de poudre de plomb dans la nourriture (planche IV_{32}, figures 11A et B). Du calcium est également détecté.

La présence d'une calmoduline a été recherchée dans la concrétion de *Helix aspersa aspersa* mais aucun des spectres obtenus n'est compatible avec la référence.

Par contre, une étude comparative des concrétions de *Helix pomatia* met en évidence, dans les couches électrondenses, la présence de matière organique dont le spectre peut être interprété par la présence dominante de calmoduline (planche IV_{32}, figures 12A et B) associée à de la guanine également détectée (planche IV_{32}, figures 13A et B).

Il existe donc des différences interspécifiques. Quelque soit l'espèce étudiée, l'urée n'a jamais été identifiée dans la concrétion mais elle peut être présente à l'état solubilisé dans le liquide vacuolaire.

Par ailleurs, la coloration au bleu alcyan a montré la présence de mucopolysaccharides acides au centre des concrétions et dans les couches se révélant par la suite électrondenses compte tenu de leur osmiophilie. Ces mucopolysaccharides sont formés d'un enchaînement ayant pour base l'association d'un acétylglucosamine sulfaté ou non (hexose amine) et d'un acide glycuronique. La formule globale de l'enchaînement de base est $C_{14}H_{21}O_{11}N$ avec un rapport C/N de 12 et un rapport N/O de 0,09. Ces rapports sont très différents des rapports obtenus du fait de la nature des protéines liées aux muco-polysaccharides.

Tableau 60 : Valeurs des rapports C/N et N/O des substances de référence (guanine, acide urique, urée, calmoduline, mucopolysaccharides) et de la matière organique des concrétions rénales de *Helix aspersa aspersa* et *Helix pomatia*. Les valeurs théoriques sont calculées d'après la formule globale lorsqu'elle est connue. Les valeurs obtenues sont celles calculées à partir des spectres EEL. (Voir planche IV_{29} à IV_{32})

	C/N		N/O		Si	Ca	K	Mg	Observations
	Théorique	*Obtenue*	*Théorique*	*Obtenue*					
Guanine ($C_5H_5N_5O$)	1,00	1,02	5,00	6,50					Migration rapide de O
Acide urique ($C_5H_4N_4O_3$)	1,25	1,10	1,33	2,00					Migration rapide de O
Urée ($CO(NH_2)_2$)	0,50	0,74	2,00	4,98					Migration rapide de O
Calmoduline		4,42		5,52					
		3,75		5,28					
		4,52		5,58					
Moyenne		4,23		5,46					
Mucopolysaccharides ($(C_{12}H_{21}O_{11}N)_n$	12		0,09						
Concrétions rénales									
Helix aspersa aspersa									Interprétation
Couche non-électrondense		1,13		3,60	+++	+	+	+	Guanine
Couche électrondense (témoin)		1,41		11,00	o/+	++	+	+	Guanine
		1,19		6,84	o/+	Traces	+	+	Guanine
Couche électrondense (Pb 25% dans l'aliment)		1,49		6,75	+	+			Guanine
Helix pomatia									
Couche électrondense		3,00		3,88	+	Traces			Calmoduline
Couche électrondense		1,53		13	+	Traces			Guanine

III.5. Conclusion et discussion sur la nature et le rôle des concrétions

III.5.1. Concrétions des néphrocytes de *Helix aspersa aspersa*

La synthèse des observations histologiques, des analyses EDX et EEL permet de proposer (figure 89) pour la constitution des concrétions rénales d'une part, pour les couches non électrondenses, une fraction minérale riche en silice amorphe (SiO_2) plus ou moins hydratée, associée à une fraction organique riche en guanine et d'autre part pour les couches électrondenses peu ou pas de fraction minérale siliceuse mais présence abondante de mucopolysaccharides acides dont certains sulfatés, associés à des bases puriques telle que la guanine. Selon les cas, des éléments métalliques sont détectés.

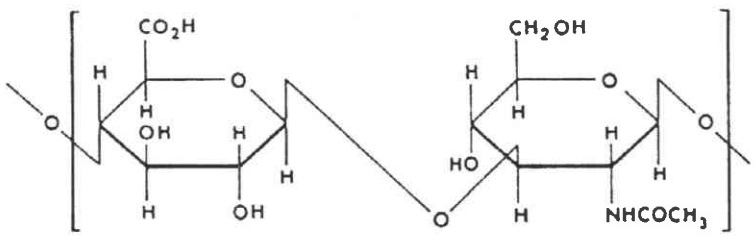


Figure 88 : Formule d'un mucopolysaccharide

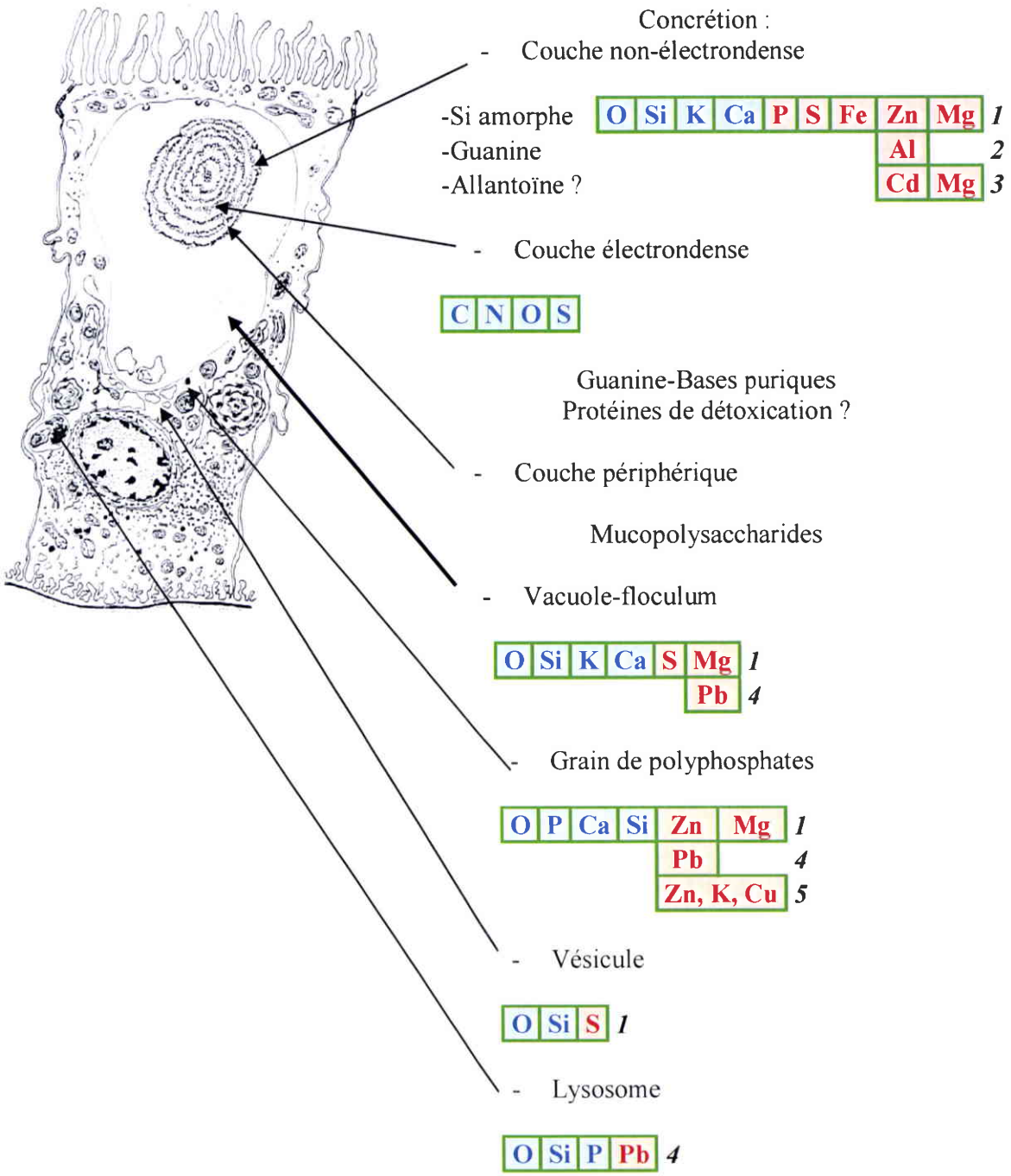


Figure 89 : Bilan de l'étude des constituants du néphrocyte : 13 éléments (O, Si, K, Ca, Mg, P, S, Fe, Zn, Cd, Al, Pb, Ca) ainsi que des substances organiques : guanine et muco-polysaccharides.
Légendes : Eléments sur fond bleu : éléments permanents ; éléments sur fond jaune : éléments présents lors de certaines conditions expérimentales. *1* : Poussières d'aciérie ; *2* : Sol naturel ou artificiel ; *3* : Sel de cadmium ; *4* : Poudre de plomb ; *5* : Poudre de zinc.

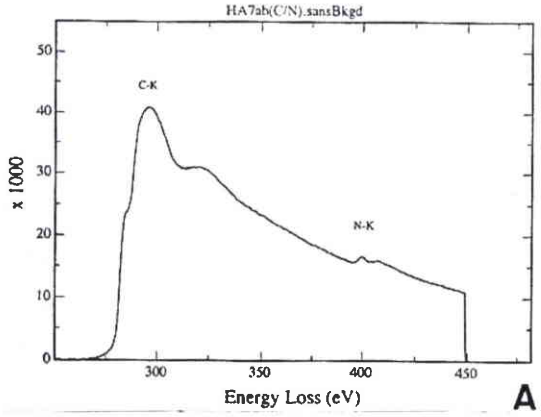
Planche IV_{33} : Microanalyse d'une concrétion d'escargot contaminé par ajout de poussières d'aciérie dans le sol (25%) et l'aliment (25%)

1 à 3 Microanalyse EEL

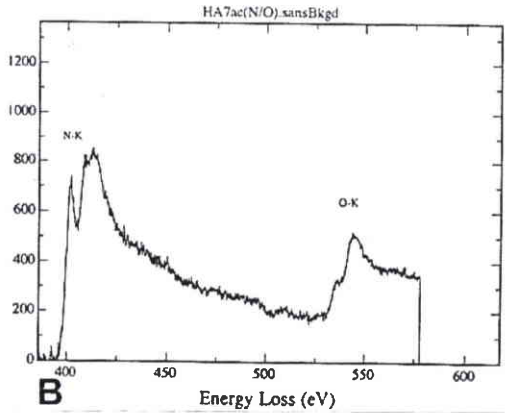
- 1 : concrétion en début de formation A : C/N, B : N/O
- 2 : couche non-électrondense A : C/N, B : N/O
- 3 : couche électrondense A : C/N, B : N/O

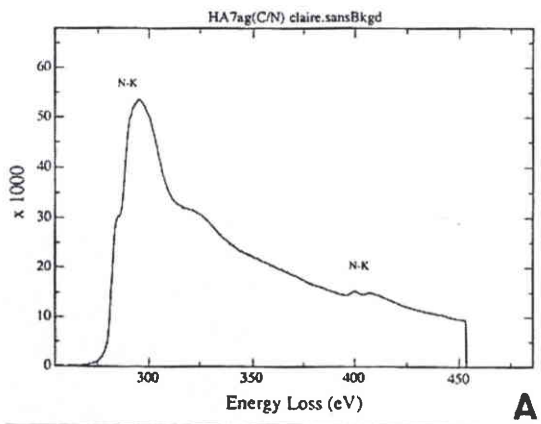
4 Microanalyse EDX : présence simultanée de Si et Al

Planche IV$_{33}$

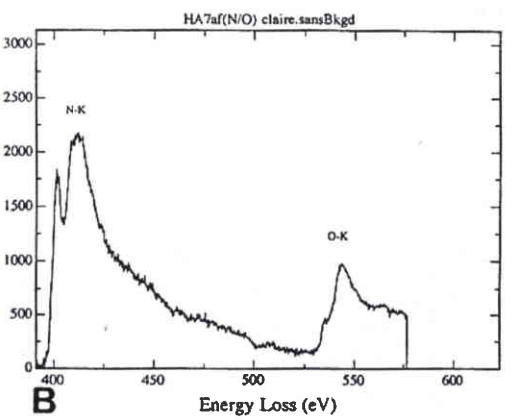


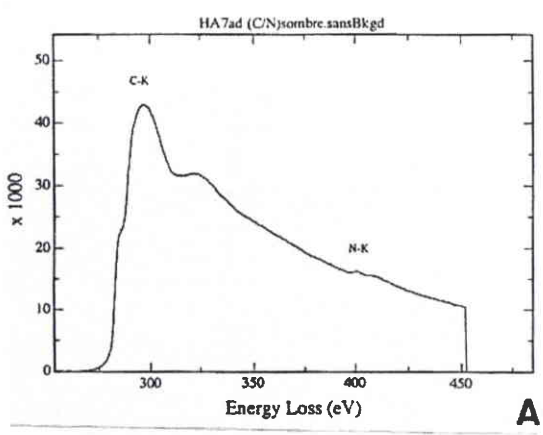
1



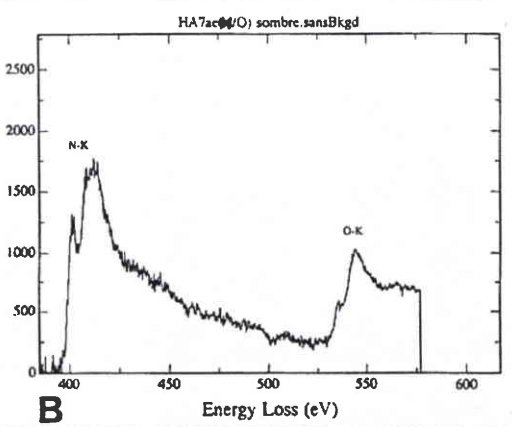


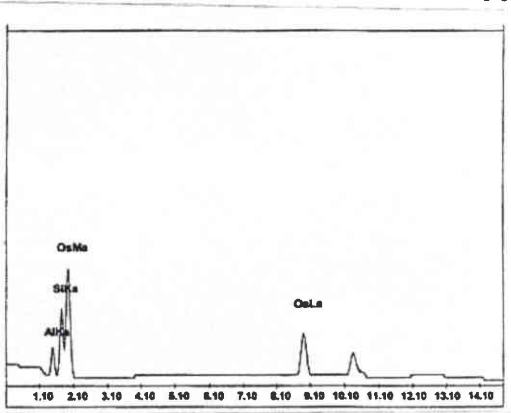
2



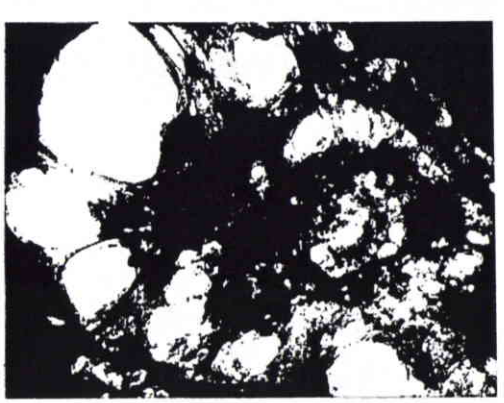


3





4



En présence d'un sol naturel argileux ou d'un sol artificiel enrichi en kaolin, les éléments silice et aluminium sont associés avec, dans ce cas, soit absence de calcium et de potassium (planche IV_{33}) soit présence de calcium (planche IV_{34}).

La présence éventuelle de calmoduline a été recherchée sans succès chez *Helix aspersa aspersa* alors qu'elle est présente dans la concrétion de *Helix pomatia*. La présence de calmoduline est évoquée dans la constitution des concrétions de phosphate de calcium de la glande digestive. La différence de constitution minérale entre les concrétions rénales (silice amorphe dominante) et les concrétions de la cellule à calcium de la glande digestive (pyrophosphates de calcium dominants) explique très vraisemblablement la participation de protéines différentes selon la fonction de la cellule (stockage du calcium dans la glande digestive ou excrétion rénale de la silice et des produits du métabolisme azoté par le rein) avec, selon l'exposition à tel ou tel métal, l'hypothèse d'une éventuelle participation des métalloprotéines dans la constitution de la fraction organique de la concrétion. La recherche de métallothionéines lors de la contamination par le cadmium pourrait être envisagée chez *Helix pomatia* dont on connaît 59 des 66 acides aminés constitutifs de la molécule d'une métallothionéine ; le rapport théorique approché étant de 2,9 pour C/N et de 0,54 pour N/O. Il y a fixation de 6 molécules de cadmium par molécule de métallothionéine. Il convient donc de rechercher la nature exacte des substances organiques protéiques associées d'une part, éventuellement, au métabolisme de la silice et, d'autre part, en cas de contamination, au transport et à la détoxication de certains métaux.

En perspective d'une recherche ultérieure sur d'éventuelles modifications des composés organiques intégrés à la concrétion nous avons pu effectuer des analyses EEL des concrétions provenant d'individus de l'espèce *Helix aspersa aspersa* contaminés en présence de poussières d'aciérie par ajout dans le sol (25%) et la nourriture (25%).

En ce qui concerne la fraction minérale de la concrétion rappelons que la silice et l'aluminium sont détectés simultanément par contre le potassium et le calcium ainsi que des métaux ne sont pas détectés (planche IV_{33}, figure 4A et 4B ; photographie d'une région centrale d'une concrétion en formation).

En spectre EEL l'absence de calcium est vérifiée (Planche IV_{33}., figures 1A, 2A et 3A). Par ailleurs, malgré une perte sur l'ordinateur des données des spectres ne permettant pas le calcul des rapports C/N et N/O, les éditions des spectres réalisées lors de l'observation (planche IV_{33}, figures 1, 2, 3 A et B) montrent des rapports C/N et N/O très différents de tous les spectres précédemment décrits chez *Helix aspersa aspersa* témoin (à comparer avec la planche IV_{31}, figures 8, 9 et 10). Par contre, la microanalyse EEL d'une concrétion d'*Helix aspersa aspersa* contaminé par ajout de sel de cadmium au sol (444 ppm), met en évidence une similitude très proche avec les spectres de la guanine (comparer planche IV_{34}, figures 1 et 2A et B avec planche X_{31}, figures 9A et B). Il semble donc intéressant de poursuivre les études, car il apparaît que les produits finaux du métabolisme lié à l'excrétion pourraient changer de nature en fonction du type de contamination.

Les concrétions organo-minérales du néphrocyte au stade final ne se lient pas indifféremment à tous les cations bivalents. Comme il a été démontré, le plomb n'est jamais incorporé à la concrétion et demeure soit lié au système lysosomal jusqu'à l'expulsion des corps résiduels vers la lumière rénale soit à l'état de petits granules très dispersés dans la vacuole apicale du néphrocyte avec une localisation péri-concrétionnaire.

Des grains électrondenses du cytoplasme du néphrocyte et des phagolysosomes contiennent simultanément du phosphate de calcium et de la silice amorphe, du plomb et du zinc. La vacuole présente des floculum de silice amorphe associée à du potassium ou à du calcium, plus de la matière organique.

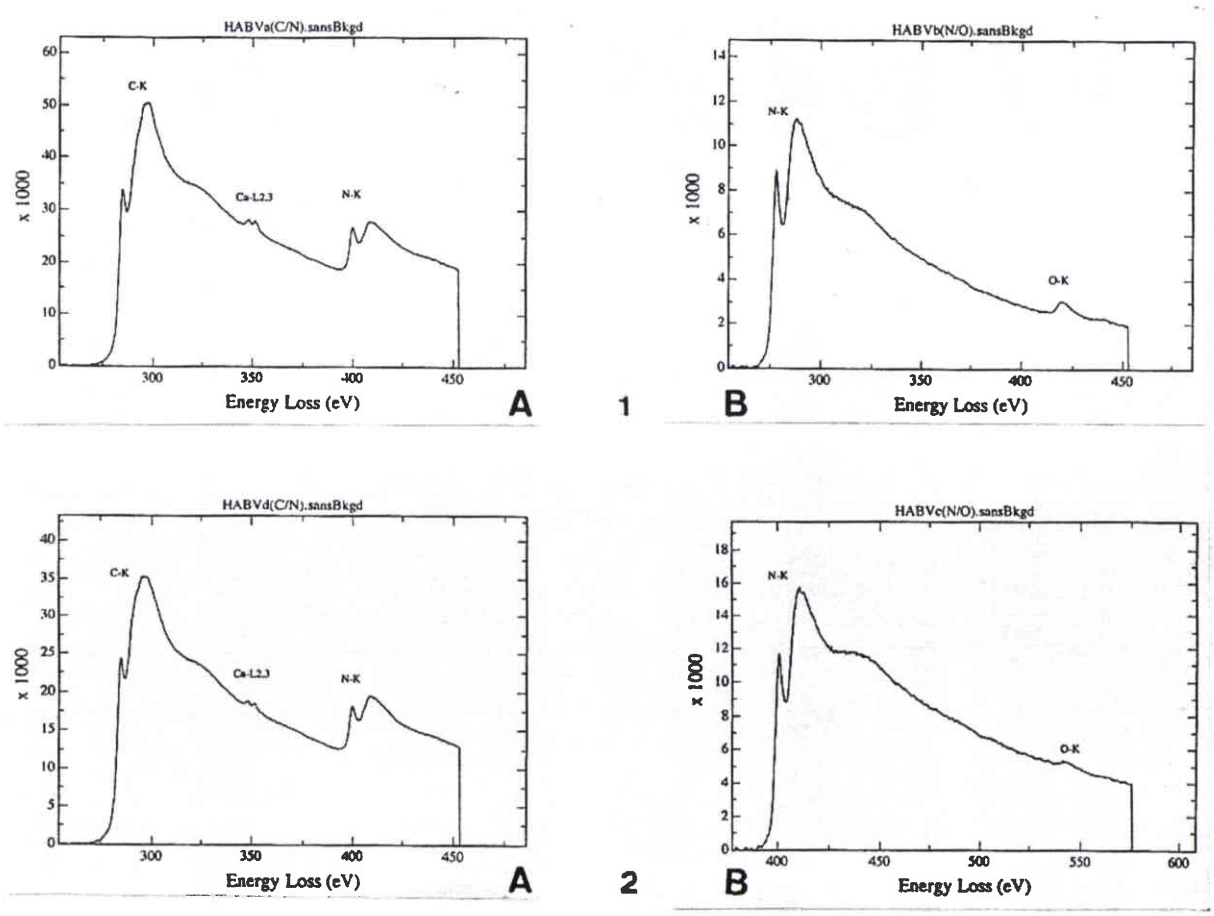
Planche IV_{34} : Analyse de la partie organique des concrétions d'animaux contaminés par du sel de cadmium (444 ppm) dans le sol artificiel

1A. C/N : partie centrale d'une concrétion en formation à comparer avec le spectre de la guanine (planche IV_{29}, figure 1A)

1B. N/O : partie centrale d'une concrétion en formation

2A. C/N : partie périphérique d'une concrétion

2B. N/O : partie périphérique d'une concrétion



Ainsi jusqu'à la constitution de la concrétion, la silice, le phosphore, le calcium, le plomb et le zinc peuvent être détectés simultanément avec de la matière organique ; c'est dans la vacuole que se fait la ségrégation avec, d'une part, le plomb restant dans la vacuole apicale associé à du phosphore et à du calcium (phosphate de calcium) et, d'autre part, la silice amorphe co-précipitant avec de la matière organique (déchets puriques mais aussi protéines soufrées) en associant du potassium, du calcium et, selon le type de contamination, du magnésium, du zinc, du fer et du cadmium. La présence de matière organique empêche la cristallisation des urates qui représentent une cause de fragilité cellulaire, par exemple chez l'Homme, après phagocytose par les granulocytes des cristaux d'urates (crise de goutte), il y a autolyse lysosomale et destruction cellulaire (figure 90). Chez *Helix aspersa aspersa*, l'acide urique et éventuellement l'urée doivent être présents à l'état dissous dans le liquide vacuolaire du néphrocyte. Le cuivre de l'hémocyanine détecté dans des inclusions cytoplasmiques de la cellule rénale n'est jamais détecté dans les concrétions ou les floculum du liquide de la vacuole apicale il peut-être par contre libéré lors de la destruction finale du néphrocyte.

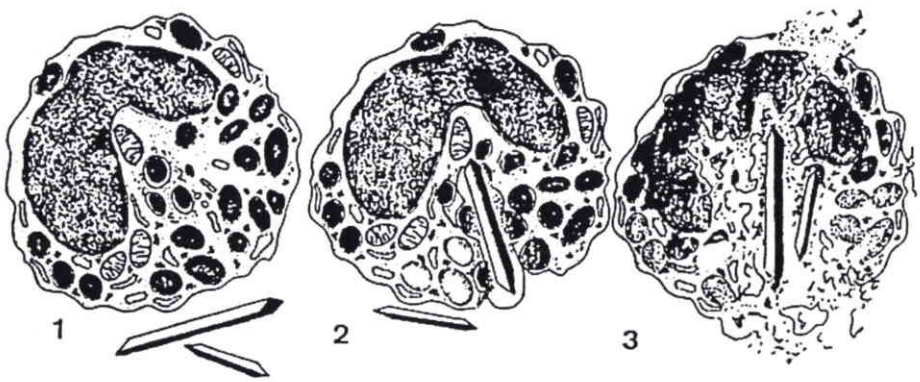


Figure 90 : Cristaux d'urates chez l'Homme provoquant l'autolyse des granulocytes (d'après Theret *et al.*, 1985)

III.5.2. Comparaison des concrétions du néphrocyte d'*Helix aspersa aspersa* avec les concrétions d'autres invertébrés

La discussion sur la nature mixte minérale et organique des concrétions peut être élargie à d'autres invertébrés tels que les insectes (tableau 61).

Martoja *et al.* (1975) ont mis en évidence l'importance de la bioaccumulation minérale et purique avec formation de sphérocristaux de composition minérale, purique ou mixte. Une étude plus spécifique de différentes espèces de Planipennes (Martoja *et al.*, 1978) a permis de comparer la constitution des sphérocristaux des différents organes en fonction du mode de vie et du milieu de vie, terrestre ou aquatique. Chez les larves terrestres de *Euroleon* et *Acanthaclisis* des déchets puriques sont associés aux sels minéraux dans les sphérocristaux du tissu adipeux externe et de l'épiderme sans pigment alors que chez les larves aquatiques de *Sisyra*, les sphérocristaux ne sont constitués que de sels minéraux quelque soit le tissu étudié. Les concrétions du néphrocyte de *Helix aspersa aspersa* se rapprochent, par leur composition, des sphérocristaux du tissu adipeux externe des larves terrestres d'autant que les auteurs signalent, dans le texte, la présence d'un peu de quartz (SiO_2) associé à des urates de potassium, de la calcite ($CaCO_3$) et de la xanthine cristallisée (composé purique). Par ailleurs, une étude du méconium, important chez les fourmilions, met en évidence la présence, dans la lumière intestinale, de sphérocristaux libérés par les cellules du mésentéron comprenant des composés exogènes (Si, Al, Ti) caractéristiques de minéraux de la croûte terrestre (silico-aluminates) qui sont ingérés sous forme de microparticules par la larve. Les concrétions d'*Helix aspersa aspersa* en différent cependant nettement par l'abondance de silice.

