



Université
de Toulouse

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse)

Discipline ou spécialité :

Hydrologie, Hydrochimie, Sols, Environnement

Présentée et soutenue par :

M. THIBAUT LEVEQUE

le vendredi 24 octobre 2014

Titre :

BIOMONITORING ENVIRONNEMENTAL ET SANITAIRE DES SOLS
POLLUES PAR LES ELEMENTS TRACES METALLIQUES

Ecole doctorale :

Sciences de l'Univers de l'Environnement et de l'Espace (SDUEE)

Unité de recherche :

Ecologie Fonctionnelle (ECOLAB)

Directeur(s) de Thèse :

MME CAMILLE DUMAT

M. YVAN CAPOWIEZ

Rapporteurs :

M. FRANCK VANDENBULCKE, UNIVERSITE LILLE 1

M. JUAN CARLOS SANCHEZ-HERNANDEZ, UNIVERSITE CASTILLA LA MANCHA ALBACETE

Membre(s) du jury :

M. FRANCK VANDENBULCKE, UNIVERSITE LILLE 1, Président

M. FREDERIC DEOLA, SOCIETE TRAITEMENT CHIMIQUE DES METAUX, Membre

Mme CAMILLE DUMAT, INP TOULOUSE, Membre

Mme CECILE GRAND, ADEME ANGERS, Membre

Mme EVA SCHRECK, OBSERVATOIRE MIDI PYRENEES, Membre

Mme MARTINE KOLF CLAUW, ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE, Membre

M. YVAN CAPOWIEZ, INRA AVIGNON, Membre

Remerciements

Nous y sommes... Trois années ont passé. Les six derniers mois ont été éprouvants pour ne pas dire un « mauvais rêve éveillé ». Mais je suis bien réveillé maintenant et il est temps de faire le bilan. J'ai été, on ne peut plus chanceux, de vivre cette expérience très intense que sont trois ans de thèse. J'ai tellement appris et découvert, en résumé j'ai cherché. Ceci n'aurait pas été possible sans toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin à ce travail de thèse. Ces quelques mots sont pour vous, même s'ils ne reflètent qu'une infime partie de ce que vous avez pu m'apporter. « A Vous, les Auvergnats, Avignonnais, Toulousains ..., qui, sans façon, m'ont donné quatre coups de mains quand dans ma vie j'en eu besoin ! »

Camille Dumat, ma directrice de thèse, un gigantesque, gargantuesque, énorme MERCI à toi, qui a su, par cette aura de dynamisme qui te caractérise, partager ton enthousiasme et ta motivation. Tu as su tirer le meilleur de moi-même. Je n'oublierai pas nos réunions de travail au bord du canal et tout le temps que tu as pu me consacrer. Yvan Capowiez, mon co-directeur de thèse, un grand merci aussi pour toute l'aide que tu as pu m'apporter, pour nos campagnes terrain à Bazoches les Gallerandes et pour nos discussions vers de terre.

Un très grand merci à l'ADEME et à la STCM, pour avoir soutenu financièrement ce projet mais pas seulement. Merci à M. Deola, directeur de la STCM, pour les relectures, les comités de pilotages et pour ses points de vue appliqués sur mon travail. Merci également à Cécile Grand, ingénieur ADEME, pour ses réflexions et l'aide apportée lors des comités de thèse. Mais aussi merci à M. Pradere, Mr Touzot, Mr Allegris et leur équipe.

Merci à la Direction du laboratoire EcoLab, notamment l'équipe « Biogéochim », pour m'avoir accueilli. Un grand merci aux techniciennes, Marie-Jo et Virginie qui se sont toujours montrées disponibles pour nous aider et nous orienter dans les dédales du Laboratoire. Merci à Annick, pour sa gentillesse et sa disponibilité.

Merci à mes collègues de laboratoire !! Eva, pour tout le temps que tu as consacré en relecture, en travail sur les publications mais aussi pour ta gentillesse et tes conseils, je ne te remercierai jamais assez. Merci également à Yann, mon compère de thèse auprès de Camille. Tu vogues maintenant vers de nouveaux horizons, mais n'oublie pas d'où nous venons : Bazoches les Gallerandes « the place to be ». Je n'oublie pas non plus Arnaud, merci pour les leçons de cartographie, mais surtout merci pour nos parapentes-trips passés et futurs. L'idée de retourner voler sous le soleil des Pyrénées a rendu plus facile l'écriture de ce manuscrit. Merci Sylvaine, ma collègue « cytotoxique », pour ce séjour d'apprentissage de la culture cellulaire à Paris, pour ton humour, ta bonne humeur (parfois !) et ta gentillesse. Merci également à tous mes collègues de bureau passés et présents : Annabelle, Cyril,

Adrien, Laurent, Agathe, Léonard, Youhen, Shaolin, TianTian, Christophe, Allison, Simon...
Merci pour les pauses cafés/clopes et les fous rires.

Je m'excuse auprès des stagiaires qui ont dû tamiser 12 tonnes de terre par 35°C en tenue de cosmonaute, récolter des vers de terre et synthétiser du jus d'estomac : Anne-Marie, Adrian, Graziella, Aurélie, Christian, Marina et Laura. Merci beaucoup à vous, et désolé pour ce travail de forçat.