Tableau 61 : Etude des sphérocristaux des insectes planipennes. Teneurs relatives en éléments minéraux et présence de déchets puriques des organes des larves âgées terrestres ou aquatiques de planipennes (d'après Martoja *et al.*, 1978 modifié) (Eléments détectés seulement chez l'imago)

	Ca	Mg	Mn	Fe	Zn	K	P	Si	Déchets Puriques	Interprétation
Planipennes (larves terrestres)										
Mésentéron	++++	++	+	+ (Fe^{2+})	+	+	++	0	-	*Phosphates et carbonates de calcium*
Tissus adipeux interne	Peu de sphérocristaux sauf chez l'adulte									- *Calcite* - *Xanthine cristallisée* - *Urates de potassium*
Tissus adipeux externe	+	0	0	0	0	++		(+)	+	
Tubes de Malpighi	+++	++	0	0	0	0	0	0	-	*Sels de calcium et de magnésium*
Epiderme à pigments	++	+	0	0	+	0	0	0	-	
Epiderme sans pigment	+	0	0	0	0	++	0	0	+	*Urates de potassium*
Planipennes (larves aquatiques)										
Mésentéron	++	0	0	+	0	0	++++	0	-	*Phosphates de calcium*
Tissu adipeux externe	+	0	0	0	0	+	+	0	-	*Phosphates de calcium et de potassium*
Tissus adipeux interne	++ à ++++	+ à ++	+	+ à ++		+	++ à +++	0	-	
Tubes de Malpighi – **Segment libre**	++	0	0	0	0		+ à ++	0	-	*Peu de phosphate de calcium*
Tubes de Malpighi – **Segment cryptonéphridie**	++++	0	0	0	0	0	+++	0	-	*Beaucoup de phosphates de calcium*
Epiderme à pigments	++	+	0	0	0	+	0	0	-	*Pas de déchets puriques*

L'influence du milieu aquatique sur l'excrétion azotée est connue depuis les travaux de Razet (1961) et selon Martoja *et al.* (1978), l'abondance des sphérocristaux dans les différents tissus des larves de planipennes ne s'explique pas par un besoin d'économie de l'eau car une telle situation se rencontre chez des insectes pour lesquels une telle économie n'est pas à envisager.

Par ailleurs, la fonction de rétention minérale des cellules à calcium de la glande digestive de *Helix aspersa aspersa* est analogue à celle des cellules de l'épithélium du mésentéron des insectes et à celle des cellules des tubes de Malpighi.

Selon Martoja *et al.* (1978), les planipennes réalisent, dans les concrétions, une véritable fossilisation d'éléments ayant joué un rôle dans le maintien de l'équilibre ionique ou comme métallo-enzymes. Cet avis, comme nous l'avons vu, est partagé pour les gastéropodes.

III.5.3. Formes minérales de la silice. Rôle chez les organismes

III.5.3.1. Formes minérales de la silice

Selon Marschner (1986), le silicium est le deuxième élément le plus abondant de la croûte terrestre. Dans les solutions du sol, la forme prédominante est l'acide monosilicique $Si(OH)_4$. La solubilité dans l'eau à 25°C est de 2 $mM.l^{-1}$ soit 120 mg $SiO_2.l^{-1}$. Les concentrations dans les solutions du sol varient de 7 à 80 $mg.l^{-1}$ avec une moyenne de 30 à 40 mg $SiO_2.l^{-1}$ avec une

tendance à des concentrations inférieures à pH > 7 quand les quantités de sesquioxydes sont importantes et quand l'adsorption anionique est dominante. Des concentrations en SiO_2 des solutions du sol supérieures à 120 $mg.l^{-1}$ indiquent soit une sursaturation en $Si(OH)_4$ soit une polymérisation partielle de l'acide monosilicique.

La silice ou oxyde de silicium (SiO_2) est un des minéraux les plus répandus. C'est l'anhydride de l'acide silicique (SiO_3H_2) dont les sels sont les silicates. La silice se présente sous plusieurs états : les uns amorphes et hydratés (silice gélatineuse, opale), les autres cristallisés et anhydre (quartz, calcédoine) (Bertin, 1939 ; Jacquemin et Sider, 1990).

- La silice gélatineuse est la forme de voyage de la silice. Elle forme avec l'eau des solutions colloïdales. Elle provient de l'action dissolvante des eaux chargées en CO_2 agissant sur les silicates des roches et sur les organismes siliceux : Diatomées, Radiolaires, Eponges siliceuses. Les molécules de silice sont agrégées en très fines particules ou micelles.

- L'opale résulte de la floculation, de la coagulation des micelles de silice gélatineuse. C'est une substance amorphe de la silice hydratée de formule $SiO_2(H_2O)_n$ (de 4 à 20% d'eau) transparente ou opaque, incolore ou colorée. Toutes les roches sédimentaires contiennent plus ou moins d'opale. La meulière caverneuse résulte de la dissolution du calcaire alors que la matrice siliceuse demeure.

- Le quartz est de la silice pure anhydre de formule SiO_2 cristallisant en prismes hexagonaux terminés par une pyramide à 6 faces.

- La calcédoine, silice non hydratée, se présente en masse fibreuse ou mamelonnée. Elle imprègne les arbres silicifiés. Elle forme les rognons de silex de la craie blanche par mobilisation de la silice des radiolaires et des éponges. Elle compose les jaspes et l'agate. Le fer colore en rouge la cornaline.

- Les silicates forment la majeure partie des roches éruptives ou métamorphiques. Ce sont des combinaisons de la silice avec différents oxydes. Leurs constituants sont SiO_2-H_2O-K_2O-Na_2O-CaO-MgO-FeO-Al_2O_3-Fe_2O_3. Les principaux silicates sont les feldspaths, les micas, les amphiboles, les pyroxènes et les péridots.

Nota : le kaolin utilisé dans la constitution du sol artificiel en élevage contrôlé, résulte de la décomposition des feldspaths :

fledspath orthose	$6S1O_2.Al_2O_3.K_2O$	
Kaolin	$2SiO_2.Al_2O_3$	$2H_2O + 4SiO_2$
Bauxite	$2SiO_2.Al_2O_3.(H_2O)_n$	$NH_2O + 2\ SiO_2$

On peut estimer que la silice est présente dans la ration alimentaire de l'escargot soit en condition d'élevage dans la farine contenant de la poudre de calcaire ($CaCO_3$) plus ou moins riche en silice ajoutée aux ingrédients végétaux soit dans la nature à partir des silicates du sol (argiles) mais aussi des formes de la silice rencontrées chez certaines plantes (phytolithes des graminées).

Compte tenu des besoins en calcium de l'escargot pour la constitution de la coquille, l'aliment est enrichi en divers additifs calciques (broyat de coquille d'huître, roche calcaire, carbonate de calcium) dont certains se sont révélés plus favorables que d'autres sur la croissance. L'un de ces ajouts, une algue calcaire marine ou «maërl» draguée en Bretagne, s'est ainsi révélé très efficace (Gomot, 1994). La microanalyse comparative EDX et EEL d'un broyat de coquille d'huître (planche IV_{35A}, figures 1a et 1b) et d'un broyat de «maërl» (planche IV_{35A}, figures 2a et 2b) montre une nature simple de carbonate de calcium $CaCO_3$ pour l'huître, par contre, pour le «maërl», il y a toujours en plus du $CaCO_3$, un apport supplémentaire en Mg et, selon la fraction analysée, un apport qui peut être très important en Fe et, à l'état de traces, en Mn, **Si**, Al, P et S. Le «maërl» présente donc une performance meilleure de la croissance. Gomot (1994) avait déjà souligné la présence de Mg.

Dureté

Dans l'échelle qui va de 1 (talc) à 10 (diamant) (échelle de dureté de Mohs), les concrétions de la cellule rénale doivent présenter une dureté de 5 à 6,5 avec une densité variant de 2,6 à 3,6 (dureté du verre 5,5, dureté de l'acier 6,5, dureté du quartz 7) (Jacquemin et Sider, 1990).

Par contre, les grains de phosphate de calcium des cellules à calcium de la glande digestive doivent présenter une dureté de 5 avec une densité proche de 3,2 (caractéristique de l'Apatite : $Ca_5(PO_4)_3(OH, F, Cl)$ (Jacquemin et Sider, 1990)

Ces duretés expliquent la difficulté d'obtenir de bonnes coupes pour l'analyse en microscopie électronique à transmission et la microanalyse EDX ou EELS. Le plus souvent, sauf pour les concrétions en début de formation, la place de la concrétion est un vide gardant, en périphérie, la dernière couche en voie d'accroissement et dans laquelle les micelles de silice, associés aux déchets puriques, ne sont pas encore complètement condensées.

III.5.3.2. La silice et les organismes

❖ Organismes fossiles

Les organismes fossiles, riches en silice, ont donné lieu à des roches siliceuses d'origine organique :

- Radiolarites : par accumulation des squelettes des radiolaires (opale ou silice hydratée)
- Tripoli ou Diatomite : par accumulation de squelettes de Diatomées (frustules), opale ou silice hydratée.
- Comme nous l'avons vu, la silice provenant des Radiolaires, des Diatomées et des éponges siliceuses a donnée lieu à la formation de silex de la craie.

❖ **La silice et les plantes**

Compte tenu du régime essentiellement herbivore de l'escargot, il est fondé de considérer l'apport de silice par l'alimentation d'origine végétale.

Les plantes peuvent être classées en deux catégories : les accumulatrices de silicium (avec prise de silicium excédant celle de l'eau) et les non accumulatrices (avec une prise de silicium égale ou inférieure à celle de l'eau).

Planche IV_{35A} : Microanalyse de l'additif calcique de certains aliments pour l'héliciculture

1. Coquilles d'huître.

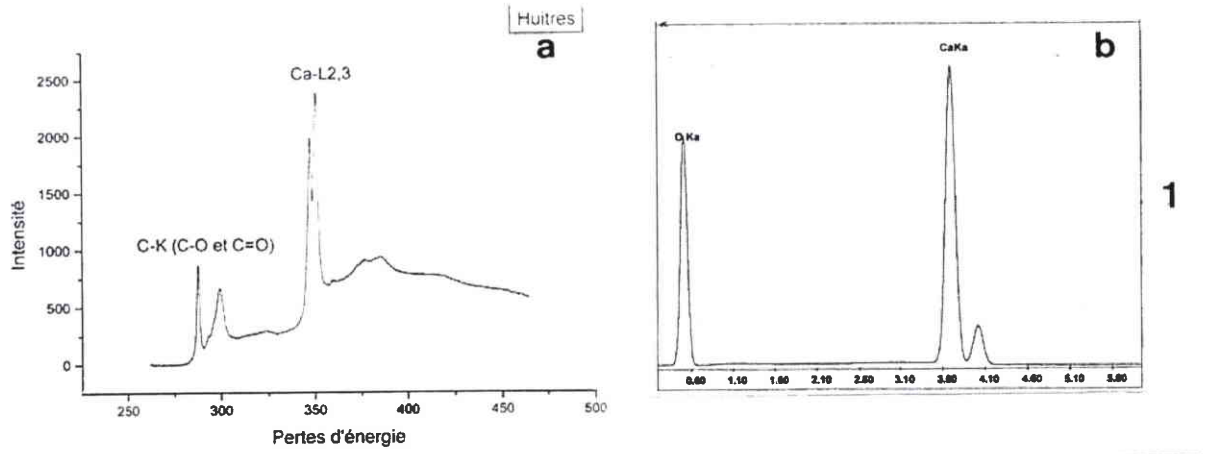
a. Spectre EEL ; mise en évidence du carbonate de calcium $CaCO_3$;
b. Spectre EDX : pureté du carbonate de calcium, absence d'autres éléments que O et Ca.

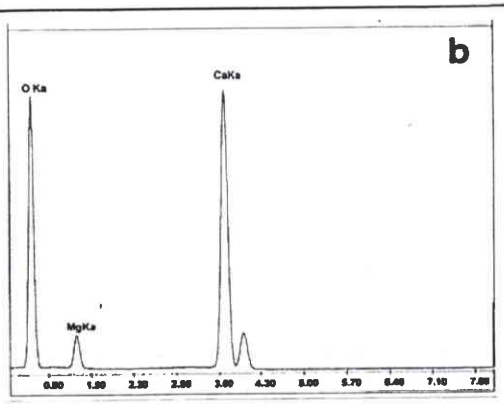
2. Algues marine calcaire (« maërl ») rentrant dans la composition de l'aliment Helixal®

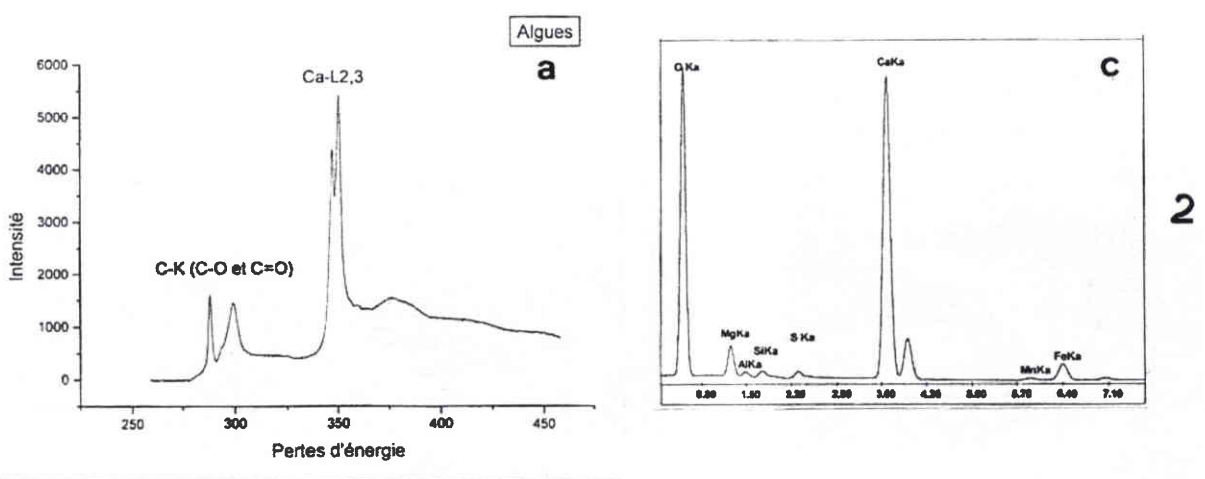
a. Spectre EEL ; mise en évidence du carbonate de calcium $CaCO_3$;
b. à d : Spectres EDX variés selon l'impact mais présence permanente de O, Ca et Mg :

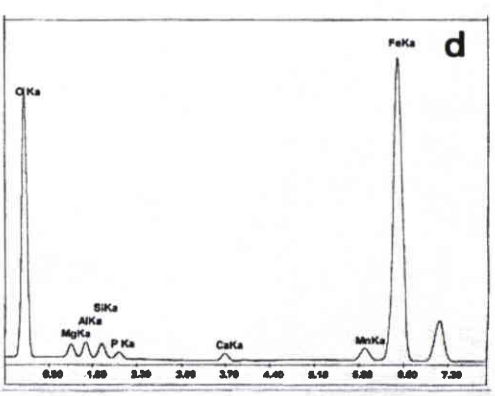
- b : Présence seulement de O, Ca et Mg ;
- c : Présence prépondérante de O, Ca et Mg mais aussi de Fe, S, Si, Al et Mn ;
- d : Présence importante d'oxyde de fer (O, Fe) et à l'état de traces de Mn, Mg, Al, Si, P et Ca.

Planche IV35A









Exprimée en % du poids sec des pousses végétales, le contenu en silice des plantes est très variable. Pantes silicophiles de 10 à 15% chez les graminées des zones humides (riz) et équisétacées (Equisetum) ; 1% chez les graminées des zones sèches (majorité de céréales : canne à sucre) et quelques dicotylédones ; < 0,5% chez la majorité des dicotylédones spécialement les légumes.

Après la prise de la silice par les racines, le transport est assuré par le xylème et la distribution est fonction du taux de transpiration dans les organes. Le dépôt de la silice se fait en fin de flux de transpiration, plus particulièrement dans la paroi externe des cellules épidermiques des deux surfaces foliaires.

La silice se dépose, soit sous sa forme amorphe ou opale $SiO_2.nH_2O$, soit sous la forme de phytolithes d'opale ayant des formes distinctes et caractéristiques de l'espèce végétale.

Chez certaines plantes, l'imprégnation de la paroi des cellules épidermiques, par une couche résistante de silice, crée une barrière contre la perte d'eau par transpiration cuticulaire et contre les infections fongiques. Une quantité importante de silice est intracellulaire chez les plantes herbacées dans des cellules spécialisées désignées « cellules à silice ». Elle existe également dans les parois cellulaires des vaisseaux du xylème et dans les cellules de l'endoderme des racines où elle agit comme barrière aux parasites et pathogènes.

La présence de fibres de silice dans certaines productions végétales peut être une menace pour la santé humaine car leur dimension correspond à la taille critique des fibres classées comme carcinogénétiques (corrélation entre la consommation de *Setaria* en Chine du nord ou de *Phalaris* mélangé au blé dans le Middle East et le taux de cancers de l'œsophage).

La fonction physiologique de la silice, chez les plantes, est principalement démontrée lors de la reproduction (riz) alors qu'elle est faible pendant la phase de croissance végétative. Des symptômes de déficience en silice sont cependant observés chez la canne à sucre. La silice est un élément essentiel pour la croissance et la reproduction de la tomate et du concombre, ceci en rapport avec le rôle de la silice dans la résistance à la compression des vaisseaux du xylème quand le taux de transpiration est élevé. Les effets sur la reproduction sont encore non explicités.

Les troubles métaboliques liés à l'absence de silice, considéré comme un oligoélément essentiel des plantes supérieures, n'ont pas encore fait l'objet de nombreuses études. Cependant, en l'absence de silice, les auteurs mettent en évidence :

a. une décroissance de l'incorporation du phosphate inorganique dans l'ATP et x (canne à sucre)

b. une décroissance du pourcentage en lignine dans les parois racinaires du blé avec une augmentation des composés phénoliques.

L'acide silicique donnerait des dérivés du type esters et permettrait les liaisons dans l'organisation structurale des polyuronides (R_1-O-Si-O-R_2). De même, il a été démontré une grande affinité de l'acide silicique pour les O-diphénols (acide caféique) et les esters qui en dérivent avec une formation de complexes mono, di et poly Si de grande stabilité et de solubilité faible (figure 91). La présence de silice n'est pas seulement un dépôt inerte dans les parois lignifiées mais elle module la biosynthèse de la lignine avec un bilan énergétique estimé comme favorable. L'acide germanique a été employé comme inhibiteur métabolique.

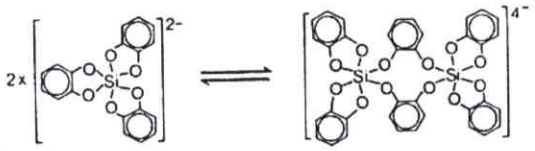


Figure 91 : Complexes poly-siliciques

Les effets nettement favorables signalés sont :

- effet favorable sur la position dressée des feuilles diminuant l'ombrage alors que des apports azotés diminuent cette position
- diminution des infections fongiques (barrière physique et aussi résistance à la dégradation enzymatique de la paroi)
- blocage de la toxicité du manganèse et/ou du fer (Vlamis et Williams, 1967 *in* Horst et Marshner, 1978 ; figures 92 et 93).

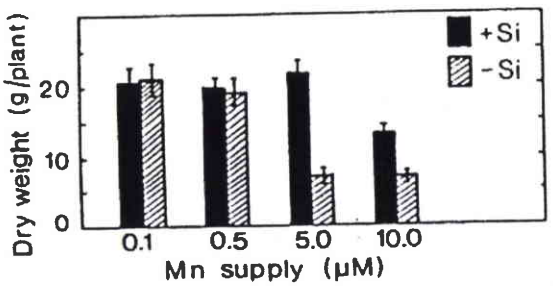


Figure 92 : Effet du manganèse sur le poids sec du poids en absence et en présence de silice (1-55 mg SiO_2/litre). Les lignes verticales représentent l'écart type (modifié d'après Horst et Marschner, 1978)

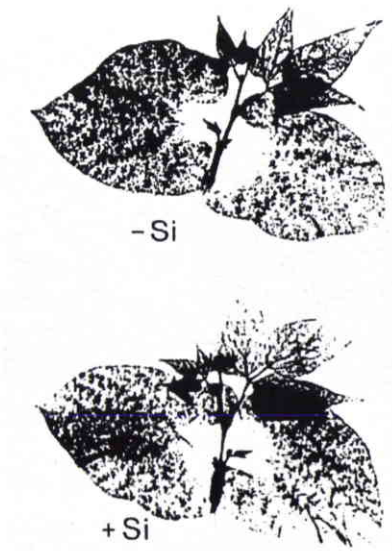


Figure 93 : Autoradiographie montrant l'effet de la silice (0,75 mg SiO_2/litre) sur la distribution du ^{54}Mn dans les feuilles de pois contaminés pendant 6 jours par 0,1mM de ^{54}Mn. Les teneurs en manganèse des premières feuilles sont de : 22,0 µg/g de poids sec en absence de Si et 16,7 µg/g de poids sec en présence de Si (d'après Horst et Marschner, 1978 a)

Ce dernier aspect mérite un développement. Vlamis et Williams (1957) montrent, chez le haricot, en l'absence de silice, une distribution non homogène du manganèse se concentrant au niveau des taches brunes, typiques de la toxicité du manganèse (oxydes de manganèse), entourées de chlorose et de nécrose. En présence de silice, le manganèse se réparti d'une manière homogène dans la feuille, n'atteignant pas le seuil de toxicité cellulaire. Toutefois, le mécanisme de cet effet favorable n'est pas complètement élucidé.

Chez le riz, selon Vorm et Diest *in* Marshner (1978), la présence de silice diminue la prise de fer et de manganèse par les racines. Un apport de silice est une pratique courante dans la culture intensive du riz et de la canne à sucre.

❖ La silice et les animaux

Effets favorables

La silice est un élément minéral essentiel pour les animaux. C'est un constituant de certains mucopolysaccharides du tissu conjonctif (Jones, 1978).

Effets défavorables

Chez les herbivores, la consommation d'une grande quantité de phytolithes peut aboutir à une abrasion excessive des parois de la panse et de la silice dissoute peut former des dépôts secondaires dans le rein avec des pertes économiques conséquentes (Jones et Handreck, 1969).

La silice peut être à l'origine de pathologies mitochondriales chez les mammifères. Après injection intra-péritonéale de gel de silice, on note la présence de silice dans la matrice de la chambre interne mitochondriale (Policard *et al.*, 1961).

Bioaccumulation

Dans une revue sur la bioaccumulation des métaux, Martoja et Martoja (1984) signalent une bioaccumulation naturelle de silicium chez les mollusques : d'une part, en faible quantité, dans les cellules en relation avec le milieu extérieur : (incorporation à la denture (Ca, Fe, Si), lame basale (Al, Si, Ca, Fe, Cu, Br, Zn, Mo, Ag et Cd) d'autre part, également en faible quantité, dans la matrice extracellulaire (sphérocristaux calcaires : Ca, Mn, Zn, Mg, Si et Fe). Pour les autres groupes zoologiques et en bioaccumulation naturelle, les auteurs citent les spongiaires avec l'endosquelette siliceux et les vertébrés avec la silice pouvant être abondant dans les vacuoles digestives (Mg, Al, Si, K, Ca, Ti et Fe) ou en faible quantité dans les lysosomes des cellules en contact avec le milieu intérieur (Fe, Mg, Al, Si, Mn et Cu). En cas de bioaccumulation induite, les auteurs citent, chez les mollusques et les vertébrés, la présence de silice, associé à Be, Al, Ti, Cr, Fe et Pb dans les vacuoles digestives des cellules ayant des échanges avec le milieu extérieur.

Chapitre IV : Comparaison des concrétions de la glande digestive et du rein chez *Helix aspersa*

Une observation, à l'état frais, met bien en évidence les concrétions des cellules basophiles ou cellules à calcium de la glande digestive (planche IV_{35B}, figure 1) ainsi que, par acinus de la glande, la présence de cellules à grande vacuole avec des corps résiduels jaunâtres ($\varnothing$ = 3,7 µm). Il s'agit de cellules digestives en phase excrétrice. Un frottis extemporané de la glande digestive permet de disperser les concrétions (planche IV_{35B}, figure 2) et de mesurer leur diamètre variant de 0,5 à 1,88 µm.

Un frottis du rein permet de disperser également les concrétions et de mesurer leur diamètre variant de 3,22 à 9,14 µm (figures 95 et 96). Les concrétions rénales présentent une forme moins régulière, grossièrement sphérique (figure 94), mais avec des protubérances mamelonnées par adjonction de sous unités sphériques (plancheIV_{35B}, figure 3).

Les concrétions se retrouvent mélangées dans les fécès. Un frottis permet de distinguer les concrétions des fécès des constituants normaux de la farine fournie (planche IV_{36}, figure 1). Le mélange de deux classes de taille de concrétions est observé (planche IV_{36}, figure 2). Un traitement à l'acide chlorhydrique produit une effervescence avec une disparition des concrétions de la glande digestive, alors que les concrétions rénales ne sont pas dissoutes (planche IV_{36}, figure 3) et présentent seulement des desquamations de surface. La nature organo-minérale différentes, des deux types de concrétions, explique cette différence de réaction avec une partie minérale riche en P et Ca, pour les concrétions de cellules à calcium, et une partie minérale riche en Si et avec peu de Ca, pour les concrétions rénales.

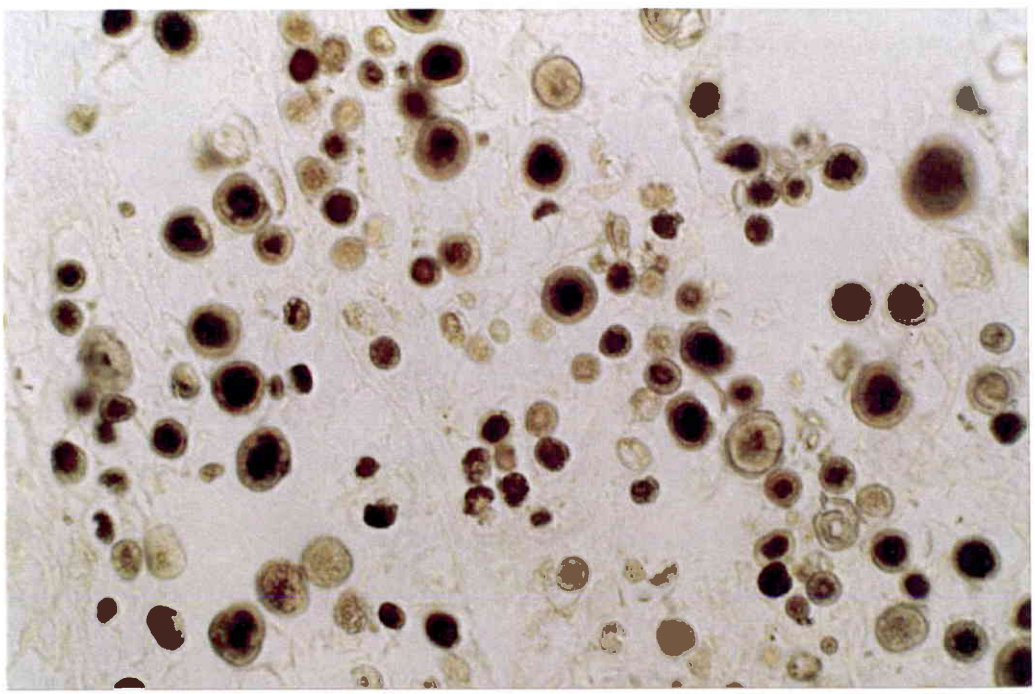


Figure 94 : Exemple de champ du microscope étudié en analyse d'image. Concrétions rénales de différentes tailles en fonction de leur stade de biogénèse chez *Helix aspersa aspersa*

Planche IV_{35B} : Morphologie comparée des corps résiduels (C.R.) de la glande digestive, des concrétions des cellules à calcium (CCCa) de la glande digestive et des concrétions rénales (C.N.) chez *Helix aspersa (échelle 10 µm)*

1. **Observation extemporanée et sans coloration d'un fragment de la glande digestive (G x 400)**

   Une cellule digestive, en phase excrétrice, présente deux corps résiduels jaunâtres d'un diamètre de 3,7 µm.
   Les cellules à calcium présentent des grappes de concrétions d'un diamètre maximum de 1,88 µm.

2. **Frottis extemporané, sans coloration, de la glande digestive (G x 400)**

   Les concrétions ont un diamètre variable de moins de 0,5 µm.

3. **Frottis extemporané, sans coloration, de néphrocytes (G x 400)**

   Les concrétions présentent un diamètre de 3,22 µm à 9,14 µm. Certaines semblent formées par la coalescence de plusieurs concrétions donnant, en surface, un aspect mamelonné (b et c). La concrétion d montre bien l'adjonction de petites concrétions d'environ 0,5 µm de diamètre formant un ensemble de 6,45 µm de diamètre.

Planche IV$_{35B}$

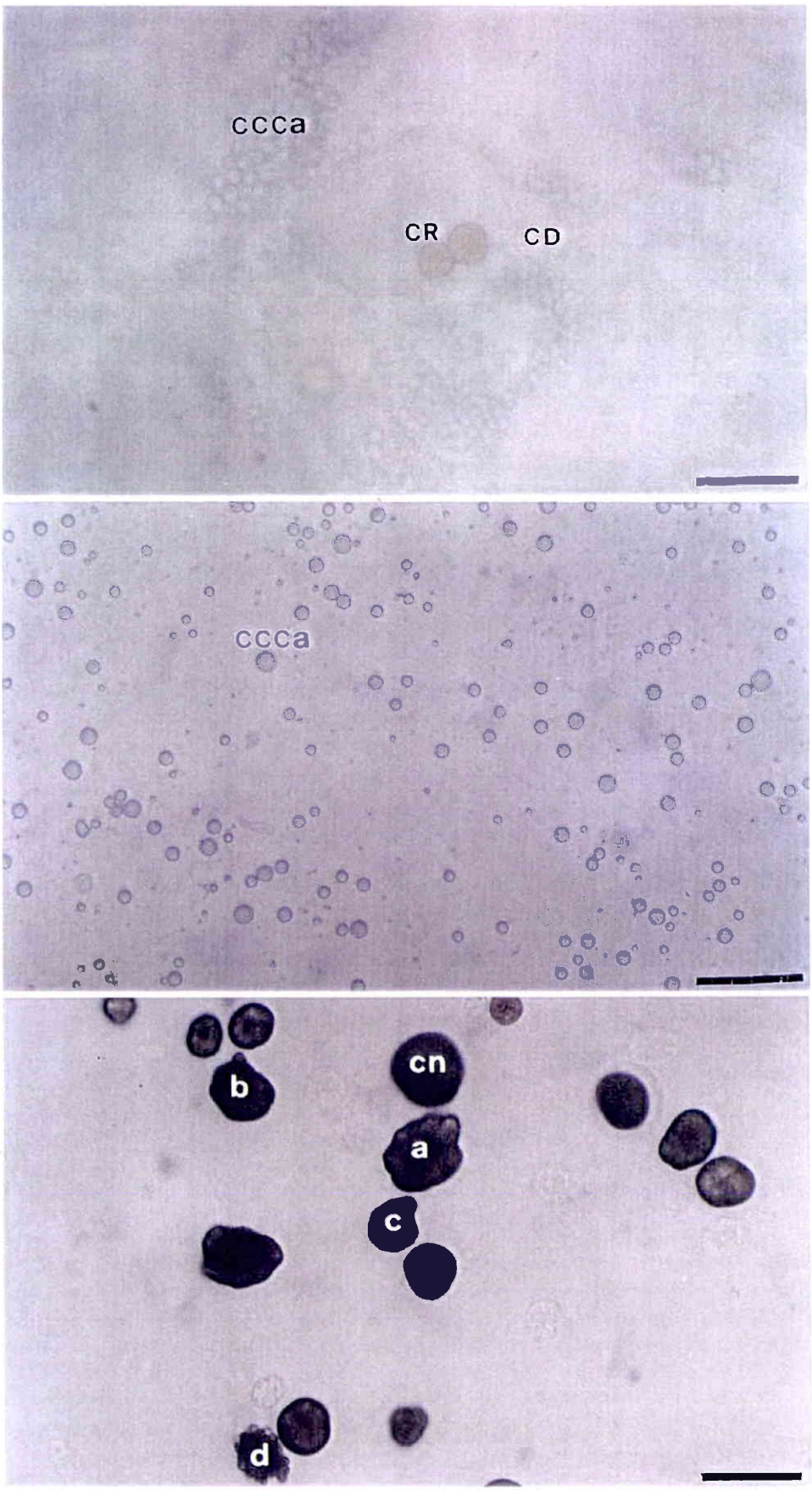


Planche IV_{36} : Comparaison de la composition de l'aliment Helixal® et des fécès chez *Helix aspersa* (échelle = 10 µm)

1. **Détail de la poudre formant l'aliment Helixal® (G x 250)**

   On reconnaît des fibres et des cellules végétales (C.V.).

2. **Frottis de fécès de H.a. (G x 400)**

   On reconnaît des concrétions de deux classes de taille différentes :

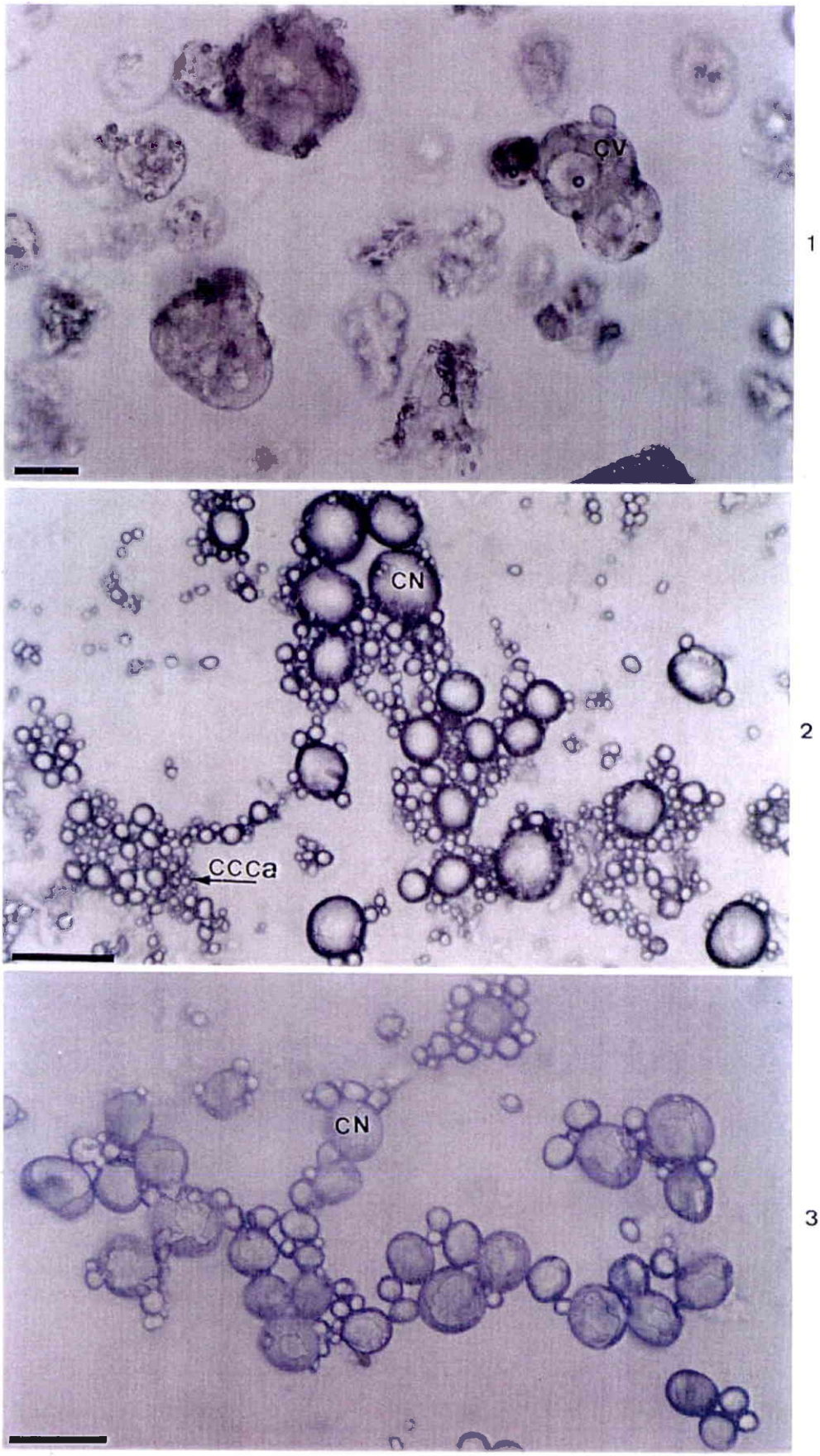
   a) La classe supérieure avec des diamètres allant jusqu'à 7,5 µm.
   b) La classe inférieure avec des petites concrétions commençant à 0,5 µm.

3. **Frottis de fécès de H.a. après traitement à l'acide chlorhydrique(G x 400)**

   a) Les concrétions de la classe de taille supérieure résistent tout en montrant des desquamations superficielles. Elles sont de nature mixte, organique et siliceuse. La présence de silice les rend résistantes à l'acide chlorhydrique. Elles proviennent des néphrocytes (C.N.).
   b) Les concrétions de classe de taille inférieure ont disparues du fait de leur nature phosphatée calcique et organique. Elles proviennent des cellules à calcium de la glande digestive (C.C.Ca.).

   Anatomiquement, le pore urinaire est très proche de l'anus et les produits d'excrétions s'associent aux fécès du tractus digestif.

Planche IV$_{36}$



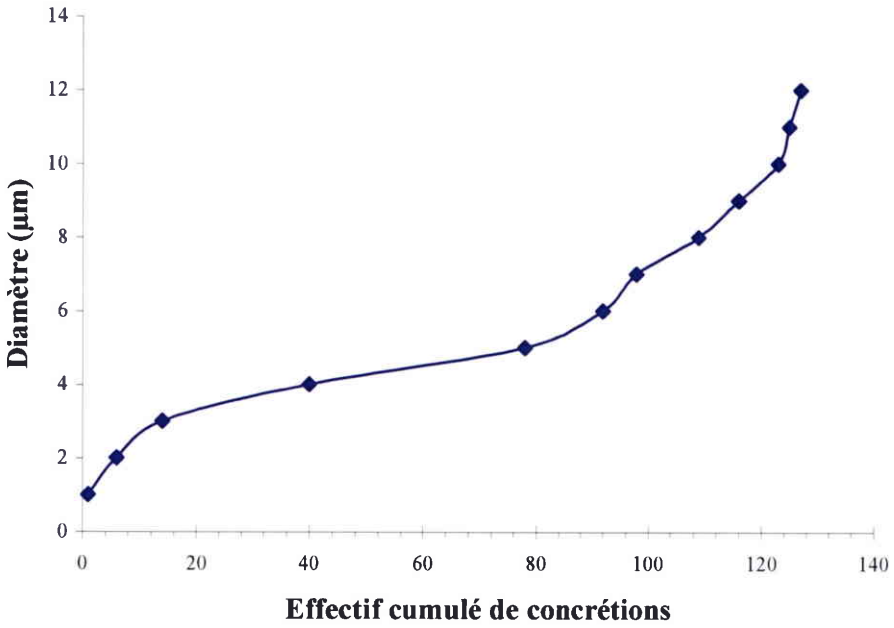


Figure 95 : Répartition de la taille des concrétions en effectif cumulé (n = 127)

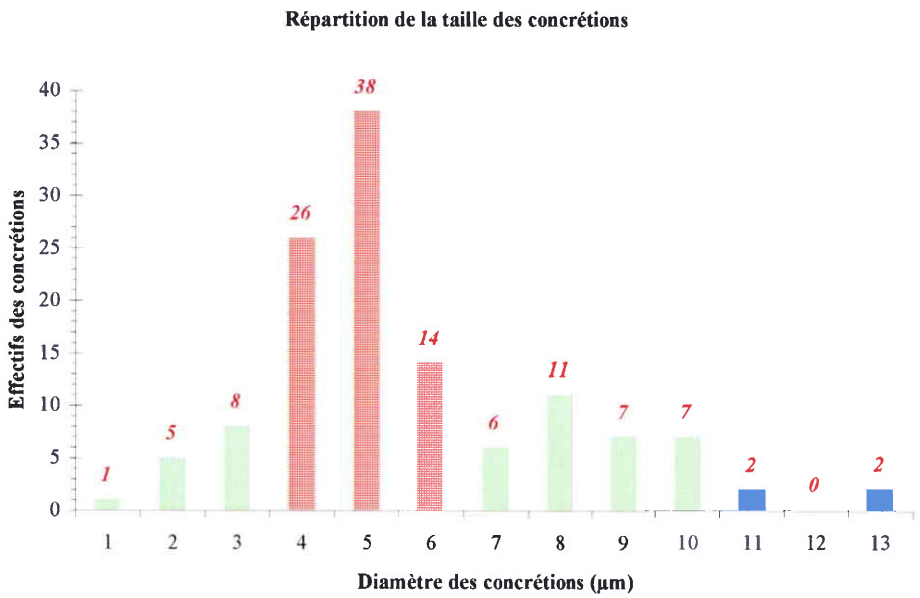


Figure 96 : Effectif des concrétions par classe de diamètre (en µm)

Chapitre V : Comparaison des concrétions des cellules à calcium digestives et des néphrocytes entre *Helix aspersa aspersa* et *Helix pomatia* (planches IV_{37} et IV_{38})

Les différences concernent la glande digestive et le rein (tableau 62).

Dans la glande digestive de *Helix pomatia*, les cellules à calcium présentent une vacuole basale, occupant les $\frac{2}{3}$ du volume de la cellule, dans laquelle s'agrègent des concrétions de tailles variées (1 à 8 µm). Les cellules digestives sont beaucoup plus nombreuses avec un pôle apical qui se projette en lobe dans la lumière de la glande digestive (figures 1 et 2 de la planche IV_{37}).

Les néphrocytes, à grande vacuole apicale, contiennent des inclusions de 12 à 15 µm à contours festonnés du fait de la coalescence de plusieurs concrétions, avec une réaction positive aux mucopolysaccharides au niveau de l'enveloppe formée par les différents constituants en cours de précipitation.

Après ajout d'acide chlorhydrique (planche IV_{38}), les concrétions des cellules à calcium de *Helix pomatia* disparaissent alors que les concrétions rénales ne sont pas dissoutes. L'analyses EDX met en évidence, dans les concrétions rénales, la présence de silice amorphe mais également P et Ca en faible quantité (planche IV_{39}, figures A à C). Il y a présence de P, Ca, Mg, K et Na avec peu de Si dans les concrétions des cellules à calcium avec présence simultanée de pyrophosphates et de carbonates de calcium (planche IV_{39}, figures D à G).

Tableau 62 : Comparaison des caractéristiques des concrétions des cellules à calcium et des néphrocytes chez *Helix aspersa aspersa* et *Helix pomatia*.
***[1] : parfois présence de multiples petites concrétions sphériques (n x 10) d'un diamètre d'environ 0,5 µm formant un ensemble de 6,45 µm de diamètre.**
***[2] : parfois présence de concrétions anormales de structure radiaire d'environ 25 µm.**

		Helix aspersa aspersa	*Helix pomatia*
Glande digestive : Concrétions des cellules à calcium	**Nombre par cellule**	n x 10	n x 10
	Forme	sphérique	sphérique
	Diamètre	0,5 à 1,8 µm	1 à 8 µm
	Nature	organo-minérale (P-Ca ; Pyrophosphates)	organo-minérale (P-Ca-Mg-Na-K peu de Si). Pyrophosphates et carbonates de calcium
Concrétions des néphrocytes	**Nombre par cellule**	1*[1]	n x 10*[2]
	Forme	± sphérique avec des protubérances	sphérique
	Diamètre	3 à 9 µm	- élémentaire de 1, à 4,5 µm - ensemble de 12 à 15 µm
	Nature	organo-minérale : - **Silice amorphe : K, Ca, Mg, Al (Silicates)** - Bases puriques : guanine - Protéines (indéterminées) - Mucopolysaccharides acides. - En cas de contamination métallique par certains métaux : Fe, Zn et Cd	organo-minérale - **Silice amorphe et phosphate de calcium** - Composés azotés : Guanine - Calmoduline - Mucopolysaccharides acides

Planche IV_{37} : Histologie de la glande digestive et du rein chez *Helix pomatia* (échelle figures 1 et 3 : 10 µm et figure 2 : 1 µm)

1. **Coupe de la glande digestive (G x 250)**

   Sur cette coupe, on peut observer les cellules à calcium avec des concrétions calciques ainsi que les cellules digestives délimitant la lumière de la glande digestive.

2. **Détail de deux cellules à calcium (G x 1.000)**

   On peut observer les concrétions dans la vacuole occupant les $\frac{2}{3}$ de la cellule.

   Les cellules digestives sont d'aspect granuleux et contiennent de nombreuses vacuoles digestives.

3. **Coupe de lamelles rénales colorées au bleu alcyan (G x 250)**

   Sur cette coupe, on peut voir des hémocytes circulant dans les sinus sanguins axiaux des lamelles et des néphrocytes délimitant la lumière rénale. Chaque néphrocyte présente une vacuole apicale très développée contenant des concrétions visualisées après coloration par le bleu alcyan de la couche périphérique riche en mucopolysaccharides.

Planche IV_{37}

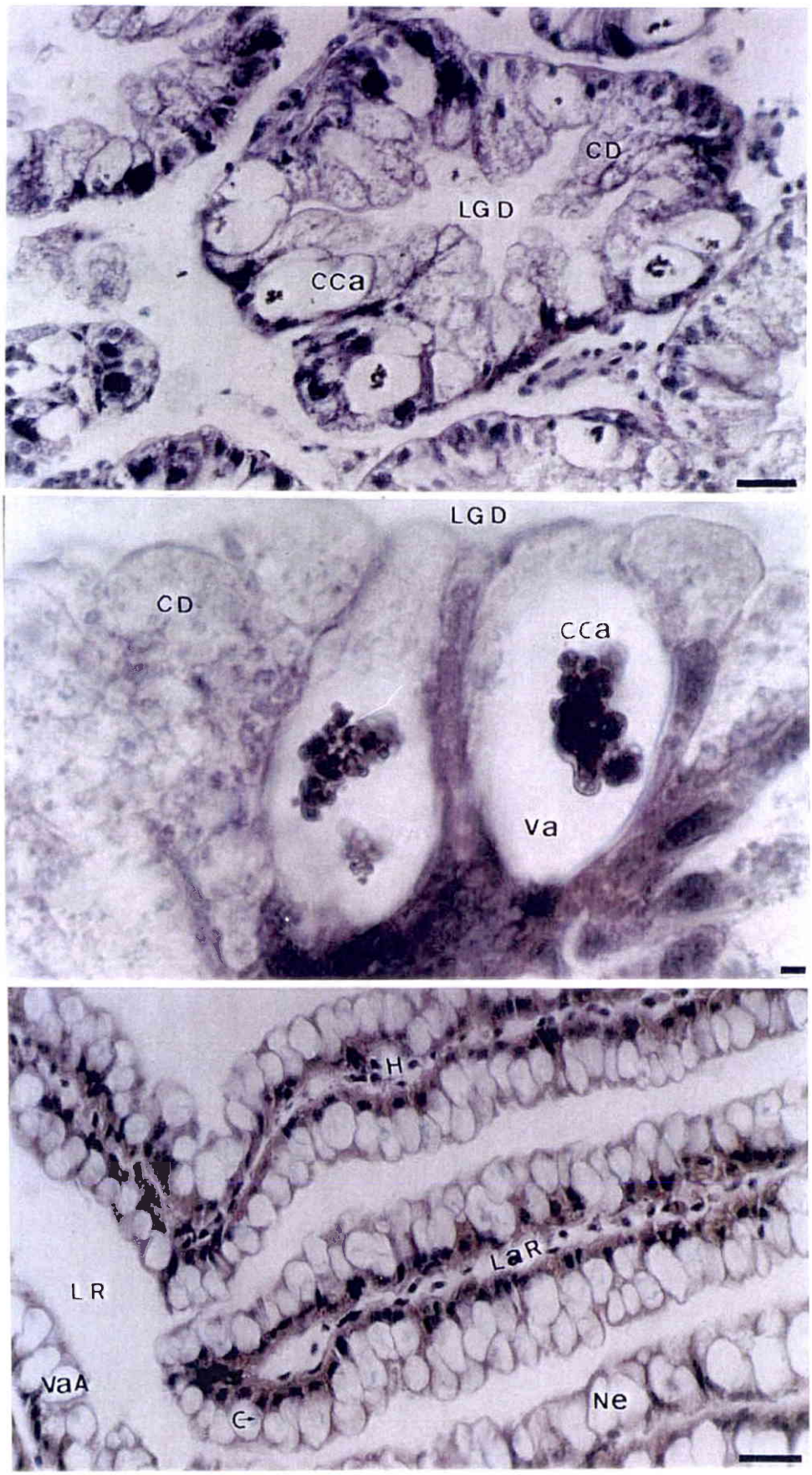


Planche IV_{38} : Etude morphologique des concrétions des cellules à calcium de la glande digestive et des concrétions rénales chez *Helix pomatia* (échelle figures 1 à 4 : 10 µm)

1. **Etude des fécès (G x 65)**

   En dehors des résidus végétaux non digérés, il y a une abondance de concrétions minérales de tailles variées (1 à 8 µm).

2. **Observation des fécès après traitement à l'acide chlorhydrique (G x 65)**

   Les concrétions ayant pour origine la glande digestive sont dissoutes alors que les résidus végétaux persistent.

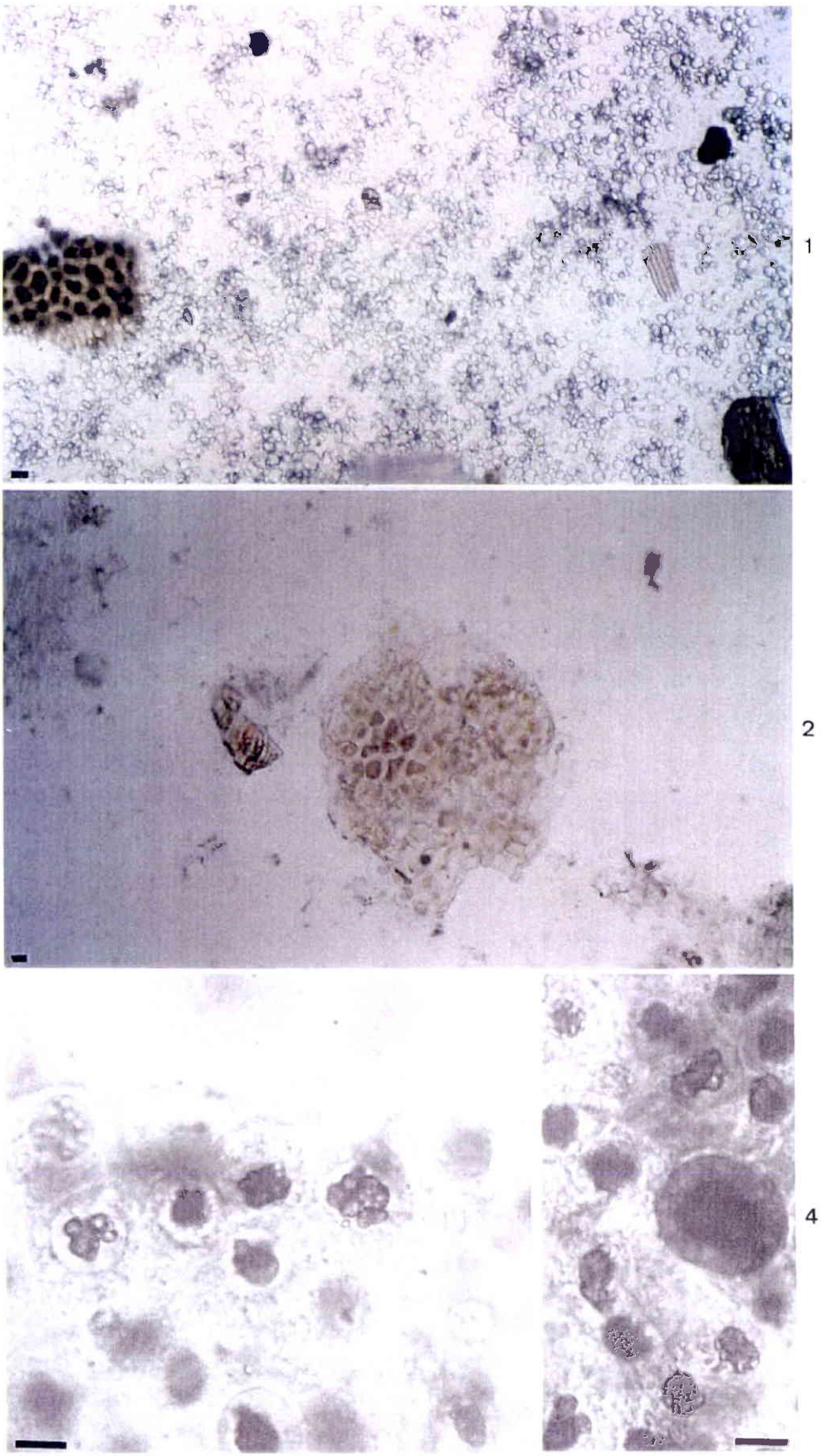
3. **Observation extemporanée d'une lamelle rénale (G x 250)**

   La vacuole apicale des néphrocytes contient de multiples concrétions de petite taille (1,5 à 4 µm), contrairement aux néphrocytes de *Helix aspersa aspersa* qui ne présentent généralement qu'une concrétion importante.

4. **Observation extemporanée d'une lamelle rénale (G x 250)**

   Il y a une présence rare de très grosses concrétions à structure radiaire d'un diamètre de 25 µm.
   La digestion à l'acide chlorhydrique ne dissout pas les concrétions des figures 3 et 4.

Planche IV$_{38}$



1

2

3

4

Planche IV_{39} : Microanalyse des concrétions rénales et des concrétions des cellules à calcium de *Helix pomatia*

A. B. et C : Analyse EDX des concrétions rénales de *Helix pomatia*. Présence de silice amorphe (figure A) associée au phosphate (figure B) ou phosphate et calcium (figure C) et à de la matière organique. La coloration histologique au bleu alcyan met en évidence la présence de mucopolysaccharides acides.

D à G : Microanalyse des concrétions des cellules à calcium de la glande digestive de *Helix pomatia*

- **Figure D** : Analyse EDX mettant en évidence la présence de phosphates de calcium, magnésium, sodium et de potassium ainsi que la présence d'une faible quantité de silice amorphe.

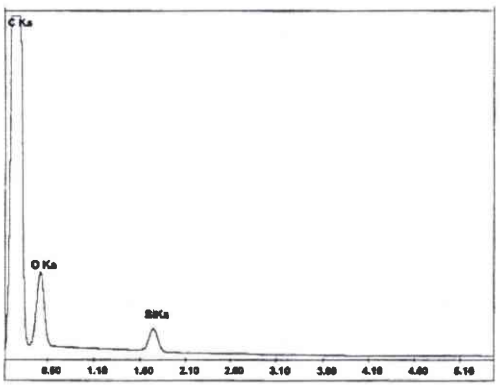
- **Figure E** : Analyse EELS des phosphates. Le rapport L3/L2 > 1 signale la présence de pyrophosphates $P_2O_7^{4-}$.

- **Figures F et G** : Analyses EELS mettant en évidence la présence de C, N, Ca et O

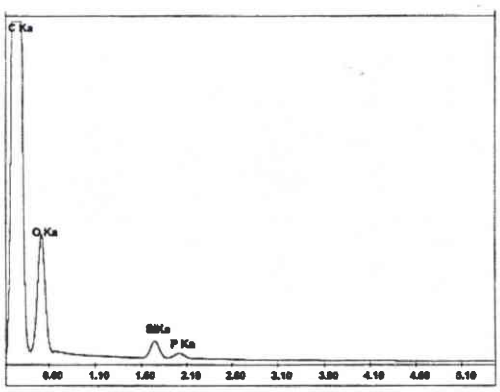
  - **Figure F** : pour le carbone, on distingue l'existence de doubles liaisons C=O et de simples liaisons C-O. Il s'agit donc d'un carbonate de calcium.

  - **Figure G** : rapport N/O mettant en évidence l'abondance d'oxygène et peu d'azote lié à la partie organique de la concrétion.

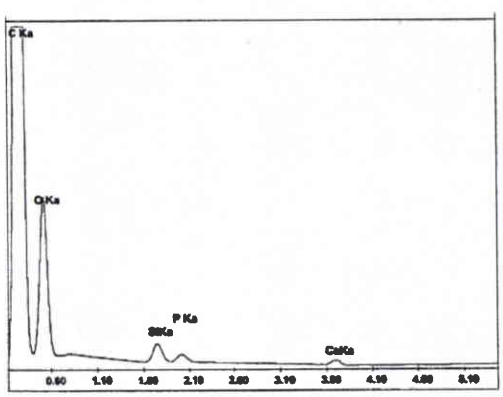
Planche IV$_{39}$



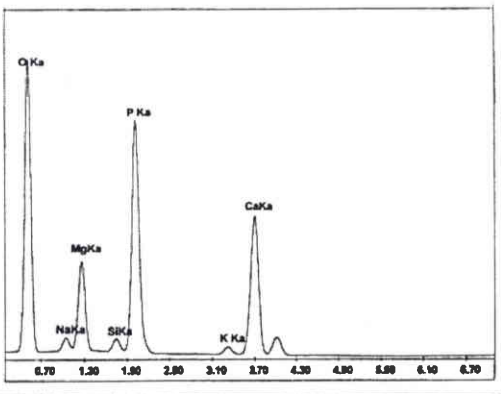
A



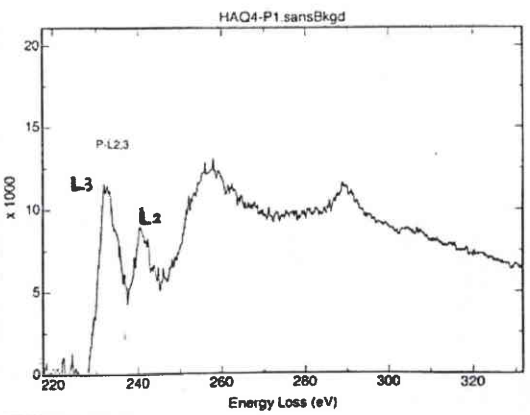
B



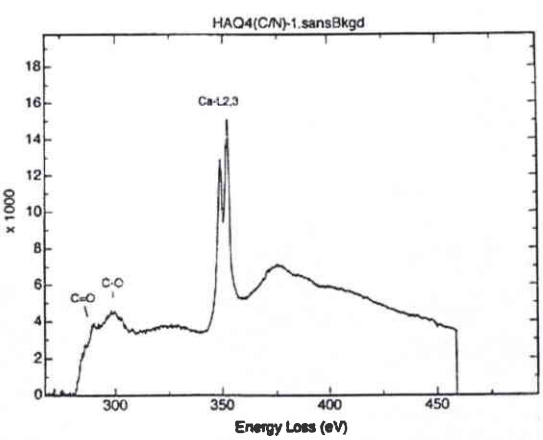
C



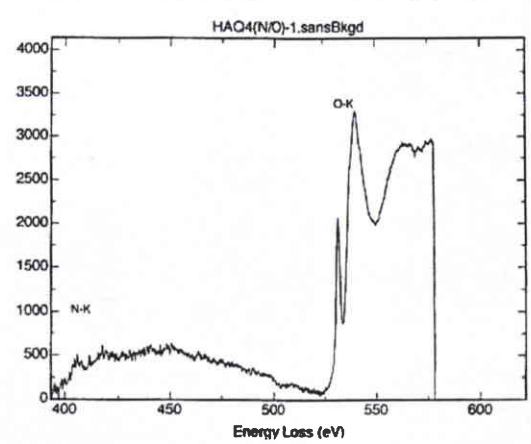
D



E



F



G

Tableau 63 : Eléments détectés par EDX dans le pied. Légendes : +++ : élément très abondant ; ++ : élément abondant ; + : élément présent ; (+) : traces ; - : absence.
Nota : P est confondu avec le pic d'osmium

		Si	Al	S	K	P	Ca	Mg	Na	Fe	Zn	Cu	Cd	Pb	Mn
Cellule du conjonctif pédieux		-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
Poudre de zinc	**Cellule à calcium Couche électrondense**	-	-	-	-	+++	+++	++	-	-	+	-	-	-	-
	Couche non-électrondense	-	-	-	-	+++	+++	++	-	+	+	-	-	-	-
Poudre de plomb (25% dans la nourriture)	**« Pore cells »**	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-	-	++	-
	Mucocytes Grains mucigènes	-	-	+	-	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	Grains électrondenses cytoplasmiques	-	-	-	-	++	++	-	-	(+)	-	-	-	+++	-
Sel de cadmium (444 ppm dans le sol)	**« Pore cells »**	++	-	+++	-	++	++	-	-	-	-	-	+	-	-
	Cellules épithéliales	+	-	++	-	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-

Chapitre VI : Localisation des métaux dans le pied

Comme nous l'avons vu dans l'étude bibliographique, le pied est un organe présentant chez les gastéropodes, la caractéristique de l'existence, dans le conjonctif, de très nombreuses « pore cells » et, en moins grande quantité, de cellules à calcium. La figure 1 (planche IV_{40}) présente une coupe longitudinale du pied d'un individu témoin dont l'épithélium ventral se caractérise par l'abondance des mucocytes. Dans le conjonctif, il y a aussi un réseau de fibres musculaires et des sinus sanguins.

VI.1. Etude histologique du pied chez le témoin et les animaux contaminés par de la poudre de plomb

Après contamination par ajout de poudre de plomb dans la nourriture et coloration au Möller, il y a une réaction positive au niveau des concrétions des deux types cellulaires (planche IV_{40}, figures 2, 3 et 4).

La présence de tissu nerveux dans le fragment de pied fixé a permis de constater l'accumulation de plomb dans les neurocytes (planche IV_{41}, figures 1 à 3). Cette observation fortuite et préliminaire nécessite une étude ultérieure spécifique du système nerveux.

VI.2. Etude par microanalyse de la localisation des métaux dans le pied (tableau 63)

La microanalyse EDX met en évidence, dans certaines cellules du tissu conjonctif du pied, des grains de ferritine (planche IV_{42}, figure 1).

Après contamination par de la poudre de zinc, les concrétions des cellules à calcium du conjonctif présentent, en analyse EDX, les éléments O, P, Ca, Mg et Zn (planche IV_{42}, figures 2 et 3) parfois Fe (planche IV_{42}, figure 4) que ce soit au niveau des couches électrondenses ou non-électrondenses (cliché A x 15.000 et cliché B x 27.500, planche IV_{42}). Les éléments sont associés à de la matière organique dans les couches osmiophiles.

Lors de la contamination avec de la poudre de plomb, l'analyse EDX met en évidence, dans les vacuoles des « pore cells », une présence importante de plomb et peu de calcium (le phosphore est confondu dans le pic d'osmium) (planche IV_{43}, figure 1 et cliché A x 4.700).

Après contamination du sol artificiel par un sel de cadmium (444 ppm), la microanalyse EDX met en évidence, dans les grains électrondenses des « pore cells » du tissu conjonctif pédieux, une richesse en S et Si, moins de P et de Ca et des traces de cadmium (planche IV_{43}, figure 2). Les cellules épithéliales pédieuses présentent les éléments suivants : P, Ca, S, Si et Mg mais pas de cadmium (planche IV_{43}, figure 3).

La recherche de métaux dans les grains de mucigènes des mucocytes pédieux n'est jamais positive que ce soit après contamination par de la poudre de plomb ou des poussières d'aciérie. Les éléments détectés sont P, Ca et S associés à de la matière organique.

Par contre, après contamination par la poudre de plomb mélangé à la nourriture, des grains électrondenses cytoplasmiques contiennent les éléments Pb, P, Ca, Fe associés à de la matière organique (planche IV_{43}, figure 4).

Planche IV_{40} : Histologie des types cellulaires intervenant dans le métabolisme des métaux et localisés dans le tissu conjonctif pédieux. Cellules à calcium et « pore cells » (échelle 10 µm pour les figures 1, 2 et 3 ; 1µm pour la figure 4)

1. **Sole pédieuse d'un animal témoin, coupe à la paraffine, coloration au Möller et au bleu de toluidine (G x 160)**

   L'épithélium ventral est riche en mucocytes alors que l'épithélium dorsal en est dépourvu. Présence de fibres musculaires, de cellules du tissu conjonctif pédieux et de sinus sanguins. Absence de réaction positive au Möller.

2. **Coupe dans le tissu conjonctif pédieux d'un animal contaminé par ajout de poudre de plomb dans la nourriture, coloration au Möller seul (G x 400)**

   Les cellules à calcium du tissu conjonctif (flèche noire) présentent une réaction positive au Möller (présence de plomb). Importance des sinus sanguins. « Pore cells » contenant également des inclusions positives (flèche blanche)

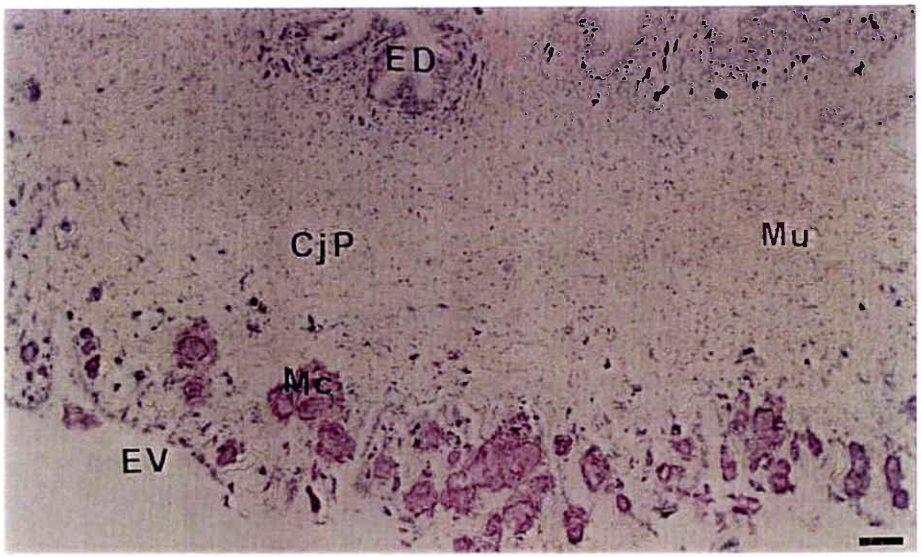
3. **Coupe dans le tissu conjonctif pédieux d'un animal contaminé par ajout de poudre de plomb dans la nourriture, coloration au Möller et au bleu de toluidine (G x 400)**

   Accumulation de plomb dans les cellules à calcium (flèche noire) et dans les « pore cells » (flèches blanches).

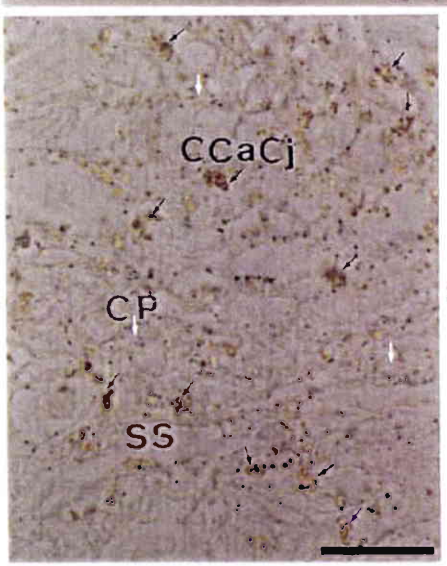
4. **Détail des cellules à calcium et des « pore cells » du tissu conjonctif pédieux d'un animal contaminé par ajout de poudre de plomb dans la nourriture, coloration au Möller et au bleu de toluidine (G x 2.000)**

   Les cellules à calcium et les « pore cells » présentent des réactions positives au Möller. Il y a une coloration nucléaire au bleu de toluidine.

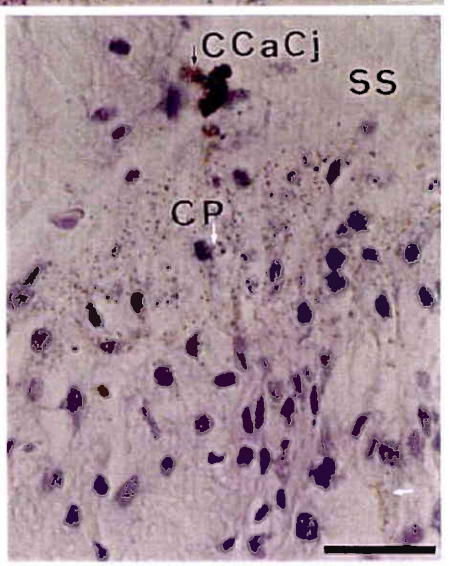
Planche IV$_{40}$



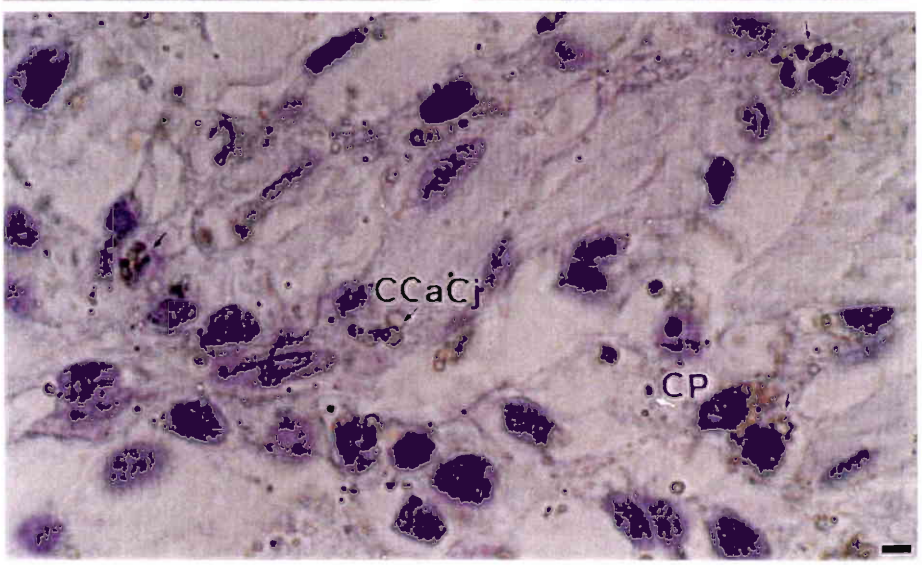
1



2



3



4

Planche IV_{41} : Accumulation de plomb dans le système nerveux. Animal contaminé par ajout de plomb dans la nourriture (échelle 10 µm pour les figures 1 et 2 ; 1 µm pour la figure 3)

1. **Coupe d'un nerf pédieux, coloration au Möller et au bleu de toluidine (G x 160)**

Une capsule conjonctive entoure l'ensemble neurocytes et fibres nerveuses.

2. **Détail des neurocytes, coloration au Möller seul (G x 400)**

Coloration positive de nombreuses vacuoles (système lysosomal) dans le cytoplasme (flèche noire).

3. **Détail de l'accumulation de plomb dans les neurocytes, coloration au Möller et au bleu de toluidine (G x 1.000)**

Planche IV$_{41}$

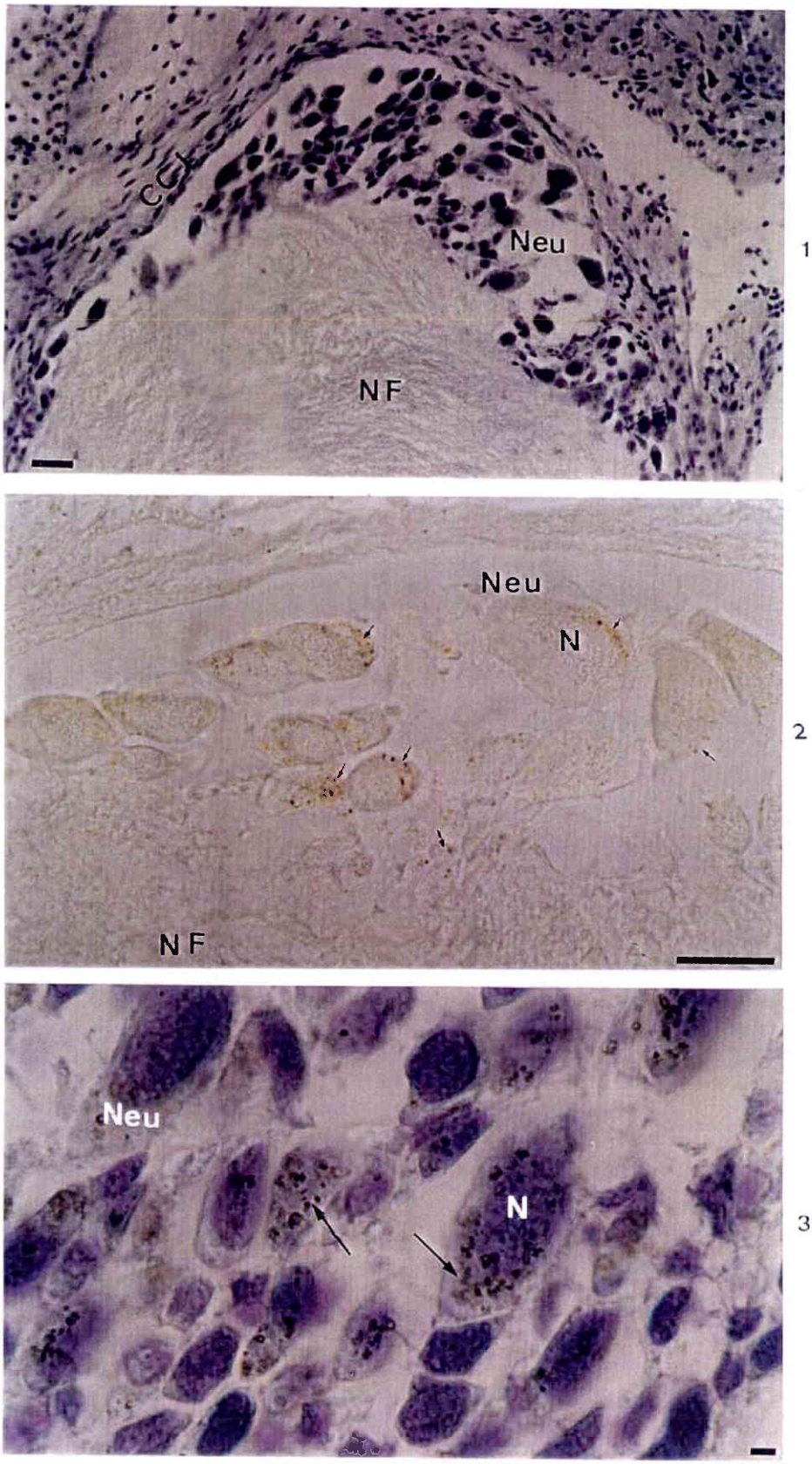


Planche IV_{42} : Microanalyse EDX de la localisation des métaux dans le pied d'*Helix aspersa aspersa* contaminé par de la poudre de zinc

1. **Témoin : Détection de Fe (ferritine) dans cellule du tissu conjonctif du pied**

2. **3 et 4 : Individu contaminé par de la poudre de zinc. P, Ca, Mg, Zn et Fe dans les concrétions des cellules à calcium du conjonctif**

Planche IV$_{42}$

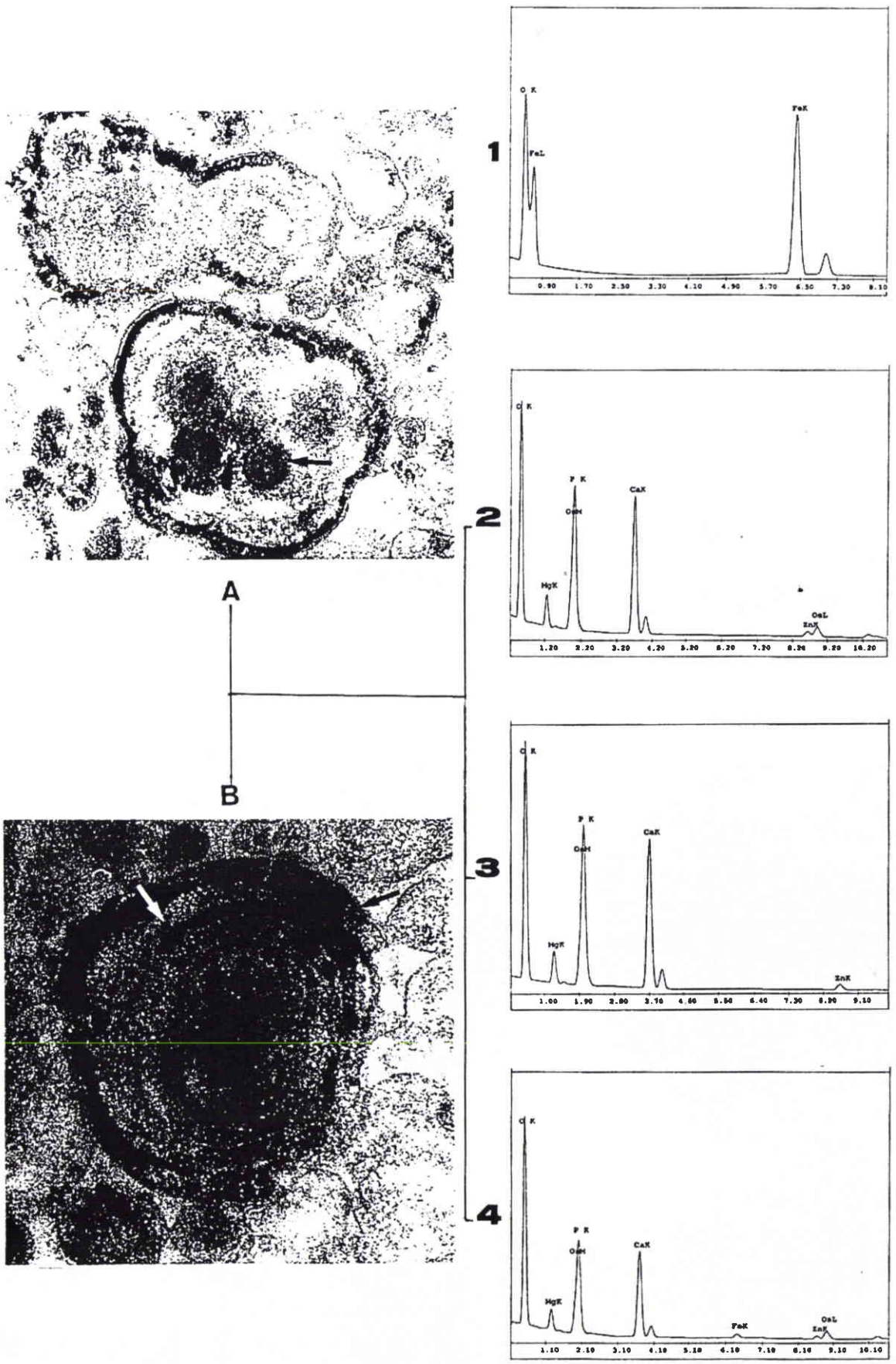
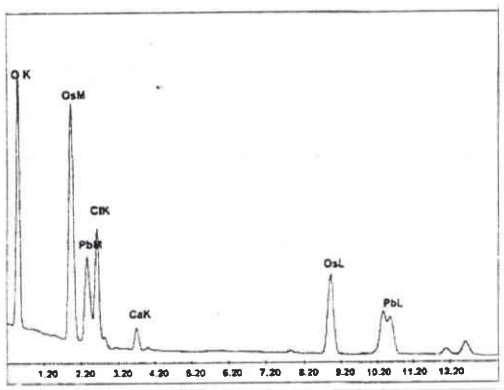
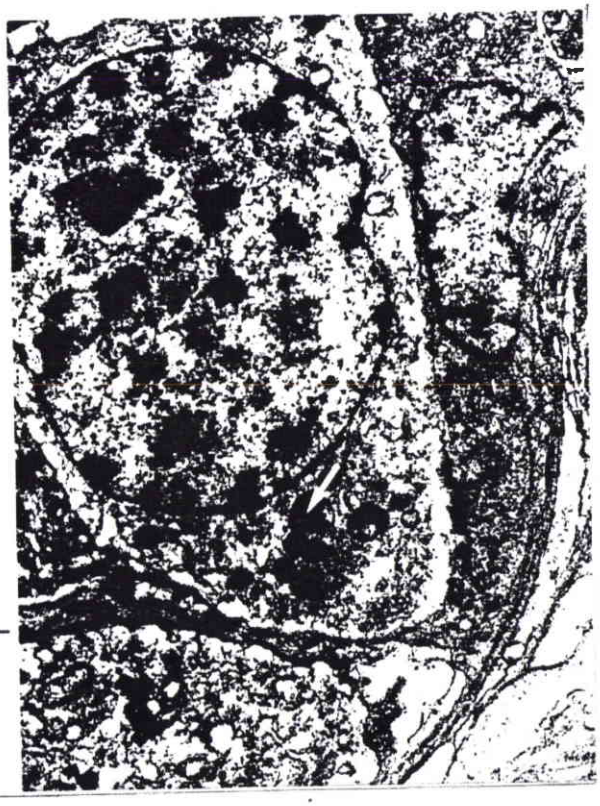


Planche IV_{43} : Microanalyse EDX de la localisation des métaux dans le pied d'*Helix aspersa aspersa* contaminé par de la poudre de plomb (« Pore Cell ») (1) ; par un sel de cadmium : « Pore Cell » (2), cellule épithéliale (3) et mucocyte (4)

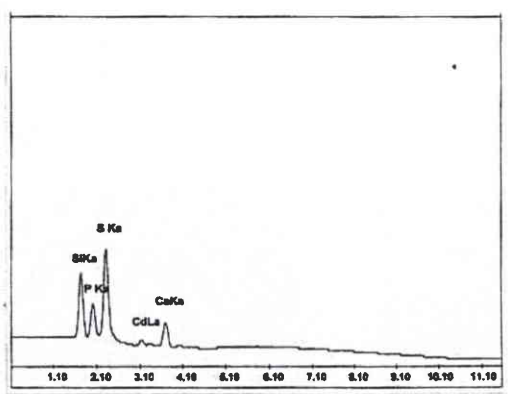
Planche IV$_{43}$



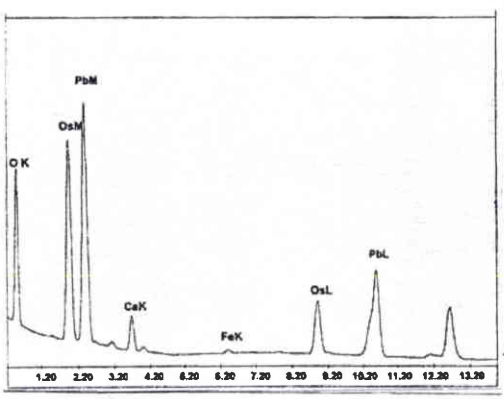
1



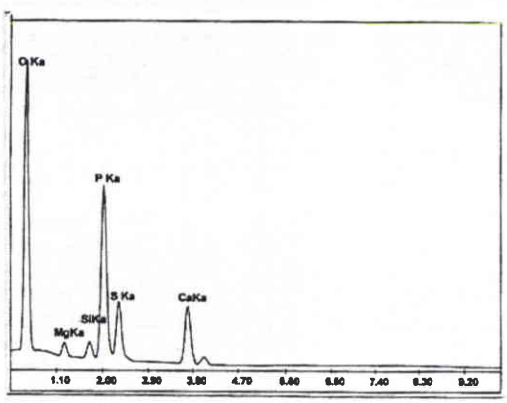
A



2

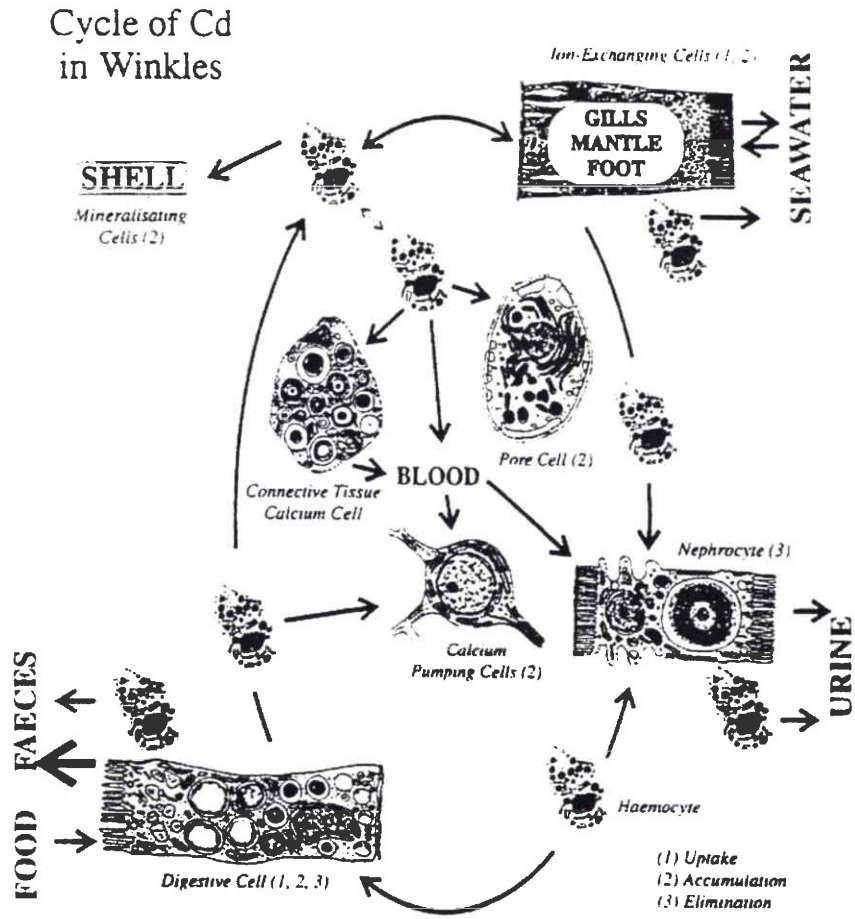


4



3

L'ensemble des données histologiques et microanalytiques obtenu permet de proposer les voies de passage, transport et élimination de la silice et des métaux chez *Helix aspersa aspersa* en adaptant le schéma établi pour les voies de métabolisation du cadmium chez le gastéropode prosobranche marin *Littorina littorea* (Marigomez *et al.*, 1995) aux spécificités des gastéropodes pulmonés terrestres : c'est l'objectif du chapitre VII.



Rappel de la figure 26 : Schéma illustrant la voie de mobilisation du cadmium dans l'ensemble des tissus de *Littorina littorea* avec l'indication des types de cellule impliqués dans l'élimination du métal (modifié de Marigomez *et al.*, 1990 et Nott *et al.*, 1993).

Chapitre VII : Synthèse : Proposition et discussion des voies de passage, transport et élimination de la silice et des métaux.

VII.1. Silice et aluminium

La figure 97 regroupe toutes les observations qui, en microanalyse, ont mis en évidence la présence de silice associée ou non à l'aluminium. Les différentes étapes sont numérotées de 1 à 20.

La voie de pénétration de la silice met en jeu les cellules digestives de la glande digestive avec incorporation, dans les vacuoles, par endocytose[1]. L'évolution est une incorporation dans des vésicules du système lysosomal[2]. Lors de l'emploi d'un sol naturel de référence ou d'un sol artificiel contenant du kaolin, il y a présence simultanée de l'aluminium. La formation de corps résiduel dans la cellule digestive en phase d'excrétion avec expulsion vers la lumière digestive[3] concerne une fraction de la silice. Pour l'autre fraction de la silice, on peut retenir comme hypothèse, le passage vers les hémocytes circulants[4].

Cette présentation est contraire à l'hypothèse de Martoja et Martoja (1973) selon laquelle Si et Al des inclusions brunes (corps résiduels) de la glande digestive ne peuvent provenir d'une absorption de particules de silice, silicates ou silico-aluminates mêlées aux aliments, mais seraient le résultat d'une activité du système lysosomal vers une voie d'excrétion dans la lumière du tube digestif.

Les cellules à calcium de la glande digestive qui possèdent une importante activité d'absorption au pôle apical, présentent de la silice associée aux concrétions[5] et dans le cytoplasme[6] des grains électrondenses renferment de la silice et de l'aluminium. Le devenir de la silice est majoritairement une expulsion dans la lumière du tube digestif[7] en même temps que les concrétions. Les entérohépatocytes de l'intestin antérieur sont actifs dans la prise de silice[8] dont le devenir est le passage vers les hémocytes circulants au pôle basal[9].

La silice et l'aluminium arrivent au rein, transportés par les hémocytes[10]. L'éventualité d'un transport direct par le sang et sans intervention des éléments figurés reste à vérifier.

Le néphrocyte est la cellule spécialisée dans l'élimination finale de la silice et de l'aluminium. En effet, on détecte de la silice, du phosphore et du calcium dans des grains en formation dans le cytoplasme[11] puis dans des vacuoles fusionnant avec la vacuole apicale[12]. Dans cette vacuole, la silice est détectée soit sous forme d'un floculum[13], soit sous la forme de grains[14], soit enfin incorporée dans la concrétion avec alternance de couches minérales non-électrondenses, riches en Si, K, Ca, Mg et Al[15], et de couches électrondenses, riches en matière organique et plus pauvres en Si, K et Ca[16]. Le devenir de la silice et de l'aluminium est une expulsion vers la lumière rénale par libération des concrétions[17], libération des grains de la vacuole[18] et libération des corps résiduels du cytoplasme[19].

Il faut ajouter aux différentes voies d'excrétion de la silice, la possibilité d'une expulsion de la silice et de l'aluminium par passage d'hémocytes dans la lumière de la glande digestive, celle du tube digestif et celle du rein[20].

Le métabolisme de la silice et de l'aluminium chez l'escargot peut être considéré, de même que la synthèse d'acide urique, comme une adaptation à la vie terrestre. De même que les carbonates, les phosphates et les carboxylates, les silicates peuvent jouer le rôle de donneur d'oxygène et incorporer dans les concrétions, résultant d'une biominéralisation, les éléments de la classe A à savoir Mg, K, Ca, Na et Al ainsi que des métaux de transition (Cd, Fe et Zn).

La détection simultanée de la silice et du plomb (métal de la classe B) ne veut pas dire réelle association mais simple juxtaposition temporaire de localisation car l'évolution montre bien une ségrégation différente des éléments.

Le rôle physiologique des silicates vis-à-vis de l'économie d'eau doit être également pris en considération puisque la silice amorphe mise en évidence est seulement faiblement hydratée. Par ailleurs, la présence moindre de calcium dans la concrétion rénale par rapport à la concrétion de la cellule à calcium de la glande digestive représente une économie de cet élément nécessaire à la confection de la coquille.

D'autres auteurs ont mis en évidence la présence de silice chez les gastéropodes marins. C'est le cas chez *Littorina littorea* (Marigomez *et al.*, 1990), dans les lysosomes du manteau en association avec du calcium et du magnésium ainsi que dans les lysosomes de la cellule rénale avec P, K et Cl. Par contre, les concrétions rénales de *Littorina littorea* sont formées de phosphate de calcium. Le cas de l'escargot *Helix aspersa aspersa* est donc tout à fait original avec une évolution adaptative à la vie terrestre. Même si les concrétions sont différentes par leur morphologie, nous avons montré, chez *Helix pomatia*, une composition chimique identique à celle décrite chez *Helix aspersa aspersa*.

La seule étude exhaustive sur l'accumulation de Si et Al chez les gastéropodes terrestres, marin ou d'eau douce est celles de Martoja et Martoja (1973) qui ont recherché si le silicium et l'aluminium, éléments constants de la matière vivante à rôle physiologique inconnu, s'accumulent dans certains tissus comme cela avait été démontré dans le système macrophagique du foie d'un amphibien.(Truchet et Martoja, 1973).

Les tableaux 64 et 65 donnent les résultats obtenus par les auteurs en spectrographie de rayons X à la microsonde de Castaing sur coupe à la paraffine de 7µm d'épaisseur et pour comparaison la synthèse de l'ensemble des résultats obtenus dans le présent travail.

La présente étude met en évidence la présence de silice en faible quantité dans les deux types cellulaires de la glande digestive (cellule à calcium et cellule digestive) de *Helix aspersa aspersa* non mentionnée par Martoja et Martoja (1973) chez la même espèce ceci peut s'expliquer par la différence de technique de préparation de l'échantillon à savoir l'inclusion à la paraffine. Les données supplémentaires obtenues sur le rein, dans la présente étude, sont fondamentales en ce qui concerne la silice présente avec le fer et le zinc (cations vitaux) dans les concrétions ou, de manière transitoire, avec le plomb dans les grains intra-cytoplasmiques ou intra-vacuolaires.

La présence simultanée de Si et Al dans les mélanocytes du tissu conjonctif de l'escargot terrestre *Pomatias elegans* conforte l'hypothèse formulée chez *Helix aspersa aspersa* d'un transport par les hémocytes évoluant en macrophages. Des études sont en cours pour évaluer la contribution des hémocytes dans le transport de Si et Al mais aussi des métaux lourds ainsi que leur élimination au niveau du rein.

Dans une revue sur la bioaccumulation des métaux, Martoja et Martoja (1984) signalent une bioaccumulation naturelle de silicium chez les mollusques : d'une part, dans les cellules en relation avec le milieu extérieur (incorporation à la denture en faible quantité : Ca, Fe et Si ; lame basale en faible quantité : (Al, Si, Ca, Fe, Cu, Br, Zn, Mo, Ag et Cd) d'autre part, dans la matrice extracellulaire (sphérocristaux calcaires en faible quantité : Ca, Mn, Zn, Mg, Si et Fe). Pour les autres groupes zoologiques et en bioaccumulation naturelle, les auteurs citent les Spongiaires avec l'endosquelette siliceux et les Vertébrés avec Si pouvant être abondant dans les vacuoles digestives (Mg, Al, Si, K, Ca, Ti et Fe) ou en faible quantité dans les lysosomes des cellules en contact avec le milieu intérieur (Fe, Mg, Al, Si, Mn et Cu). En cas de bioaccumulation induite, les auteurs citent chez les Mollusques et les Vertébrés, la présence de Si associé à Be, Al, Ti, Cr, Fe et Pb dans les vacuoles digestives des cellules ayant des échangent avec le milieu extérieur.

En fonction des données actuelles, il apparaît que la silice soit présente dans la glande digestive chez les gastéropodes terrestres et absente chez les gastéropodes aquatiques dulçaquicoles ou marins.

Le problème du transfert dans les chaînes alimentaires des métaux incorporés dans les concrétions de silice peut également être discuté car la nature non digestible de celles-ci ne permet probablement pas la biodisponibilité ultérieure des éléments potentiellement toxiques comme le cadmium et le zinc.

Tableau 64 : Localisations des éléments chez des gastéropodes terrestres et aquatiques selon Martoja et Martoja (1973) et comparaison avec les résultats du présent travail
Légendes : 0 : absence ; (+) : présence faible ; ++ présence abondante ; nd : non déterminé

Martoja et Martoja (1973)		Al	Si	Ca	Mg	K	Fe	Zn	Mn	Cu	P	O	S	Pb	C	N
Escargot terrestre pulmoné, *Helix aspersa aspersa*	Inclusions brunes (cellules excrétrices de la glande digestive)	+	0	+	+	0	0	0	0	0	+	nd	nd	nd	nd	nd
Escargot terrestre prosobranche, *Pomatias elegans*	Sphérocristaux (cellule à calcium de la glande digestive)	0	0	+	+	+	+	+	+	0	+	nd	nd	nd	nd	nd
	Inclusions brunes (cellules excrétrices)	+	+	+	0	0	+	0	0	0	+	nd	nd	nd	nd	nd
	Sphérocristaux (cellules à calcium)	0	0	+	+	0	+	+	0	0	+	nd	nd	nd	nd	nd
	Mélanocytes du tissu conjonctif	+	+	+	0	0	+	+	0	0	+	nd	nd	nd	nd	nd
Escargot aquatique prosobranche d'eau douce, *Bithynia tentaculata*	Inclusions pigmentées de la glande digestive	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	nd	nd	nd	nd	nd
Prosobranche marin, *Nassarius reticulatus*	Cellules coniques de la glande digestive	0	0	+	0	0	+	0	0	0	+	nd	nd	nd	nd	nd
Opisthobranche marin, *Aplysia*	Sphérocristaux de la cellule à calcium	0	0	+	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	Inclusions brunes de la glande digestive	+	0	+	nd	nd	+	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

Présent travail		Al	Si	Ca	Mg	K	Fe	Zn	Mn	Cu	P	O	S	Pb	C	N
Glande digestive	C. digestive -Vacuole	+	(+)	+	0	0	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+
	C. calcium-concrétions	0	(+)	++	+	+	+	+	0	+	++	+	0	+	0	0
Rein	Concrétions	+	++	+	+	+	+	+	0	0	0	+	+	0	+	+
	Grains cytoplasmiques de polyphosphates	0	+	+	+	+	0	+	0	+	+	+	0	+	0	0
	Corps résiduels	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+	+	0	+	0	0

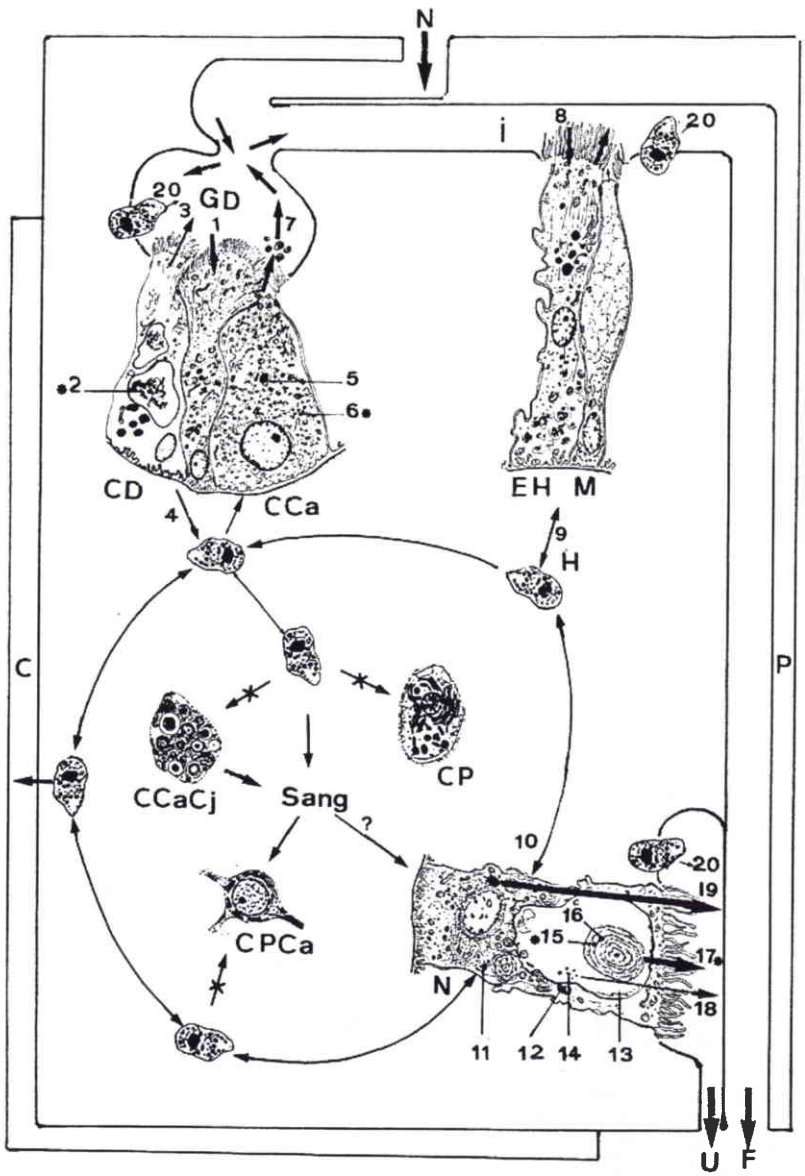


Figure 97 :Schéma illustrant les voies de passage, transport et élimination de Si et Al dans l'organisme de *Helix aspersa aspersa*. C : Coquille ; P : Pied ; N : Pénétration de Si et Al avec la nourriture ; Cellules digestives (CD) et cellules à calcium (Cca) de la glande digestive (GD) ; Entérohépatocyte (EH) et mucocyte (M) de l'intestin proximal ; H : Hémocyanines circulants ; N : Néphrocyte ; F : Elimination par les fécès ; U : Elimination par les urines. Les cellules à calcium du conjonctif (CCaCj), les cellules à pores (CP) et les cellules nerveuses (CPCa) ne semblent pas participer au métabolisme de Si et Al.

VII.2. Plomb, fer, cuivre, zinc et manganèse

La figure 98 regroupe toutes les observations qui, en microanalyse X, ont mis en évidence la présence de plomb associé préférentiellement à certains éléments.

Le plomb particulaire pénètre dans les cellules digestives de la glande digestive et est détecté dans les phagolysosomes, associé à des matières organiques riches en P et S[1]. Le devenir du plomb est, soit une expulsion avec les corps résiduels[2], soit un passage dans le sang et transport probable par les hémocytes[3]. D'autres métaux tels que Fe, Cu et Zn sont détectés.

Les concrétions des cellules à calcium incorporent du plomb dans la matrice minérale constituée majoritairement de phosphate de calcium, de magnésium, de potassium et de sodium (P, Ca, Mg, K et Na). La présence simultanée de S n'est jamais détectée. D'autres métaux tels que Fe, Cu, Zn et Mn sont souvent associés[4]. Il y a donc absorption de métaux par le pole apical[5a] puis le devenir est en grande partie une expulsion vers la lumière du tube digestif[5b] en même temps que les concrétions, par sécrétion apocrine ou holocrine de la cellule à calcium en phase d'excrétion. Ceci est conforme aux observations de Marigomez *et al.* (1986a et b) chez *Arion ater*. L'homéostasie de certains métaux essentiels est ainsi assurée, en partie, par leur incorporation dans les concrétions de la cellule à calcium. En ce qui concerne le cuivre, il faut noter que Martoja et Martoja (1973) ne signalent pas sa présence ni dans les inclusions brunes de la cellule digestive (corps résiduels), ni dans les concrétions de la cellule à calcium.

Les entérohépatocytes de l'intestin proximal présentent une incorporation de plomb au pôle apical[6] et sa concentration dans les hétérophagolysosomes du pôle basal[7] en présence de P et Ca mais en l'absence de S. Le zinc et le fer peuvent suivre la même voie et dans le cas du zinc, on détecte simultanément S. Le devenir des métaux est très probablement un passage dans le sang avec prise en charge par les hémocytes[8]. Le plomb et les autres métaux arrivent au rein [9] transportés par les hémocytes (granulocytes et macrophages). La fraction éventuellement véhiculée directement par le sang, autrement que par les éléments figurés, reste à déterminer.

Le néphrocyte présente une compartimentation très nette du plomb qui n'est jamais incorporé dans la concrétion riche en silicates de la vacuole apicale bien qu'il soit, d'une part, souvent détecté, dans le cytoplasme, en association avec P, Ca et Si[10] et que, d'autre part, il soit encore présent simultanément avec Si[11], dans des grains en cours de formation dans la vacuole. Il y a donc une évolution des grains de polyphosphates dans le liquide vacuolaire avec une redistribution des éléments (phosphates de calcium, plomb et silicates). Le devenir du plomb du néphrocyte est une libération dans la lumière rénale soit par exocytose de corps résiduels[12] soit par expulsion des grains intravacuolaires lorsque l'apex du néphrocyte se déchire (mésocrinie ou holocrinie)[13]. Les métaux, cuivre et zinc, sont détectés également dans le cytoplasme du néphrocyte associés à P et Ca. Leur devenir est une expulsion vers la lumière urinaire[12].

Contrairement au plomb, du zinc et du fer sont également détectés dans les concrétions, parfois en même temps que S ; dans ce cas, l'expulsion de la concrétion entraîne celle des deux métaux[18*]. Le zinc et le fer ne sont pas localisés dans les couches électrondenses riches en matière organique mais dans les couches non électrondenses riches en Si. Le zinc et le fer étant des métaux de transition, on peut émettre l'hypothèse que les silicates peuvent les complexer comme le font les phosphates chez la Littorine (Marigomez *et al.*, 1990). L'évaluation des chlorures est difficile à appréhender dans les analyses réalisées du fait de sa présence en grande quantité dans la résine. Cependant, il faut en tenir compte dans le bilan de l'excrétion. Les cellules du canal urinaire absorbent du plomb[14] dont le devenir est vraisemblablement un passage vers le sang avec une prise en charge par les hémocytes[15].

Les cellules à calcium des tissus conjonctifs péri-intestinaux, péri-glande digestive, péri-rénaux et pédieux jouent un rôle important dans le stockage du plomb[16]. Il faut également retenir la possibilité, pour les hémocytes, de traverser les épithéliums de la glande digestive, de l'intestin et du rein avec élimination d'une certaine charge en métaux avec les fécès et l'urine[17].

Une observation a montré, par ailleurs, la possibilité d'absorption de plomb par certaines cellules nerveuses[19]. Une faible proportion de plomb est également excrétée en même temps que le mucus[20] mais pas dans le mucus des glandes pédieuses.

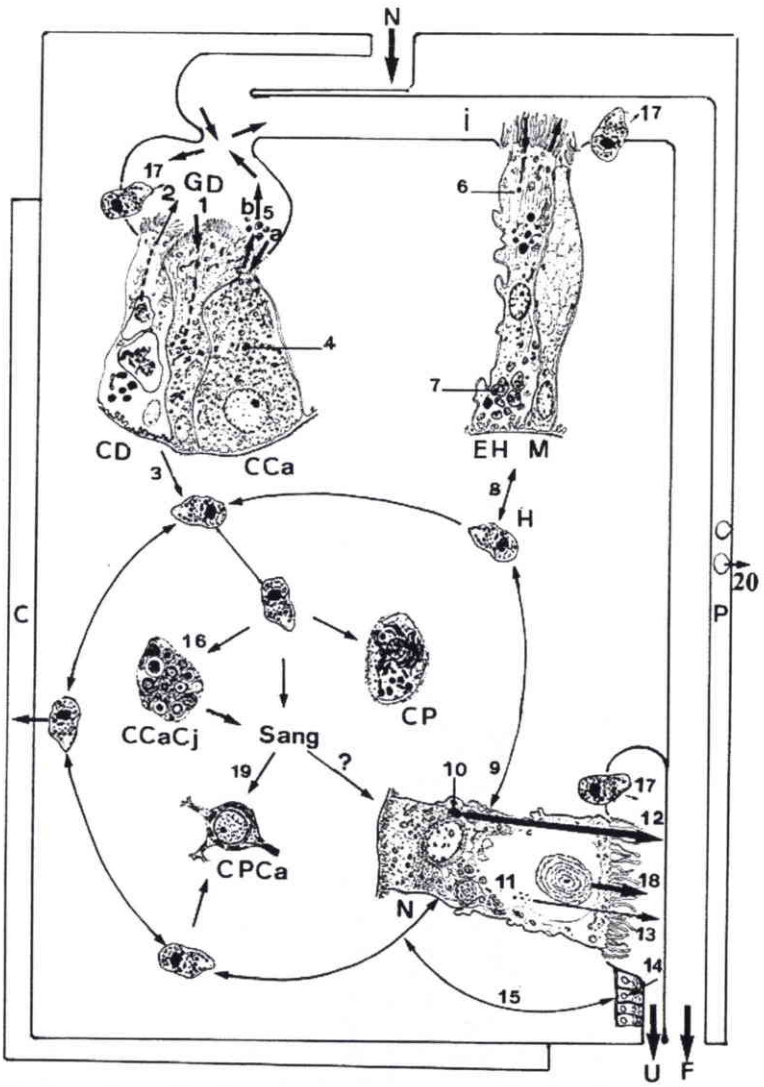


Figure 98 :Schéma illustrant les voies de passage, transport et élimination de Pb, Fe, Cu, Zn et Mn dans l'organisme de *Helix aspersa aspersa*. C : Coquille ; P : Pied ; N : Pénétration des métaux avec la nourriture ; Cellules digestives (CD) et cellules à calcium (Cca) de la glande digestive (GD) ; Entérohépatocyte (EH) et mucocyte (M) de l'intestin proximal ; H : Hémocytes circulants ; N : Néphrocyte ; F : Elimination par les fécès ; U : Elimination par les urines. CcaCj : Cellules à calcium du conjonctif ; CP : Cellules à pores ; CPCa : Cellules nerveuses.

Selon Martoja et Martoja (1984), en dehors de toute contamination, le métabolisme normal des enzymes et des pigments respiratoires comporte une phase de dégradation qui peut aboutir, chez les invertébrés, à une accumulation de métal. Il en est ainsi du zinc inclus dans les sphérocristaux des bivalves d'eau douce et du cuivre chez les gastéropodes. Par exemple, le Murex de méditerranée stocke le cuivre dans ses viscères sous forme de sulfures à une teneur pouvant atteindre 400 $\mu g.g^{-1}$. Selon ces auteurs, cette accumulation naturelle de sulfures de cuivre intervient lors d'une contamination accidentelle par des complexes cuivriques. Des huîtres, espèce très résistante au cuivre et au zinc, dans des estuaires très contaminés, accumulent jusqu'à 13.000 $\mu g.g^{-1}$ de zinc et 25.000 $\mu g.g^{-1}$ de cuivre.

Chez les mollusques, ces auteurs citent des bioaccumulations dans les sphérocristaux des cellules en relation avec le milieu extérieur de cuivre et de zinc associés à des complexes Mg, K, Ca, Mn, Fe, Zn, Cu (en milieu contaminé : Ti, Cr et Pb), ainsi que dans la lame basale des ces épithéliums. Zn et Cu sont également présents dans les sphérocristaux des cellules en contact seulement avec le milieu intérieur (K, Ca, Mg). En association également avec d'autres complexes dans les vacuoles des cellules digestives (Mg, Al, Si, K, Ca, Ti, Fe, Cu, Zn, Mo et Ag). Enfin, à titre naturel, dans les métallothionéines à cuivre et zinc qui peuvent complexer en cas de contamination du milieu Ag, Cd, Au et Hg.

Nous retrouvons chez *Helix aspersa aspersa* les mêmes éléments prédominants dans les sphérocristaux phosphocalciques des cellules à calcium de la glande digestive avec, en supplément, le plomb chez les animaux recevant une nourriture contaminée par le plomb.

Il en est de même pour les vacuoles digestives des cellules digestives de la glande digestive.

Nos observations rejoignent également celles de Marigomez *et al.* (1986a et b) selon lesquelles, les cellules à calcium jouent un rôle dans la prise en charge des métaux chez *Arion ater*. Ces auteurs émettent l'hypothèse que le cuivre pourrait pénétrer, au niveau du pôle apical, des cellules à calcium par endocytose puis s'accumuler dans les concrétions de calcium.

Enfin, ces granules seraient éliminés des cellules à calcium par sécrétion apoholocrine dans les fécès.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES :

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Conclusion

L'objectif affiché en début de recherche, à savoir la concrétisation de l'emploi des gastéropodes terrestres comme bioindicateurs de la contamination polymétallique, nécessitait, pour être atteint, la convergence de facteurs favorables. Parmi ceux-ci, il faut souligner la participation volontaire et efficace des héliciculteurs du GNPE. La mise à disposition d'animaux d'élevage et d'échantillons d'aliments d'origine et de composition variées à permis d'établir l'existence ou non de corrélations entre les concentrations en métaux dans les aliments (Cu, Fe, Mn, Zn, Cd, Cr, Ni, Pb) et celles dans l'organisme, en distinguant le pied et la masse viscérale. Ces études ont permis d'établir une première grille d'évaluation de la contamination métallique en retenant la concentration en métal dans les viscères. Cette grille définit 4 classes pour les 8 métaux ; un indice de contamination polymétallique (ICPM ou IPM) est obtenu par sommation des différentes classes obtenues en fonction de chaque métal pour un lot donné. Les capacités, chez *Helix aspersa aspersa*, de macro, micro et de déconcentration des métaux ont été discutées par référence aux concentrations atteintes dans les viscères.

Ce premier screening et la connaissance de phénomènes de toxicité aiguë survenant dans certains élevages ont motivé la réalisation d'une expérience spécifique permettant de comparer les niveaux de bioaccumulation atteints par des escargots produits selon des protocoles d'élevage différents (Hors sol, parc, nourriture supplémentée ou non en CMV).

Cette expérience a permis de définir les conditions d'obtention d'animaux d'élevage dont la majorité des concentrations en métaux se situe en classe I. Ceci était indispensable au lancement de protocoles de biosurveillance active avec transfert sur site et en microcosme de lots dont l'absence de contamination métallique à t_0 permet de détecter toute modification après un temps de séjour qui a été fixé à un mois. Cette durée s'est avérée un bon compromis (même réduite à 8 jours en environnement autoroutier) entre le niveau de bioaccumulation atteint, le risque de vandalisme qui existe toujours même sur un site surveillé et la lourdeur de logistique à mettre en œuvre pendant la durée du transfert.

La diversité des sites (proximité autoroutière, trafic urbain, ancienne mine de cuivre, centre d'enfouissement technique et suivi de sa remédiation, site d'aciérie électrique) avec les études des gastéropodes autochtones et des *Helix aspersa aspersa* transférés à permis de valider la grille de qualité et de la préciser par adjonction d'une cinquième classe pour Fe, Zn, Cr et Pb en référence aux données acquises sur le site d'une aciérie électrique plus particulièrement au niveau du parc à cendre.

Tableau 65 : Proposition de grille de contamination pour les viscères de *Helix aspersa aspersa* pour Cu, Mn, Ni, Cd, Fe, Zn, Pb et Cr en mg/kg de MS en fonction des résultats des différentes expérimentations présentées dans ce travail

	I	II	III	IV	V
Cuivre	Cu≤130	130<Cu≤200	200<Cu≤300	Cu>300	
Manganèse	Mn≤100	100<Mn≤200	200<Mn≤400	Mn>400	
Nickel	Ni≤3	3<Ni≤6	12<Ni≤12	Ni>12	
Cadmium	Cd≤5	5<Cd≤10	10<Cd≤50	50<Cd>50	
Fer	Fe≤100	100<Fe≤200	200<Fe≤600	600<Fe≤1200	Fe>1200
Zinc	Zn≤150	150<Zn≤300	300<Zn≤600	600<Zn≤1200	Zn>1200
Plomb	Pb≤5	5<Pb≤10	10<Pb≤50	50<Pb≤250	Pb>250
Chrome	Cr≤0,6	0,6<Cr≤1,8	1,8<Cr≤5,4	5,4<Cr≤5,4	Cr>6,2

L'intérêt, chaque fois que cela est possible, de l'étude des gastéropodes autochtones a été souligné. La large répartition géographique de *Helix aspersa aspersa* milite en faveur du choix de cette espèce. Cependant il a été mis en évidence la possibilité de retenir *Cepaea nemoralis* qui, pour un même site, donne une information équivalente globalement à celle d'*Helix aspersa aspersa*. Cette dernière espèce s'est avérée plus performante que *Helix aspersa maxima* vis-à-vis de la bioindication du cuivre et du zinc. *Helix pomatia* ne présente pas le même intérêt mais la comparaison du niveau de contamination entre deux stations reste possible en se référant à la grille établie pour *Helix aspersa aspersa*. En région plus aride, *Pseudotachea splendida* peut également être retenue comme espèce bioindicatrice.

Dans le cadre de la biosurveillance active et compte tenu de la supériorité de surface de biotope prospectée par les individus autochtones ainsi que de la période de séjour sur le site plus longue, il a été proposé de retenir le diagnostic fourni par le lot autochtone, s'il est plus défavorable que celui fourni par le lot d'*Helix aspersa aspersa* transféré.

La contention des animaux transférés dans un microcosme est indispensable mais, compte tenu de l'hétérogénéité de certains sites industriels, il est particulièrement difficile de proposer une méthodologie satisfaisante pour tous les cas susceptibles d'être rencontrés. Il est cependant prudent de vérifier une éventuelle adaptation à la présence de métaux lourds.

La connaissance du bruit de fond pédogéochimique en métaux du site prospecté est un problème difficile à résoudre. Pour le plomb, l'étude des rapports isotopiques entre ^{206}Pb, ^{207}Pb et ^{208}Pb s'est avérée comme prometteuse avec l'existence de trois pôles : un pôle « essence-trafic », un pôle « croûte terrestre » et un pôle « industrie ».

Lors de l'étude histologique et par microanalyse, compte tenu des données bibliographiques, trois organes ont été retenus : la glande digestive, l'intestin antérieur et le rein ainsi que le conjonctif périphérique à ces organes et renfermant les cellules à pores et les cellules à calcium du conjonctif. L'étude ultrastructurale originale du néphrocyte à différents stades de vieillissement a mis en évidence l'existence d'un réticulum ondulé très développé et celle de concrétions rénales majoritairement constituées de silice amorphe, de guanine et de composés organiques provenant de la dégradation des bases puriques. La microanalyse a permis une identification et une localisation cellulaire des éléments majeurs, des métaux traces et de certaines substances organiques. Un schéma global d'absorption de circulation et d'élimination a pu être proposé pour Si, Al, Pb, Fe, Cu, Zn et Mn. L'importance des processus de biominéralisation chez les gastéropodes a été soulignée en liaison avec le métabolisme particulier et connu du calcium (présence de pyrophosphates de calcium) ainsi qu'avec le métabolisme de la silice, non connu jusqu'ici et présent avec cette importance ; l'aluminium suivant la même voie métabolique. La ségrégation des métaux en fonction de leur appartenance à la classe A, de transition ou B a été décrite. Les études ultrastructurales et microanalytiques ont permis d'expliquer la capacité de bioaccumulation des gastéropodes. L'expulsion de concrétions issues de la biominéralisation dans les cellules à calcium de la glande digestive ou dans les néphrocytes doit être considérée comme un processus de décontamination par l'organisme. Par ailleurs, en accord avec Nott et Nicolaidou (1990), le piégeage des métaux dans les concrétions, peut être considéré vraisemblablement comme un blocage de leur biodisponibilité pour les organismes situés au-dessus dans la chaîne alimentaire (Carabidés, oiseaux).

Perspectives

Cette étude s'intègre à un ensemble de recherches en cours de développement aussi bien à l'Université de Franche-Comté qu'à l'Université de Metz avec le concours de partenaires industriels. Les objectifs visés relèvent de la recherche fondamentale et de la recherche appliquée.

En ce qui concerne la recherche appliquée, les objectifs, désormais accessibles, sont :

1. L'établissement d'un test de croissance *in situ* en microcosme avec définition d'une méthodologie précisant la qualité, la quantité de nourriture disponible et permettant l'enregistrement en continu des paramètres du milieu influençant l'activité des escargots (température, humidité). Ces tests doivent également permettre de faire la part de la contamination apportée par le sol de celle liée à l'alimentation. Ce test de croissance « *in situ* » devra être toujours associé à une évaluation du niveau de contamination par bioaccumulation.
2. L'intégration des gastéropodes parmi les organismes retenus pour la constitution d'une banque d'échantillon ou « Ecothèque » de l'environnement et de la chaîne alimentaire puisque l'escargot donne lieu à une activité de production pour l'alimentation humaine.

   L'adjonction des gastéropodes aux organismes déjà retenus dans le réseau allemand en écosystème terrestres (Paulus *et al.*, 1996) à savoir pour les végétaux : Epicéa, Pin, Hêtre, Peuplier, et pour les animaux : Ver de terre, Pigeon, certains organes du Chevreuil, permettrait une connaissance de l'interface Sol/Végétaux/Atmosphère une fois établie par la recherche fondamentale, la capacité de l'escargot ,à permettre une évaluation du risque environnemental lié à la présence d'éléments traces métalliques (présente étude) et de composés organiques xénobiotiques en aérosols (Ismert, 2000).

   Par ailleurs, dans l'objectif de la création d'une Ecothèque qui ne peut être que nationale, voire européenne, il conviendrait de poursuivre l'étude de lots de gastéropodes provenant d'un nombre de sites plus important afin de vérifier la pertinence des classes de contamination proposées dans la présente étude.

3. Dans l'objectif d'une amélioration en qualité et quantité de la production hélicicole, il convient de préciser les facteurs de mortalité grâce à un plan expérimental permettant d'évaluer la part prise par chacun des facteurs suspecté actuellement de contribuer aux pertes importantes subies épisodiquement chez les héliciculteurs, promoteurs de l'étude (infections bactériennes étudiées à l'Ecole Vétérinaire de Lyon et toxicité des métaux traces provenant soit de l'environnement soit même des compléments à la formulation alimentaire, étudiée à l'université de Metz).

En ce qui concerne la recherche fondamentale :

Certains objectifs demeurent à atteindre tels que, en ce qui concerne les thématiques directement liées à la présente étude :

a. L'étude spécifique du rôle des hémocytes dans le transport des éléments traces des organes d'absorption (tractus digestif, épiderme) vers les organes de détoxification (cellules spécialisées du tissu conjonctif, rein) ainsi que leur libération directe à travers les tissus vers le milieu extérieur. Il convient également de quantifier la fraction présente dans l'hémolymphe et celle présente dans les hémocytes.

b. L'étude spécifique du métabolisme de la silice et de la structure fine des concrétions rénales afin de mieux comprendre l'intrication (liaison ou juxtaposition) des constituants minéraux et organiques et évaluer le rôle joué par la silice, d'une part dans l'économie d'eau et de calcium et, d'autre part dans le transport et l'excrétion de l'aluminium.

c. L'étude du type et du cycle cellulaire des néphrocytes rénaux en fonction des phases biologiques à savoir : type de sécrétion du néphrocyte (holocrinie ou apocrinie) ; synchronisme des phases cellulaires dans l'épithélium rénal ; régénération éventuellement totale de la structure rénale après estivation ou hivernation.

d. L'étude spécifique des différents segments du tractus digestif et leur rôle respectif dans l'absorption, la bioaccumulation et l'élimination des métaux. Dans la présente étude, seuls la glande digestive et l'intestin antérieur ont été retenus. Il convient ultérieurement d'étudier le rôle des glandes salivaires, de l'estomac, de l'intestin postérieur vis-à-vis du métabolisme des métaux.

e. L'étude de la bioaccumulation de certains métaux non retenus lors de la présente étude par exemple Ag, Hg et Pt. Une étude spécifique des HAP et des radionucléides reste également à développer dans le cadre d'une étude environnementale globale.

f. La recherche des différences anatomiques et physiologiques entre les différentes espèces de gastéropodes pouvant expliquer leur capacité différente vis-à-vis de la bioconcentration des métaux

g. L'étude de l'acquisition de capacités de résistance et d'adaptation des gastéropodes en réponse à un environnement contaminé par des éléments traces.

D'autres études doivent également concerner la capacité de certains organes des escargots a être utilisés comme support de biomarqueurs de la pollution atmosphérique. Ismert (2000) a, par exemple, mis en évidence, dans la glande digestive de *Helix aspersa aspersa*, une corrélation positive entre les teneurs en oxydes d'azote atmosphérique et les activités GST. De même, les activités CYP du rein d'*Helix aspersa aspersa* paraissent prometteuses pour une utilisation en tant que biomarqueurs de la pollution atmosphérique par les HAP". Des études en biologie moléculaire devraient également faire progresser les connaissances fondamentales et permettre de nouvelles applications.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABOLINS – KROGIS A., 1960. The histochemistry of the hepatopancreas of *Helix pomatia* (L.) in the relation to the regeneration of the schell. Arkiv für Zoologie, 13, 159-201.

ADEWUNMI C. O., BECKER W., KUEHNAST O., OLUWOLE F., DÖRFLER G., 1996. Accumulation of copper, lead and cadmium in freshwater snails in southwestern Nigeria. The Sci. Total Environ., 193, 69-73.

AHRLAND S., CHATT J., DAVIES N. R., 1958. The relative affinities of ligand atoms for acceptor molecules and ions. Q. Rev. chem. Soc., 12, 265-276.

AMIARD J. C., AMIARD-TRIQUET C., BERTHET B., METAYER C., 1986. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, lead, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis*. I. Field Study, Mar. Biol., 90, 425-431.

ANDREWS E. B., 1976. The ultrastructure of the heart and kidney of the pilid gastropod mollusc *Marisa cornuarietis* with special reference to filtration throuhout the Architenioglossa. J. Ecol., 179, 85-106.

ANDREWS E. B., 1979. Fine structure in relation to function in the excretory system of two species of *Viviparus*. J. Moll. Stud., 45, 186-206.

ANGULO E., MOYA J., 1984. Histochemical investigation on the kidney of a slug, *Arion ater* (Linné, 1758) (Mollusca, pulmonata). Cuad. Invest. Biol., 6, 45-52.

ANGULO E., MOYA J., 1985. Subsurface cistern in the nephrocytes of the slug, *Arion ater* (Linne, 1758) (Mollusca, Pulmonata). Archiv. Anat. micr. Morphol. expér., 74, 2, 107-110.

ANGULO E., MOYA J., 1989. Electron microscopical studies on the renal concretions of the slug, *Arion ater* (Linnaeus, 1758) (Mollusca, Pulmonata). Zool. Anz. Jena, 222, 5/6, S, 273-280.

AULT W. U. SENECHAL R. G., WOODLAND E. E., 1970. Isotope composition as a natural tracer of lead in the environment. Environ. Sci. Technol., 4, 305-315.

BANGA S. E. W., BOER H. H., 1969. Ultrastructure of the reno-pericardial system in the land snail *Lymnaea stagnalis*. L. Z. Zellforsh, 94, 513-529.

BAYNE C. J., 1974. On the immediate fate of bacteria in the land snail *Helix*. In : Contemporary topics in immunobiology (Ed. E. L. Cooper). Plemnum Press, 37-45.

BEBIANNO M. J., LANGSTON W. J., 1998. Cadmmum and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*. Talanta, 46, 301-313.

BECKLER G. L., CHEN C. H., GREENWALT J. W., LEHNINGER A. L., 1964. Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the Blue Crab, *Callinectes sapidus*. J. Cell Biol., 61, 316-326.

BEEBY A., 1985. The role of *Helix aspersa* as a major herbivor 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, Zn and Cu concentrations in the garden snail *Helix aspersa* Müller from a central London car park. Environ. Pollut., 30, 233-244.

BEEBY A., RICHMOND L., 1987. Adaptation by an urban population of the snail *Helix aspersa* to a diet contaminated with lead. Environ. Pollut., 46, 73-82.

BERGER B., DALLINGER R., 1989. Accumulation of cadmium and copper by the terrestrial snail *Arianta arbustorum* L. : Kinetics and budgets, Oecologia, 79, 60.

BERGER B., DALLINGER R., 1989. Factors influencing the contents of heavy metals in terrestrial snails from contaminated urban sites, in 7th Int. Conf. Heavy metals in the Environment, VERNT J. P., Ed, CEP Consultants Ltd., Edinburgh, 550 p.

BERGER B., DALLINGER R., 1993. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution, Environ. Monit. Assess., 25, 65-84.

BERGER B., DALLINGER R., FELDER E., MOSER J., 1993. Budgeting the flow of cadmium and zinc through the terrestrial gastropod, *Helix pomatia* L. In Ecotoxicology of metals in invertebrates (Ed Dallinger R., Rainbow P. S.), 291-313.

BERGER B., DALLINGER R., THOMASER A., 1995. Quantification of metallothionein as a biomarker for cadmium exposure in terrestrial gastropods. Environ Toxicol Chem., 14, 5, 781-791.

BERKALOFF A., 1958. Les grains de sécrétion des tubes de Malpighi de *Gryllus domesticus*. C. R. Acad. Sci., Paris, 246, 19, 2807.

BERKALOFF A., BOURGUET J., FAVARD P., FAVARD N., LACROIX J.C., 1981. Biologie et physiologie cellulaires. Ed. Hermann Paris, 3, 182 p.

BERTIN L., 1939. Geologie et paléontologie. Larousse. Paris, 504 p.

BILLET F., McGEE-RUSSELL S. M., 1955. The histochemical localization of β-glucuronidase in the digestive gland of the Roman snail (*Helix pomatia*). Quart. J. Microsc. Sci., 96, 35-48.

BISHOP S. H., HELLIS L. L., BURCHAM J. M., 1983. Amino acid metabolism in mollucs. In The Mollusca, vol. I, Metabolic biochemistry and molecular biomechanics. Ed. Wilbur K. M., Academic Press, Inc., New-York.

BISWAS A. K., GHOSE K. C., 1968. Elaboration of enzymes in the digestive gland of *Viviparus bengalensis* (Mollusca : gastropoda) during the first hour of digestion. J. Zool., London, 156 p.

BOHAC J., POSPISIL J., 1989. Accumulation of heavy metals in invertebrates and its ecological aspects. In Heavy metals in environments, Vol. 1 (Ed Vernet J. P.), CEP Consultants Ltd, Edinburgh, 354 p.

BORGO R., SOUTY-GROSSET C., GOMOT L., 1995. Etude de l'ADN mitochondrial d'espèces d'escargots du genre Helix par PCR-RFLP. C. R. Soc. Biol., 189, 629-636.

BOUILLON J., 1960. Ultrastructure des cellules rénales des mollusques. I. Gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix pomatia*). Annales Sci. Nat. Zool., 12, 719-757.

BRIOTEUX-GREGOIRE S., FLORKIN M., 1962. Les excrétas de l'escargot *Helix pomatia* et leur origine métabolique. Arch. Int. Physiol. Biochim., 70, 496-506.

BRIOTEUX-GREGOIRE S., FLORKIN M., 1964. Recherche des enzymes de l'uréogénèse chez *Helix pomatia* L. Comp. Biochem. Physiol., 12, 55-60.

BROOKS A. W., WHITE K. N., BAILEY S. E. R., 1992. Accumulation and excretion of aluminium and iron by the terrestrial snail *Helix aspersa*. Comp. Biochem. Physiol., 103 C, 3, 577-583.

BROWN A. C., 1967. Elimination of foreign particles by the snail, *Helix aspersa*. Nature, 18, 1154-1155.

BROWN B. E., 1981. The form and function of metal-containing "granules" in invertebrate tissues. Biol., 57, 621-667.

BUBEL A., 1989. Microstructure and function of cells. Electron micrographs of cell ultrastructure. John Wiley & Sons, New York. Ellis Horwood Limited, England, Chichester, 43-60.

BU-OLAYAN A. H., SUBRAHMANYAM M. N. V., 1997. Accumulation of copper, nickel, lead and zinc by snail, *Lunella coronatus* and pearl oyster, *Pinctada radiata* from the kuwait coast before and after the gulf war oil spill. The Sci. Total Environ., 197, 161-165.

BURTON R. F., 1975. A method of narcotizing snails (*Helix pomatia*) and cannulating the haemocoel and its application to a study of the role of calcium in the regulation of acid-base balance. Comp. Biochem. Physiol., A, 52, 483-485.

BUTLER P. A., ANDREN L., BONDE G. L., JERNELÖV A., REISCH D. J., 1971. Monitoring organism. Food and agricultural organisation technical conference on marine pollution and ist effects on living resources an fishing, Rome, Fishing News LTD, London, 101-112.

CAJARAVILLE M. P., 1995. Cell biology in environmental toxicology. Environmental Toxicology, University of the Basque Country Press Service, Bilbao, Cajaraville M. P. editor, 299 p.

CAJARAVILLE M. P., ROBLEDO Y., ETXEBERRIA M., MARIGOMEZ I., 1995. Cellular biomarkers as useful tools in the biological monitoring of environmental pollution : molluscan digestive lysosomes. In Cell biology in environmental toxicology, Cajaraville M. P. editor, 29-55.

CAMPANINI G, BRACCHI P. G., GUIZZARDI F., MADARENA G., del BONO G., 1992. Copper and zinc levels in the edible portion of two *Helix* species living wild in mantua province, Italy. Snail Farming Research, IV, 30-32.

CAMPION M., 1961. The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. Quart. J. Microscop. Sc., 102, 195-216.

CARIGNAN J., GARIEPY Cl., 1995. Isotopic composition of epiphytic lichens as a tracer of the sources of atmospheric lead emissions in southern Quebec. Canada. Geochem. Cosmochem. Acta, 59, 4427-4433.

CARRIKER M. R., 1946. Morphology of the alimentary tract of the snail *Lymnaea stagnalis appressa* Say. Trans. Wisconsin Acad. Sci., 37, 1-88.

CARRIKER M. R., BILSTAD N. M., 1946. Histology of the alimentary system of the snail *Lymnaea stagnalis appressa* Say. Trans. Am. Microsc. Soc., 65, 25-275.

CHARRIER M., 1995. Particularités du métabolisme digestif d'un Gastéropode Pulmoné phytophage *Helix aspersa* Müller. Recherches histologiques, histochimiques, enzymologiques et microbiologiques. Thèse de Doctorat d'Etat en Sciences biologiques, Université de Rennes, 2 Fascicules, 344 p.

CHARRIER M., 2000. Recherches sur la nutrition des escargots. Journée Nationale de l'Escargot, La Motte Servolex, 11 p.

CHARRIER M., DAGUZAN J., 1980a. Etude de la consommation alimentaire et de la production de l'escargot "Petit-Gris" *Helix aspersa* Müller (gastéropode pulmoné terrestre) élevé sous abri. Haliotis, 10, 1, 41-44.

CHARRIER M., DAGUZAN J., 1980b. Contribution à l'étude de l'excrétion azotée chez *Helix aspersa* Müller (mollusque gastéropode pulmoné). Nutr. Alim., 34, 709-724.

CHARRIER M., DAGUZAN J., 1983. Etude de la consommation alimentaire et de la production de l'escargot Petit-Gris. In L'escargot et l'héliciculture, Informations Techniques des Services Vétérinaires, Paris, 37-51.

CHEUNG S. G., WONG L. S., 1999. Effect of copper on activity and feeding in the subtidal prosobranch *Babylonia lutosa* (Lamarck) (Gastropoda : Buccinidae). Mar. Pollut. Bull., 39, 1-12, 106-111.

CHOW T. S., SNYDER C. B., EARL J. L., 1975. Isotope ratios of lead as pollutant source indicators. Symposium Ienna Nov. 1974 : Isotope ratios as pollutant source and behaviour indicators. IAEA-SM 191, 4, 95-108.

CLARK S. W., RUDOLPH F. B., 1979. Purine synthesis in *Helix aspersa* : metabolic fate of labelled precursors. Comp. Biochem. Physiol., 63B, 369-371.

CLAYES E., DEMEYER D., 1986. Nutritional quality of snails (*Helix aspersa*). 32nd European Meating of Meat Research Workers, proc. II, Ghent, 415-418.

COMFORT A., 1957. Duration of life in Molluscs. Proc. Malacol. Soc. London, 32, 219-241.

CONAN L., 1993. Contribution à l'étude de l'alimentation des escargots. Journée nationale hélicicole, ITAVI, Surgères, Février, 1-11.

CONRAD G. W., 1988. Heavy metal effects on cellular shape changes, cleavage, and larval development on the marine gastropod mollusk, (*Ilyanassa obsoleta* Say). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 41, 79-85.

COUGHTREY P. J., MARTIN M. H., 1976. The distributionof Pb, Zn, Cd and Cu within the pulmonate mollusc *Helix aspersa* Müller, Oecologia, 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, 27, 65-74.

CROUDACE I. W., CANDY A. B., 1995. Environ. Sci. Technol., 29, 128 p.

CROWELL H. H., 1973. Laboratory study of calcium requirements of the brown garden snail *Helix aspersa* Müller. Proc. Malac. Soc. Lond., 40, 491-503.

DAGUZAN J., 1985a. Essais d'utilisation de divers aliments composés pour l'élevage d'escargots Petit-Gris (*Helix aspersa* Müller). Bull. Inf. Technol. I.T.A.V.I. sur l'élevage de l'escargot, Paris.

DAGUZAN J., 1985b. Nitogenous excretion in a pulmonate gastropod : *Elona quimperiana* (de Ferussac) from western brittany. Comp. Biochem. Physiol., 80B, 1, 103-107.

DALLINGER R., 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In Ecotoxicology of metals in invertebrates (R. Dallinger and P. S. Rainbow, Eds.), Lewis Publishers, 2454-289.

DALLINGER R., 1995. Mechanisms of metal incorporation into cells. In Cell biology in environmental toxicology, Ed Carajaville M. P., 135-154.

DALLINGER R., WIESER W., 1984a. 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., 79C,117.

DALLINGER R., WIESER W., 1984b. Molecular fractionation of Zn, Cu, Cd and Pb in the midgut gland of *Helix pomatia* L.,Comp. Biochem. Physiol., 79C,125.

DALLINGER R., BERGER B., BIRKEL S., 1989. Terrestrial isopods as biological indicators of heavy metal pollution in urban areas. In Heavy metals in the environment, Conference, Vernet J. P., 358-361.

DALLINGER R., JANSSEN H. H., BARRER-HILTY A., BERGER B., 1989. Characterization of an indicible cadmium-binding protein from hepatopancreas of metal-exposed slugs (Arionidae, Mollusca). Comp. Biochem. Physiol., 92C, 355.

DALLINGER R., BERGER B., GRUBER A., 1993a. Quantitative aspects of zinc and cadmium in *Helix pomatia* : Differences between an essential and a non-essential trace element. In Ecotoxicology of metals in invertebrates (R. Dallinger and P. S. Rainbow, Eds.), Lewis Publishers, ch 16, Boca Raton, FL, 315-331.

DALLINGER R., BERGER B., HUNZIKER P., BIRCHLER N., HAUER C. R., KÄGI J., 1993b. Purification and primary structure of scril metallothionein – Similarity of the N-terminal sequence with histones H_4 and H_2A. Eur. J. Biochem., 216, 739-746.

DALLINGER R., BERGER B., HUNZIKER P. E., KÄGI J., 1997. Metallothionein in snail : Cd and Cu metabolism. Nature, 388, 237-238.

DALLINGER R., BERGER B., HUNZIKER P. E., KÄGI J., 1999. Structure and function of metallothionein isoforms in terrestrial snails. Metallothionein IV, 173-178.

DAVIES B. E., HOLMES P. L., 1972. Lead contamination of roadside soil and grass in Birmingham, England, in relation to naturally occuring levels. J. Agric. Sci., Camb., 79, 479-484.

De DUVE C., BAUDHUIN, 1966. Peroxysomes (microbodies and related particles). Physiol. Rev., 46, 323-335.

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

DELAUNAY H., 1931. L'excrétion azotée des invertébrés. Biol. Rev., 6, 265-361.

DIAZ COSIN D. J., 1977. Estructura de las células renales de *Theba pisana*. Bol. R. Soc. Espanola Hist. Nat. (Biol.), 75, 217-242.

DOUCET F., 1997. Variations des teneurs en métaux lourds et de la composition isotopique du plomb des lichens épiphytes en fonction de l'altitude. Mémoire du DEA Physique et Chimie de la Terre. INPL Nancy, 30 p+ bibliographie + annexes.

DREXEL R., SIEGMUND S. *et al.*, 1987. Complete amino-acid-sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (*Helix pomatia*). Biological Chemistry Hoppe-Seyler, 366 (6) : 617-635.

EDWARDS C. A., SUBLER S., CHEN S. K., 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 (Edited by N. M. Van Straalen and D. A. Krivolutsky), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 67-84.

ELMSLIE L., 1998. Humuc acid : a growth factor for *Helix aspersa* Müller (Gastropoda : Pulmonata). J. Moll. Stud., 64, 400-401.

ETXEBERRIA M., SASTRE I., CAJARAVILLE M. P., MARIGOMEZ I., 1994. Digestive lysosome enlargement induced by experimental exposure to metals (Cu, Cd and Zn) in mussels collected from Zn-polluted site. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 27, 338-345.

FACHETTI S., 1979. Isotope study of lead in metal. *In* management and control of heavy metals in the environment. International Conference, London, Sept. 1979. CEP Consultants Ltd., Edinburg, U.K., 95-102.

FARMER J. G., MACKENZIE A. B., SUGDEN C. L., BRYANT C. L., EADES L. Y., BAILEY-WATTS T. E., KIRKA A., 1996. The history of environmental lead pollution in Scotland. Environ. Sci. Technol., 30, 3080.

FLORKIN M., DUCHÂTEAU G., 1943. Les formes du système enzymatique de l'uricolyse et l'évolution du catabolisme purique chez les animaux. Arch. Int. Physiol., 53, 267-307.

FOURNIE J., CHETAIL M., 1982. Accumulation calcique au niveau cellulaire chez les mollusques. Malacologia, 22, 1-2, 265-284.

FOURNIE J., CHETAIL M., 1984. Calcium dynamics in land gastropods. Amer. Zool., 24, 857-870.

FRANCHINI A., OTTAVIANI E., 1993. Histochemical and ultrastructural study of the digestive gland of the freshwater snail *Planorbarius corneus* (L.) (Gastropoda Pulmonata). Anim. Biol., 2, 191-198.

FRAYSSE B., 2001. Caractérisation des mollusques dulçaquicoles en tant que bioindicateurs de radiocontamination dans un contexte de multipollution métallique (Cd, Zn). Thèse – Univ. Bordeaux, 142 p + annexes.

GABE M., 1962. Résultats de l'histochimie des polysaccharides : invertébrés. In Handbuch der Histochemie. (Eds. W. Graumann and K. Neumann). G. Fischer, Stuttgart, 95-356.

GABE M., 1968. Techniques histologiques. Masson et Cie, Paris, 1113 p.

GELINAS Y., SCHMIT J. P., 1997. Extending the use of the stable lead isotope ratios as a tracer in bioavailability studies. Environ. Sci. Technol., 31, 1968-1972.

GEORGE S. G., 1982. Subcellular accumulation and detoxification of metals in aquatic animals. In Physiological mechanism of marine pollutant, 3-52 p, Vernberg, W. B. (ed), Academic press, New York.

GEORGE S.G., 1983. Heavy metal detoxication in the mussel *Mytilus edulis*-composition of Cd-containing kidney granules (tertiary lysosomes). Comp. Biochem. Physiol., 76C, 53-57.

GEORGE S.G., PIRIE B. J. S., 1980. Metabolism of zinc in the mussel *Mytilus edulis* (L.) a combined ultrastructural and biochemical study. J. mar. biol. Ass. U. K., 60, 575-590.

GEORGE S. G., CARPENE E., COOMBS T. L., OVERNELL S., YOUNGSON A., 1979. Characterization of cadmium-binding proteins from mussels *Mytilus edulis* (L.), exposed to cadmium. Biochim. Biophys. Acta, 580, 225-233.

GEORGE S. G., COOMBS T. L., PIRIE B. J. S., 1982. Characterization of metal-countainig granules from the kidney of the common mussel, *Mytilus edulis*. Biochim. Biophys. Acta, 716, 61-75.

GIAMBERINI L., 1993. Etude des mécanismes de transport et détoxication des métaux lourds chez la moule d'eau douce *Dreissena polymorpha*. Rôle des hémocytes et des organes du système excréteur (histologie, ultrastructure, microanalyse). Thèse. Univ. Metz, 196 p + 45 pl.

GNASSIA-BARELLI M., ROMEO M., PUISEUX-DAO S., 1995. Effects of cadmium and copper contamination on calcium content of the bivalve *Ruditapes decussatus*. Mar. Environ. Res., 39, 325-328.

GOLDBERG E. D., 1986. The mussel watch concept. Environ. Monit. Assess., 7, 91-103.

GOMOT A., 1994. Contribution à l'étude de la croissance d'escargots du genre *Helix* : Influence des facteurs de l'environnement. Nutrition et composition biochimique. Contrôle neuro-endocrine. Thèse. Univ. BESANÇON, 258p + annexes.

GOMOT A., 1997a. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 33, 2, 209-216.

GOMOT A., 1997b. 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, 1, 59-75.

GOMOT L, DERAY A., 1987. Les escargots. La Recherche, 186, 302-311.

GOMOT L., GOMOT A., 1996. Utilisation des escargots comme bioindicateurs de pollution par les métaux. Document ADEME.

GOMOT A., PIHAN F., 1997. Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snails subspecies (*Helix*). Ecotoxi. 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.

GOMOT A., BRUCKERT S., GOMOT L., COMBE J. C., 1986. A contribution to the study of the beneficial effects of soil on the growth of *Helix aspersa*. In Snail Farming Research, Associazione Nazionale Elicicoltori, Cherasco, Italy, n°1, 76-83.

GOMOT A., GOMOT L., BOUKRAA S., BRUCKERT S., 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of the absorption route for the stimulating factors. J. Moll. Stud., 55, 1-8.

GRANEY J. R., HALLIDAY A. N., KEELER G. J., NRIAGU J. O., ROBBINS J. A., NORTON S. A., 1995. Isotopic record of lead pollution in lake sediments from the northeastern United States. Geochim. Cosmochim. Acta, 59, 1715-1728.

GREAVES G. N., SIMKISS M., TAYLOR M., BINSTED N., 1984. The local environment of metal sites in intracellular granules investigated by using X-ray absorption spectroscopy. Biochem. J., 221, 855-868.

GREVILLE R. W., MORGAN A. J., 1989. Concentrations of metals (Cu, Pb, Cd, Zn and Ca) in six species of British terrestrial gastropods near a disused lead and zinc mine, J. Mol., Stud., 55, 31.

GREVILLE R. W., MORGAN A. J., 1990. The influence of size on the accumulated amounts of metals (Cu, Pb, Cd, Zn an Ca) in six species of slug sampled from a contaminated woodland site. J. Moll. Stud., 56, 355-362.

GROUSSET F. E., QUETEL C. R., THOMAS B., BUAT-MENARD P., DONARD O. F. X., BUCHER A., 1994. Transient Pb isotopic signatures in the western European atmosphere. Environ. Sci. Technol., 28, 1605-1608.

GUBSON B. L., 1986. Lead isotopes in mineral exploration. Elsevier, Amsterdam, 245 p.

HAUG A., MELSOM S., THORNTON I., 1974. Estimation of heavy metal pollution in two Norwegian fjord areas by analysis of the brown alga *Ascophyllum nodosum*. Environ. Pollut., 7, 179-192.

HOPKIN S. P., 1989. Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates. Elsevier, New-York, 366p.

HOPPER J. F., ROSS H. B., STURGES W. T., BARRIE L. A., 1991. Regional source discrimination of atmospheric aerosols in Europe using the isotopic composition of lead. Tellus, 43B, 45-60.

HORNE F. B., BECK S., 1979. Purine production during fasting in the slug, *Limax flavus* Linné. J. Exp. Zool., 209, 2, 309-316.

HOWARD B., MITCHELL P. C. H., RITCHIE A., SIMKISS K., TAYLOR M., 1981. The composition of intracellular granules from the metal-accumulating cells of the common garden snail (*Helix aspersa*). Biochem. J., 194, 507-511.

IRELAND M. P., 1986. Effects of wound healing on zinc distribution in earthworm. In Earthworm ecology (Satchell E. J.), Ed Champman & Hall, London, 247-265.

IRELAND M. P., 1988. A comparative study of the uptake and distribution of silver in a slug *Arion ater* and a snail *Achatina fulica*. Comp. Biochem. Physiol., 90 C, 189-194.

IRELAND M. P., MARIGOMEZ I., 1992. The influence of dietary calcium on the tissue distribution of Cu, Zn, Mg & P and histological changes in the digestive gland cells of the snail *Achatina fulicula* Bowdich. J. Moll. Stud., 58, 157-168.

ISMERT M., 2000. Les enzymes de biotransformation des xénobiotiques chez *Helix aspersa* et *Pleurozium schreberi*, biomarqueurs potentiels de la pollution atmosphérique par les hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse Univ. Metz, 148 p.

ISO/DIS 112 68-1, 1994. Soil quality. Effects of pollutant on earthworms (*Eisenia foetida*). Part 1 : determination of acute toxicity using artificial soil substrates.

ISO/DIS 112 68-2, 1994. Soil quality. Effects of pollutant on earthworms (*Eisenia foetida*). Part 1 : method for the determination of effects on reproduction.

ISO/TC 190 SC_4 WG_2, 1994. Soil quality. Effects of soils pollutants on collembola (*Folsomia candida*) : method for the determination of effects on reproduction. La Recherche, 18 : 302-311.

KABATA-PENDIAS A., ADRIANO D. C., 1995. Trace metals. In Soil amendments and environmental quality. Agri. Environ. Ser., chap.4, 139-167.

KARABINOS A., BATTACHARYA D., 2000. Molecular evolution of calmodulin-like genes in the cephalochordate *Branchiostoma*. J. Mol. Evol., 51, 141-148.

KEDDY, C., GREENE J. C., BONNEL M. A., 1994. A review of whole organism bioassays for assessing the quality of soil, freshwater sediment, and freshwater in Canada. Etude n°198, Série Scientifique, Environnement Canada, Ottawa, Ontario, 139 p.

KEINONEN M., 1992. The isotopic composition of lead in man and the environment in Finland (1966-1987) : isotope ratios of lead as indicators of pollutant source. Sci. Total. Environ., 113, 251-268.

KERNEY M. P., CAMERON R. A. D., 1987. Land snails of britain and North-west Europe. William Collins Sons & Co Ltd, 288 p.

KNUTTI R., BUCHER P., STENGL M., STOLZ M., TREMP J., ULRICH M., SCHLATTER C., 1988. Cadmium in the invertebrate fauna of an unpolluted forest in Switzerland. Environ. Toxin Ser., 2, 171-191.

KRIJGSMAN B. J., 1925. Arbeitsrhythmus dur Verdanungsdrusen bei *Helix pomatia*. I. Die naturlichen Bedingungen. Z. Vergl. Physiol., 2, 264-296.

KRIJGSMAN B. J., 1929. Arbeitsrhythmus der Verdauungsdrüsen bei *Helix pomatia*. II. Teil : Sekretion, Resorption und Phagocytose. Z. vergl. Physiol., 8, 187-280.

KRZYZANOWSKI M., 1997. Methods for assessing the extent of exposure and effects of air pollution. Occup. Environ. Med., 54, 145-151.

KULKARNY A. B., 1981. Glycogen and lipid content in the hepatopancreas and reproductive system of the land slug *Laevicaulis alte*. Riv. Biol., 74, 191-193.

LAFAURIE M., 1998. Biomarqueurs : les polutions sous surveillance. Biofutur, 179, 79-81.

LAM P. K. S., 1996. Effects of cadmium on the consumption and absorption rates of a tropical freshwater snail, *Radix plicatulus*. Chemosphere, 32, 11, 2127-2132.

LAM P. K. S., YU K. N., CHONG M. W. K., 1997. Cadmium uptake and depuration in the soft tissues of *Brotia hainanensis* (Gastropoda : Prosobrancha : Thiaridae) : a dynamic model. Chemosphere, 35, 11, 2449-2461.

LASKOWSKI R., HOPKIN S. P., 1996a. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail (*Helix aspersa*) : implications for predators. Environ. Pollut., 91, 3, 289-297.

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

LEE T. W., CAMPBELL J. W., 1965. Uric acid synthesis in the terrestrial snail, *Otala lactea*. Comp. Biochem. Physiol., 15, 457-468.

LEPP N. W., DOLLARD G. J., 1974. Oecologia, 16, 369 p.

LIN Z. Q., BARTHAKUR N. N., SCHEPP P. H., KENNEDY G. G., 1995. Uptake of trace metals ,(Pb radioisotopes) by tree bark and foliage. Environ. Exp. Bot., 35, 475 p.

LISON L., 1953. Histochimie et cytochimie animales. 2ème édition, Gauthier-Villars, Paris.

MAGNIN F., TATONI T., 1995. Secondary successions on abandoned cultivation terraces in calcareous Provence. II- The gastropod communities. Acta Oecologica, 16, 1, 89-101.

MARCANTONIO F., FLOWERS G., THIEN L., ELGAARD E., 1998. Lead isotopes in tree rings : chronology of pollution in Bayou Trepagnier, Louisiane. Environ. Sci. Technol., 32, 2371-2376.

MARCHAND C. R., COLARD C., 1991. Presence of cells and fibers immunoreactive towards antibodies to different peptides or amine in the digestive tract of the snail *Helix aspersa*. J. Morphol., 207, 185-190.

MARI G., 1992. Les anciennes mines de cuivre du dôme de Barrot (Alpes-Maritimes). Editions Serre, 111 p.

MARIGOMEZ J. A., ANGULO E., MOYA J., 1986a. Copper treatment of the digestive gland of the slug, *Arion ater* L. 1. Bioassay conduction and histochemical analysis, Bull. Environ. Toxicol., 36, 600-608.

MARIGOMEZ J. A., ANGULO E., MOYA J., 1986b. Copper treatment of the digestive gland of the slug *Arion ater* L. 2. Morphometrics and Histophysiology. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 36, 608-615.

MARIGOMEZ J. A., ANGULO E., SAEZ V., 1986c. Feeding and growth responses to copper, zinc, mercury and lead in the terrestrial gastropod *Arion ater* (Linne). J. Mol. Stud., 52, 68-78.

MARIGOMEZ I., GIL J. M., ANGULO E., 1990. Accumulation of pigment and lipofuscin granules in *Littorina littorea* exposed to sublethal concentrations of cadmium : a histochemical study. Zool. Jb. Anat., 120, 127-141.

MARIGOMEZ J. A., CAJARAVILLE M. P., ANGULO E., 1990. Cellular distribution in the common winkle *Littorina littorea* determined by X-rag microprot analysis an hystochemistry. Histochemistry, 94, 1991-199.

MARIGOMEZ I., SOTO M., CAJARAVILLE M. P., 1995. Morphofunctional patterns of cell and tissue systems involved in metal handling and metabolism. In Cell biology (Environ. Toxicol.), University of the Basque Country Press Service, Bilbao, Cajaraville M. P. Editor, 89-134.

MARIGOMEZ J. A., VEGA M. M., CAJARAVILLE M. P., ANGULO E., 1989. Quantitative responses of the digestive-lysosomal system of winckles to sublethal concentrations of cadmium. Cell. Mol. Biol., 35, 555-562.

MARSCHNER H., 1986. Mineral nutrition in higher plants. Academic Press, London, 674 p.

MARTIN M. H., COUGHTREY P. J., 1982. Biological monitoring of heavy metal pollution. Applied Sci. Publi., 252-271.

MARTOJA M., 1974. Remarques sur l'excrétion d'un gastéropode prosobranche adapté au milieu terrestre, *Pomatias elegans*. C. R. Acad. Sci., Paris, D, 278-926.

MARTOJA M., 1975. Le rein de *Pomatias elegans* (Gastéropode prosobranche) : données structurales et analytiques.

MARTOJA R., MARTOJA M., 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie éd., Paris, 345 p.

MARTOJA R., MARTOJA M., 1973. Sur des accumulations naturelles d'aluminium et de silicium chez quelques invertébrés. C. R. Acad. Sc. Paris, 276D, 2951-2954.

MARTOJA M., MARTOJA R., 1984. La bioaccumulation de métaux, processus physiologique normal et conséquence de la pollution. Le courrier du CNRS, 54, 32-37.

MARTOJA R., LHONORE D., BALLAN-DUFRANCAIS C., 1978. Bioaccumulation minérale et purique chez les Insectes Planipennes *Euroleon nostras*, *Myrmeleon hyalinus*, *Acanthaclisis beaticus*, *Sisyra fuscata*, *Chrysopa sp.* Arch. Zool. Expl. Genle, 118, 441-455.

MASON A. Z., 1977. Diets and culture media : gastropoda. In Handbook series in nutrition and foods, Section G : Diets, Culture Media, Food Supplements, CRC Press Inc., 95-102.

MASON A. Z., 1983. The uptake, accumulation and excretion of metals by the marine prosobranch gastropod mollusc *Littorina littorea* (L.). PhD Thesis, University College of Walles, Gwynedd, 575 p.

MASON A. Z., NOTT J. A., 1981. The role of intracellular biomineralized granules in the regulation and detoxification of metals in gastropods with special reference to the marine prosobranch *Littorina littorea*. Aquatic Toxicol., I, 239-256.

MASON A. Z., SIMKISS K., 1982. Sites of mineral deposition in metal-accumulationg cells. Exp. Cell Res., 139, 383-391.

MASON A. Z., SIMKISS K., 1983. Interactions between metals and their distribution in tissues of *Littorina littorea* (L.) collected from clean and polluted sites. J. Ma. Biol. Ass. U. K., 64, 699-720.

MASON A. Z., SIMKISS K., RYAN K. P., 1984. The ultrastructural localization of metals in specimens of *Littorina littorea* collected from clean and polluted sites. J. Mar. Biol. Assoc. U. K., 64, 699-720.

MAZLANI S., 1995. Etude écotoxicologique de la contamination métallique des eaux, des sédiments et des organismes aquatiques dans la zone d'épandage des eaux usées de la ville de Marrakech (Maroc). Thèse, Université de Marrakech, 244 p.

MAZLANI S., MAAROUF A., RADA A, EL MERAY M., PIHAN J. C., 1994. Etude de la contamination par les métaux lourds du champ d'épandage des eaux usées de la ville de Marrakech (Maroc). Rev. Sc. Eau, 7, 55-68.

MEINCKE K. F., SCHALLER K. H., 1974. Über die Brauchbarkeit der Weinbergschnecke (*Helix pomatia* L.) im Freiland als Indikator für die Belastung der Umwelt durch die Elemente Eisen, Zink und Blei. Oecologia, 15, 393-398.

METZGER R., KRAMM U., HOOGEWERFF S., BAUMANN A., 1998. Pb isotope signatures : Evidence of origin and fluxes of heavy metals in an area polluted during 2000 years of Pb-Zn mining and smelting. ConSoil 1998, Edinburgh, 955-956.

MORSE A. N. C., FROYD C. A., MORSE D. E., 1984. Molecules from cyanobacteria and red algae that induce larval settlement and metamorphosis in the mollusc *Haliotis rufescens*. Mar. Biol., 81, 3, 293-298.

MORTON J. E., 1955. The functional morphology of the British Ellobiidae (Gastropoda, Pulmonata) with special reference to the digestive and reproductive system. Phil. Trans. Roy. Soc. London, B 239, 86-160.

MORTON J. E., 1956. The tidal rhythm and action of the digestive system of the lamellibranch *Lasaea rubra*. J. Mar. Biol. Ass. U. K., 35, 563-586.

MOSER H. WIESER W., 1979. Copper and nutrition in *Helix pomatia* (L.). Oecologia, 42, 241-251.

MUKHERJEE S., DAS M., SUR R. K., MISRA K. K., 1995. Cellular morphology of digestive gland of three gland of three gastropod molluscs from different habitats. Acta Biologica Cracoviensa, Zoologia, XXXVII, 27-37.

NAEEM S., THOMPSON L. J., LAWLER S. P., LAWTON J. H., WOODFIN R. M., 1984. Declining biodiversity can alter the performance of ecosystems. Nature, 368, 734-737.

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.

NIEBOER E., RICHARDSON D. H. S., 1980. The replacement of the nondescript term "heavy metals" by a biologically and chemically significant classification of metal ions. Environ Pollut., 1B, 3-26.

NOTT J. A., NICOLAIDOU A., 1989a. Metals in gastropods-Metabolism and bioreduction. Mar. Envir. Res., 28, 201-205.

NOTT J. A., NICOLAIDOU A., 1989b. The cytology of heavy metal accumulation in the digestive glands of three marine gastropods. Proc. R. Soc. Lond., 237B, 247-362.

NOTT J. A., NICOLAIDOU A., 1990. Transfert of metal detoxification along marine food chains. J. mar. biol. Ass. U.K., 70, 905-912.

NOTT J. A., NICOLAIDOU A., 1996. Kinetics of metals in molluscan faecal pellets and mineralized granules, incubated in marine sediments. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 197, 203-218.

NRC-CNRC, 1995. Toxicity testing applied to soil ecotoxicology. Workshop Proceedings, Montréal, Quebec (28-29 November), 36 p.

NRIAGU J. O., PACYNA J. M., 1988. Quantitative assessment of world-wide contamination of air, water and soils with trace metals. Nature, 333, 134-139.

ONAT B., TOPCUOGLU S., 1999. A laboratory study of ^{65}Zn and ^{134}Cs depuration by the sea snail (*Rapana venosa*). J. Environ. Radioactivity, 46, 201-206.

OTTAVIANI E. 1990. Immunocytochemical study of bacterial elimination from the freshwater snail *Planorbarius corneus* L. (Gastropoda, Pulmonata). Zool. Jb. Anat., 120, 57-62.

OUTRIDGE P. M., EVANS R. D., WAGEMANN R., STEWART R. E. A., 1997. Historical trends of heavy metals and stable lead isotopes in beluga *Delphinapterus leucas* and walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) in the Canadian artic. Sci Total Environ., 203, 209-219.

PACYNA J. M., 1988. Atmospheric lead emissions in Europe in 1985. NILU report OR 18/88. Norwegian Institut for Air Research, Lillestrøm, Norway.

PAULUS M., KLEIN R., WAGNER G., MÜLLER P., 1996. Biomonitoring and environmental specimen banking. ESPR-Environ. Sci. & Pollut. Res., 3, 3, 169-177.

PESCHEN K., 1939. Untersuchungen über das Vorkomen und den Stoffowochsel des guanins im Tierreich. Zoo. Jahrb, 59, 429-462.

PETIT D., MENNESSIER J. P., LAMBERTS L., 1984. Stable lead isotopes in pond sediments as traces of post and present atmospheric lead pollution in Belgium. Atmos. Environ., 186, 1189-1193.

PHILLIPS D. J. H., 1977. The use of biological indicator organisms to monito trace metal pollution in marine and estuarine environments : a review. Environ. Pollut., 15, 105-112.

PHILLIPS D. J. M., 1993. Bioaccumulation. In *Handbook of ecotoxicology* (P. Calow, Eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 378-396.

PIHAN F., de VAUFLEURY A., 2000. The snail as a target organism for the evaluation of industrial waste dump contamination and the efficiency of its remediation. Ecotoxicol. Environ. Saf., 46, 137-147.

PIHAN F., PROMEYRAT S., GOMOT A., 1996. Use of snails as bioindicator of field contamination by metallic trace elements. Poster. Fourth European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety.

PIHAN J. C., GOBY J. P., FROISSARD E., MORHAIN E., PIHAN F., 1993. Recherche de la présence de micro-polluants métalliques dans l'escargot et sa nourriture (Cu, Zn, Cr, Fe, Pb, Mn, Ni, Cd, Hg). Expérimentation d'un aliment nouveau. Rapport GIS Héliciculture, Univ. Metz, IUT Perpignan, LEP Rivesaltes, 3 février 1993, 3p.

PIHAN J. C., MORHAIN E., PIHAN F., 1994a. Recherche des micro-polluants métalliques (cuivre et zinc) dans l'escargot en milieu naturel et en élevage. Evaluation du facteur de contamination par la voie alimentaire (Cu, Zn, Cr, Fe, Mn). Journée Nationale Helicicole, ITAVI-GNPE Rennes, 1-10.

PIHAN J. C., MORHAIN E., PIHAN F., 1994b. Intérêt de l'utilisation des escargots terrestres comme indicateurs de la contamination d'un site par les métaux (Zn et Cu). Proposition d'une grille de qualité. Séminaire I, GELFI, Les sites contaminés. Diagnostic, évaluation des risques, traitement. 22, 29 mars 1994. EPML-B. P. 245-54701 Pont-à-Mousson Cedex, 87-95.

PIHAN J. C., MORHAIN E., PROMEYRAT S., PIHAN F., 1995. Contamination métallique des escargots d'élevage et de la nature. Proposition de grilles de qualité (Cu, Zn, Fe, Mn Cr, Pb). Journée Nationale Hélicicole ITAVI-GNPE LYON, 6 février 1995, 20 p.

PIP E., 1992. Cadmium, copper and lead in gastropods of the lower Nelson River system, Manitoba, Canada. Journal of Molluscan Studies, 58 : 199-205.

POLICARD 1961. Silice dans les mitochondries rénales de rat après injection intrapéritonéales de gel de silice. In Traité de microscopie électronique (Magnan), Ed. Hermann, 1-2, 1283 p.

POPHAM J. D., d'AURIA J. M., 1980. *Arion ater* (Mollusca : Pulmonata) as an indicator of terrestrial environmental pollution. Water Air Soil Pollut., 14, 115-124.

PRENANT M., 1924. Contributions à l'étude cytologique du calcaire. I : quelques formations calcaires du tissu conjonctif chez les gastéropodes. Bulletin biologique de la France et de la Belgique, 58, 331-380.

PYNNÖNEN K., HOLWERDA D. A., ZANDEE D. I., 1987. Occurence of calcium concretions in various tissues of freshwater mussels and their capacity for cadmium squestration. Aquat. Toxicol., 10, 101-114.

RABITSCH W. B., 1996. Metal accumulation in terrestrial pulmonates at a lead/zinc smelter site in Arnolstein, Austria. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 56, 734-741.

RAINBOW P. S., DALLINGER R., 1993. Metal uptake, regulation, and excretion in freshwater invertebrates. In Ecotoxicology of metals in invertabrates (Eds Dallinger R., Rainbow P. S.), 119-131.

RAZET P., 1961. Recherches sur l'uricolyse chez les insectes. Thèse d'Etat Univ. Rennes.

READE P. C., 1968. Phagocytosis in invertebrates. Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 46, 219-229.

REBECCHI B., FRANCHINI A., BOLOGNANI FANTIN A. M., 1996. The digestive gland of *Viviparus ater* (Mollusca, gastropoda, prosobranchia) : an ultrastructural and histochemical study. Tissue & Cell, 28, 6, 731-739.

REGOLI F., ORLANDO E., 1994. Seasonal variation of trace metal concentrations in the digestive gland of the mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* : Comparison between a polluted and a non-polluted site. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 27, 36-43.

REINESKOG M., PETERSSON L. R., 1990. Aluminium, citrate and shell-repair. Effects on the distribution of metals in the snail *Helix pomatia* L. *Comp.* Biochem. Physiol., 95C, 201-206.

RENBERG I., PERSSON M. N., ENRTERYD O., 1994. Preindustrial atmospheric lead contamination detected in swedish lake sediments. Nature, 368, 323 p.

RENWRANTZ L., SCHANCKE W., HARM H., ERL H., LIEBSCH H., GERCKEN J., 1981. Discriminative ability band function of the immunobiological recognition system of the snail *Helix pomatia.* J. Comp. Physiol., 141B, 477-488.

REYNOLDS E. S., 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell. Biol., 17, 208-212.

RICHARDOT M., 1976. Déterminisme de la formation du septum chez *Ferrissia wauthieri* (Mirolli). Données écologiques, biologiques et physiologiques. Thèse, Lyon, n° 76-6.

RICHMOND L., BEEBY A., 1992. A comparative study of lead uptake by three populations of snails *Helix aspersa* Müller. Polish L. Environ. Stud., 1, 9-13.

RIVIÈRE J. L., 1998. Evaluation du risque écologique des sols pollués. Tec. & Doc. Lavoisier, Paris, 230 p.

ROSMAN K. J. R., CHISHOLM W., BOUTRON C. F., CANDELONE J. P., GORLACH U., 1993. Isotopic evidence for the source of lead in Greenland snows since the late 1960's. Nature, 362, 333 p.

RUSSEL L. K., de HAVEN J. I., BOTTS R. P., 1981. Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 26, 634-640.

SAMSØE-PETERSEN L., PEDERSEN F., 1995. Development of guidance for terrestrial effects assessment. Arch. Toxicol. Suppl., 17, 406-419.

SANCHEZ I., PIÑERO J., HIDELGO S., NAVAS P., AIJON J., LOPEZ-CUMPUS J. L., 1980. Ultrastructura del riñon de *Helix aspersa.* Malacol. Norm. Patol., Sec. A., 4, 243-255.

SCHULZ-BALDES M., 1974. Lead uptake from sea water and food, and lead loss in the common mussel *Mytilus edulis.* Mar. Biol., 25, 177-193.

SHEN C. T., BOYLE E. A., 1987. Lead in corals : reconstruction of historical fluxes to the surface ocean. Earth Planet Sci. Lett., 82, 289-304.

SIEGEL S., 1956. The Case of Two Independent Samples in Nonparametric Statistics. (International Student, Eds.), McGraw-Hill, Auckland.

SILVERMAN H., STEFFENS W. L. *et al.* 1985. Calcium from extracellular concentrations in the gills of freshwater unionid mussels in mobilized during reproduction. Journal of Experimental Zoology, 236 (2) : 137-147.

SILVERMAN H., SIBLEY L. D. *et al.* 1987. A calmodulin-like protein associated with calcium concretions in unionid mussels. American Zoologist, 26 (4) : A5-A5.

SILVERMAN H., LYNN J. W., DIETZ T. H., 1986. Particle capture by the gills of *Dreissena polymorpha* : structure and function of latero-frontal cirri. Biol. Bull., 191, 42-54.

SILVERMAN H., Mc NEIL J. W., DIETZ T. H., 1987. Interaction of trace metals Zn, Cd and Mn, with Ca concretion in the gills of freshwater unionid mussels. Can. J. Zool., 65, 828-832.

SIMKISS K., 1981a. Cellular discrimination process in metal accumulating cells. In The mollusca, vol 2, Biochemistry and Physiology, Academic Press, New York, 101-164.

SIMKISS K., 1981b. Calcium, & pyrophosphate and cellular pollution. Trends Biochemi. Sci., 64, 3-5.

SIMKISS K., 1991. Amorphous minerals and theories of biomineralization. In Proc. 6th International Symposium on Biomineralization. Suga S. and Nakahara H., eds., Springer Verlag, Tokyo, 375-382.

SIMKISS K., TAYLOR M. G., 1989. Convergence of cellular systems of metal detoxification. Marine Environmental Research, 28, 211-214.

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

SIMKISS K., TAYLOR M. G., 1994. Calcium magnesium phosphate granules : Atomistic simulations explaining cell death. J. Exp. Biol., 190, 131-139.

SIMKISS K., TAYLOR M. G., GREAVES G. N., 1990. Form of the anion in the intracellular granules of the crab. J. Inorg. Biochem., 39, 17-23.

SKELDING J. M., 1973. The fine structure of the kidney of *Achatina achatina* (L.). Z. Zellforsch, 147, 1-29

SMINIA T., 1972. Structure and function of blood and connective tissue cells of the freshwater pulmonate *Lymnaea stagnalis* studied by electron microscopy and enzyme histochemistry. Z. Zellforsch., 130, 497-526.

SMITH D. R., NIEMEYER S., ESTES J. A., FLEGAL A. R., 1990. Stable lead isotopes evidence anthopogenic contamination in Alaskan sea otters. Environ. Sci. Technol., 24, 1517-1521.

SUMNER A. T., 1965. The cytology and histochemistry of the digestive gland cells of *Helix*. Quart. J. microsc. Sci., 106, 173-192.

SUMNER A. T., 1983. Some aspects of turnover of the digestive gland cells of *Helix aspersa*. J. Moll. Study, 49, 175.

SWAILEH K. M., 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.

SWANSON M. E, STURNER S. F. *et al.* 1990. Structure and expression of the *Aplysia Californica* calmodulin gene. Journal of Molecular Biology, 216 (3) : 545-553.

TAYLOR M. G., 1995. Mechanisms of metal immobilization and transport in cells. In Cell biology in environmental toxicology (Ed Carajaville M. P.), 155-169.

TAYLOR M. G., SIMKISS K., GREAVES G. N., HARRIES J., 1988. Corrosion of intracellular granules and cell death. Proc. R. Soc. Lond., B, 234, 463-476.

TEXIER C, CORTET J, GOMOT A., CLUZEAU D., 1996. La faune indicatrice de la qualité des sols. ADEME Edit. Série Données et Références, 2588, 62 p.

THERET C. G., LALIGERIE P., ALLIET J., 1985. Cytobiologie. Ed. Marketing Paris, 2, 768 p.

THIELE G., 1953. Vergleichende Untersuchungen uber den Feinbau und die Kunktion der Mittledarmdruse einheimischer Gastropoden. Z. Zellforsch., 38, 87-138.

THOMPSON L., THOMAS C. D., RADLEY J. M. A., WILLIAMSON S., LAWTON J. H., 1993. The effect of earthworms and snails in a simple plant community. Oecologia, 95, 171-178.

TIMMERMANS K. R., 1993. Accumulation of trace metals in freshwater invertebrates. In Ecotoxicology of metals in invertabrates (Ed Dallinger R., Rainbow P. S.), 133-148.

TOMPA A. S., WILBUR K. M., 1977. Calcium mobilisation during reproduction in snail *Helix aspersa*. Nature, London, 270, 53-54.

TRUCHET M., MARTOJA R., 1973. Accumulation de l'aluminium et du silicium dans le système macrophagique des amphibiens. C. R. Acad. Sci., Paris, 276D, 995-997.

VAIDYA O. C., RANTALA R. T. T., 1996. A comparative study of analytical methods : determination of heavy metals in mussels (*Mytilus edulis*) from eastern Canada. Intern. J. Environ. Anal. Chem., 63, 179-185.

VERON A., CHURCH T. M. PATTERSON C. C., EREL Y., MERRILL J. T., 1992. Continental origin and industrial sources of trace metals in the northwest atlantic troposphere. J. Atmos. Chem., 14, 339-351.

VINOT I., MORHAIN E., WAGNER Ph., PIHAN J. C., 2000. Circulation du cuivre dans une retenue artificielle (eau, sédiments, organismes). Communication 6ème CILEF, Clermont-Ferrand, 17-21 Juillet.

WALKER A. J., MILLER A. J., GLEN D. M., SHEWRY P. R., 1996. Determination of pH in the digestive system of the slug *Deroceras reticulatum* (Müller) using ion-selective microelectrodes. J. Moll. Stud., 62, 387-390.

WALKER G., 1970. The cytology, histochemistry and ultrastructure of the cell types found in the digestive gland of the slug *Agriolimax reticulatus* (Müller). Protoplasma, 71, 91-109

WATABE N., MEENAKSHI V. R., BLACKWELDER P. L., DUNKULBERGER D. G. KURT E. M., 1976. Calcareous spherules in molluscs with spezial reference to *Pomacea paludosa*. In The mechanisms of mineralization in the invertebrates and plants. Ed. Watabe N. & Wilbur K., University of South Carolina Press, Columbia, 283-308.

WATMOUGH S. A., HUGHES R. J., HUTCHINSON J. C., 1999. $^{206}Pb/^{207}Pb$ ratios in tree rings as monitors of environmental change. Environ. Sci. Tchnol., 33, 670-673.

WILLIAMSON P., 1980. Variables affecting body burdens of lead zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepaea hortensis* Müller. Oecologia, 44, 213.

YAFFE Y., FLESSOL C. P., WESOLWSKI J. J., Del ROSARIO A., GUIRGUIS G. N., MATIAS V., DEGARMO T. E., COLEMAN G., GRAMLICH J. W., KELLY W. R., 1983. Identification of lead sources in California children using the stable isotope ratio technique. Arch. Environ. Health, 38, 4, 237-245.

YOUNG A. G., WILKINS R. M., 1989. A new technique for assessing the contact toxicity of molluscicides to slugs. J. Moll. Stud., 55, 4, 533-536.

ZARTMAN R. E., DOE B. R., 1981. Plumbotectonics- The model. In Evolution of the upper mantle (R. E. Zartman et Taylor, eds.). Tectonophysics, 75, 135-162.

RESUME

L'évaluation du niveau de contamination polymétallique en écosystème terrestre nécessite le choix d'organismes bioindicateurs pertinents. Cette étude valide la capacité bioindicatrice des gastéropodes terrestres. *Helix aspersa aspersa* et *Cepaea nemoralis* présentent des capacités de niveau équivalent. Une grille d'évaluation de la contamination polymétallique avec 4 classes pour 8 métaux a été proposée. L'usage de *Helix pomatia* nécessitera des recherches ultérieures avec établissement d'une grille spécifique. Le choix de *Helix aspersa aspersa* en biosurveillance active est justifié par la possibilité d'obtenir un élevage contrôlé des individus exempts de contamination métallique après amélioration de l'aliment. L'étude des niveaux de bioaccumulation atteints pour 8 métaux, dans des conditions variées (animaux d'élevage, animaux autochtones ou transférés), sur sites non contaminés ou contaminés (proximité autoroutière, trafic urbain, ancienne mine de cuivre, centre d'enfouissement technique remédié, aciérie électrique), a permis de valider la grille d'évaluation du niveau de contamination en conservant 4 classes pour Cu, Mn, Cd, Ni et 5 classes pour Fe, Zn, Cr et Pb. Un bilan obtenu par sommation des différentes classes, inhérentes aux 8 métaux (indice de contamination polymétallique : ICPM), permet une comparaison des niveaux de contamination polymétallique intra-site et inter-sites ainsi que le suivi de mesure de remédiation de sites pollués. Pour le plomb, la distinction entre le plomb d'origine pédogéologique et le plomb provenant des activités anthropiques peut être réalisée par l'étude des rapports isotopiques entre ^{206}Pb, ^{207}Pb et ^{208}Pb qui permet de distinguer le pôle « essence-trafic », le pôle « industrie » et le pôle « nature ».

Des expériences de contamination en laboratoire, en conditions contrôlées, ont permis de participer à la mise au point d'un test de croissance actuellement proposé ISO et validé AFNOR. Ce test peut être, dans l'avenir, associé à un test de bioaccumulation.

Compte tenu des données existantes dans la littérature quant à la contamination par des métaux en solution, le choix s'est porté, sauf pour le cadmium, vers les métaux en ajout sous forme particulaire (Zn, Pb, poussières d'aciérie). Une étude ultrastructurale et microanalytique (EDX et EEL) du néphrocyte a mis en évidence l'existence d'un ergastoplasme ondulé original et celle de la production de concrétions majoritairement constituées de silice amorphe, ce qui est la première description de cette importance chez les organismes autres que les Diatomées et les Radiolaires. La biominéralisation, déjà connue, à base de calcium (pyrophosphates) dans de nombreux types cellulaires a été vérifiée ainsi que son rôle de piégeage. Cette biominéralisation, qu'elle soit liée au calcium (glande digestive, conjonctif) ou à la silice, représente une voie importante de décontamination pour l'organisme, mais aussi vraisemblablement pour l'écosystème dans le sens où les métaux intégrés aux concrétions ne seraient pas ou peu biodisponibles pour les prédateurs. Des schémas explicatifs des voies principales d'absorption, de transport et d'élimination ont été établis pour Si, Al, Pb, Fe, Cu, Zn et Mn.

Les perspectives d'utilisation de *Helix aspersa aspersa* comme bioindicateur de contamination polymétallique sont établies. Son choix parmi les organismes terrestres à retenir dans le cadre de la réalisation d'une Ecothèque est proposé.

Mots clés : Bioindication – Gastéropodes – *Helix aspersa aspersa* – Métaux lourds – Bioaccumulation - Microanalyse

ABSTRACT

The evaluation of the level of the polymetallic contamination in ground ecosystem requires the choice of relevant bioindicator organisms. This study confirms the bioindicative capacity of ground gastropods. *Helix aspersa aspersa* and *Cepaea nemoralis* present capacities of equivalent level. A grid of evaluation of the polymetallic contamination with 4 or 5 classes for 8 metals was proposed. The use of *Helix pomatia* will require later researches with establishment of a specific grid. *Helix aspersa aspersa* choice in active biosurvey is justified by the possibility of obtaining a controlled farming by the individuals exempt from metal contamination after improvement of the food. The study of the levels of bioaccumulation reached for 8 metals, in varied conditions (farming animals, autochtonous or transferred animals), on not contaminated or contaminated sites (motorway, urban traffic, old coppermine, Technical Hiding Center, electric steelworks), allowed to validate the grid of evaluation of the level of contamination by keeping 4 classes for Cu, Mn, Cd, Ni and 5 classes for Fe, Zn, Cr and Pb. A balance was obtained by addition of the various classes, inherent to 8 metals (polymetallic contamination indice: ICPM), allows a comparison of the levels of polymetallic contacontamination intra-site and inter-sites as well as the follow-up of measure of remédiation of polluted sites. For the lead, the distinction between the lead of pedogeological origin and the lead resulting from anthropogenic activities can be realized by the study of isotopic ratio among ^{206}Pb , ^{207}Pb and ^{208}Pb who allows to distinguish the pole "petrol - traffic", the pole "industry" and the "wild" pole.

Experiments of contamination in laboratory, in controlled conditions, allowed to participate in the settling of a test of growth at present validated ISO. This test can be, in the future, associated to a test of bioaccumulation.

Considering the existing data in the literature as for the contamination by metals in solution, the choice went, safe for the cadmium, towards metals in addition under particulate condition (Zn, Pb, dusts of steelworks). An ultrastructural and microanalytical study (EDX and EEL) of the nephrocyte put in evidence the existence of an original wavy ergastoplasm and that of a production of concretions mainly constituted by amorphous silica, what is the first description of this importance to the organisms others than Diatoms and Radiolaria. The biomineralization, already known, on base of calcium (pyrophosphates) in numerous cellular types was verified as well as its role of trap. This biomineralization, that it is bound to the calcium (digestive gland, conjunctive) or in the silica, represents an important way of decontamination for the organism, but also likely for the ecosystem. The metals integrated into the concretions would not be or only a little bioavailable for the predators. Explanatory plans of the main ways of absorption, transport and elimination were established for Si, Al, Pb, Fe, Cu, Zn and Mn.

The perspectives of *Helix aspersa aspersa* use as bioindicator of polymetallic contamination are established. His choice among the ground organisms to be retained within the framework of the realization of Ecotheque is proposed.

Key words : Bioindication – Gastropods – *Helix aspersa aspersa* – Heavy metals – Bioaccumulation - Microanalysis

ANNEXE :
LEGENDE DES PLANCHES DE L'ETUDE HISTOLOGIQUE

	Abréviations	*Légende*
A	***Ac.***	Actine
	Al.	Aliment
	Aur.	Acide urique
B	***B.Br.***	Bordure en brosse
C	***C.***	Concrétion
	C.C.	Cell coat
	C.C.Ca.	Concrétion de la cellule à calcium
	C.C.G.D.	Cellule du canal de la glande digestive
	C.Ca.	Cellule à calcium de la glande digestive (cellule basophile)
	C.Ca.Cj.	Cellules à calcium du conjonctif
	C.Cj.	Capsule conjonctive
	C.D.	Cellule digestive
	C.D.Exc.	Cellule digestive en phase excrétrice
	C.D.Gd.	Cellule digestive de la glande digestive
	C.Ed.+	Couche électrondense
	C.j.	Conjonctif
	C.Ed.-	Couche peu électrondense
	C.M.	Crête mitochondriale
	C.N.	Concrétion du néphrocyte
	C.P.	Cellules à pores (« pore cells »)
	C.Pi.	Cellule pigmentée
	C.Pn.	Citerne périnucléaire
	C.r.-C.R.	Corps résiduel (système lysosomial, lipofuscine, figures myéliniques)
	C.REL.	Citerne du REL
	C.REL.C.	Citerne du REL avec condensat
	C.S.M.	Crête sacculaire mitochondriale
	C.Ur.	Canal urinaire primaire
	C.V.	Coalescence de vésicules
	Cj. P.	Conjonctif pédieux
	Cj. P.I.	Conjonctif péri-intestinal
	Cj.P.R.	Conjonctif péri-rénal
	Co.	Fibres de collagène
	Co.V.A.	Colloïdes de la vacuole apicale
	Cu.RE.	Cupule du réticulum endoplasmique lisse
D	***D.***	Desmosome
	D.C.	Déchets cellulaires
	D.Pu.	Déchets puriques
	De.	Desmosome cloisonné = jonction septée
E	***E.D.***	Epithélium dorsal
	E.D.X.	Analyse X
	Eh.	Entérohépatocyte
	E.E.L.S.	Analyse par perte d'énergie
	E.I.	Espace intercellulaire
	E.In.	Epithélium intestinal
	End.	Endocytose
	E.V.	Epithélium ventral
F	***F.***	Fente de filtration
	Fl.REL.	Floculum lié au REL
	Fl.VA.A.	Floculum vacuolaire
	F.M.	Figure myélinique (système lysosomial)
	F.N.-N.F.	Fibre nerveuse

	Abréviations	*Légende*
G	***G.***	Appareil de Golgi (dictyosome)
	G.Cy.	Granule cytoplasmique
	G.D.	Glande digestive
	Gl.	Glycogène
	Gr.M.	Grain métallique
	Gr.M.Al.	Granule métallique dans l'alimentation
	Gr.M.Eh.	Granule métallique d'entérohépatocyte
	Gr.M.Cj.	Granule métallique de cellule du conjonctif
	Gr.M.H.	Granule métallique dans l'hémocyte
	G.S.	Grain de sécrétion
H	***H.***	Hémocyte
	Hc.	Hémocyanine
	He.	Hémolymphe
	Het.	Hétérochromatine
I	***I.D.***	Interdigitation
	I.L.	Inclusion lipidique
	I.Mb.Pl.L.	Invagination de la membrane plasmique latérale
	Inv.	Invagination de la membrane plasmique
J	***J.S.***	Jonction serrée = « tight junction »
L	***L.***	Lumière
	L.B.	Lame basale
	L.C.U1.	Lumière du canal urinaire primaire
	L.C.G.D.	Lumière du canal de la glande digestive
	L.E.I.	Lésion de l'épithélium intestinal
	L.G.D.	Lumière de la glande digestive
	L.I.	Lumière intestinale
	L.R.	Lumière rénale
	L.Va.	Liquide vacuolaire
	La.R.	Lamelle rénale
	Lf.	Lipofuscine
	Ly.	Lysosome
	Ly1.	Lysosome primaire
	Ly2.	Lysosome secondaire (phagolysosome)

	Abréviations	*Légende*
M	***M.***	Mitochondries
	Mc.	Mucocyte
	M.D.	Mitochondrie en division
	M.F.	Mitochondrie filamenteuse et branchée
	M.M.	Matrice mitochondriale
	M.P.	Matrice du péroxysome (catalases)
	Mb.L.	Membrane du lysosome
	Mb.M.Ext.	Membrane mitochondriale externe
	Mb.M.Int.	Membrane mitochondriale interne
	Mb.N.	Membrane nucléaire
	Mb.P.	Membrane du péroxysome
	Mb.P.A.	Membrane plasmique apicale
	Mb.P.B.	Membrane plasmique basale
	Mb.P.L.	Membrane plasmique latérale
	Mb.Ph.Ly.	Membrane du phagolysosome
	Mb.V.C.	Membrane de la vacuole à concrétion
	Mb.Va.	Membrane de la vacuole apicale
	M.E.T.	Microscopie électronique à transmission
	M.P.	Matrice du péroxysome
	Mt.	Microtubule
	Mu.	Fibre musculaire
	Mv.	Microvillosités
N	***N.***	Noyau
	N.C.	Noyau de la concrétion
	N.Ne.	Noyau du néphrocyte
	N.Py.	Noyau pycnotique
	Ne.	Néphrocyte
	Ne.F.	Néphrocyte au stade final
	Ne.I.	Néphrocyte intermédiaire
	Ne.J.	Néphrocyte jeune
	Neu.	Neurocyte
	Nu.	Nucléole
	Nui.P.	Nucléoïde du péroxysome (uricase cristallisée formant un rhomboïde
	Nup.	Nucléoplasme
P	***P.***	Péroxysome
	P.C.	« Pore cell »
	P.Ca.	Grain de phosphate de calcium
	P.Ca.M.	Grain de phosphate de calcium (mitochondrial)
	P.Ex.	Produits d'excrétion
	P.F.	Péroxysome en formation
	Phly.	Phagolysosomes

	Abréviations	*Légende*
R	***R.***	Rein
	R.L.	Ribosomes libres
	REG.	Réticulum endoplasmique rugueux
	REL.	Réticulum endoplasmique lisse
	REL.Cu.	Cupule du REL, péri-péroxysome
	REL. L.Pn.	REL lamellaire périnucléaire
	REL.On.	REL ondulé
	REL.T.D.	REL tubulaire dense
	REL.T.L.	REL tubulaire lâche
	REL.T.Pn.	REL tubulaire périnucléaire
S	***S.R.***	Sac rénal
	S.S.	Sinus sanguin
	S.S.L.R.	Sinus sanguin de la lamelle rénale
	Si.	Silice amorphe
U	***Ul.***	Uretère primaire
	U.F.	Ultra-filtrat
	U.P.	Urine primaire
V	***V.C.***	Vacuole à concrétion
	V.E.	Vésicule d'endocytose = vésicule à manteau (micropinocytose)
	V.I.Va.	Vésicule intra-vacuolaire
	V.L.	Vésicule lipidique
	Va.	Vacuole
	Va.A.-VA.A.	Vacuole apicale
	Va.D.	Vacuole digestive
	Va.D.M.	Vacuole digestive avec présence de plomb
	Va.M.	Vacuole contenant des métaux
Z		*Zonula adhaerens*