J'adresse mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui ont contribuées à la réalisation de ce travail : Mélanie Auffan (CEREGE), Christophe Mazzia (Univ-Avignon), Armelle Baeza (Paris Diderot VII), Sophie Sobanska (LASIR), Nicolas Papon (Univ Philippe Maupas) etc. Merci à tous pour vos conseils et votre aide.

Une mention particulière à toutes les personnes rencontrées à Düsseldorf , Roël Shins, Catrin Aldrecht, Waluree, Daniela, Andrea etc. Merci pour votre accueil chaleureux, votre soutien et votre initiation à la culture cellulaire et au « curry wurst ».

Ces années n'auraient pas été les mêmes sans mes amis Toulousains : Gouj, Alex, Margaux, Nathan, Befu, Nico, Arnaud, Pierrot, Rémi, Mathile, Guigui, Élo, et bien d'autres. Merci pour les sorties, les fous rires, les jeux et tout ce qui rend la vie agréable. Je pense aussi à tous ceux qui sont restés dans nos contrées solognotes ou partis plus loin : Djé, Max, Gonz, Solène, Sylvie, Cyril, Titi... Mention spéciale à Vincent pour ton accueil à Paris et pour m'avoir rejoint en Allemagne (Berlin baby !!). Promis bientôt « on va à la plage ».

Des excuses dans tous ces remerciements, pour mes amis les vers de terre, que j'ai congelés, frits puis dissous par dizaines durant ces trois ans. Vous comprendrez peut-être un jour que c'était pour votre bien. Pardon.

Merci à ma famille, pour m'avoir toujours épaulé, encouragé et soutenu durant mes longues années d'études. Mes parents, ma soeurette et ma grand-mère, je ne vous remercierai jamais assez. Sœur, je te souhaite plein de réussite pour tes débuts de thèse, je te passe le relais.

Enfin, parce qu'on garde toujours le meilleur pour la fin, merci infiniment Puce, pour tout ton soutien, ta confiance en moi, les galères et les merveilleux moments passés ensemble. Si j'en suis là c'est aussi et évidemment grâce à toi.

Glossaire

APSM: Affinerie de Pont Sainte Maxence

BARGE: BioAccessibility Research Group of Europe

DJT: Dose Journalière Tolérable

DREAL: Direction Régionale de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement

EQRS: Evaluation Quantitative des Risques Sanitaires

ETM: Eléments Traces Métalliques

EXAFS: Extended X-Ray Adsorption Fine Structure

ICP-MS: Induced Coupled Plasma-Mass Spectrometry

ICP-OES: Induced Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry

ICPE: Installation Classée pour la Protection de l'Environnement

ITE: Inorganic Trace Elements

μXRF: X-Ray micro-fluorescence

PM: Particulate matter

PPRT: Plan de Prévention des Risques Technologiques

REACH: Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals

SEM-EDS: Scanning Electron Microscopy with X-ray microanalysis/ Energy Dispersive X-ray Spectroscopy

SIG: Système d'information géographique

STCM: Société de Traitements Chimiques des Métaux

SVHC: Substance of Very High Concern

UBM: Unified Barge Method

VTR: Valeur Toxicologique de Référence

XRD: X-Ray Diffraction

Tables des matières

<i>Remerciements</i>	3
<i>Glossaire</i>	5
<i>Tables des matières</i>	6
<i>Chapitre 1</i>	12
<i>Contexte scientifique et objectifs</i>	12
1.1. Introduction générale.....	13
1.2. Pollution du sol par les ETM	16
1.2.1 Origines	16
1.2.1.1 Sources naturelles d'ETM.....	16
1.2.1.2 Origines anthropogéniques	16
1.2.2 Propriétés physico-chimiques des ETM.....	18
1.2.2.1 Compartimentation/spéciation.....	18
1.2.2.2 Mobilité	18
1.3. Les vers de terre et les ETM dans les sols	20
1.3.1 Vers de terres « ingénieurs de l'écosystème ».....	20
1.3.2 Taxonomie et catégories écologiques.....	20
1.3.3 Impact des vers de terre sur l'écosystème terrestre.....	22
1.3.3.1 Les galeries.....	22
1.3.3.2 Les turricules	23
1.3.4 Vers de terre et ETM.....	23
1.3.4.1 Intérêts en écotoxicologie.....	23
1.3.4.2 Impact des vers de terre sur la mobilité des ETM	24
1.4. Risques pour la santé humaine et ETM	25
1.4.1 Évaluation quantitative des risques sanitaires.....	25
1.4.2 Les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité.....	26
1.5. Objectifs de la thèse	29
<i>Chapitre 2</i>	32
<i>Matériels et Méthodes</i>	32
2.1. Présentation des sites d'études	32

2.1.1 La Société de Traitements Chimiques des métaux (STCM)	32
2.1.1.1 Présentation de l'entreprise.....	32
2.1.1.2 Qualité, sécurité et politique environnementale.....	33
2.1.1.3 La STCM Toulouse	33
2.1.1.4 La STCM Bazoches les Gallerandes	34
2.1.2 Ancienne mine de plomb et d'argent de Pongibaud.....	35
2.2. Étude de l'écotoxicité des ETM.....	37
2.2.1 Expérimentations en conditions contrôlées	37
2.2.1.1 Échantillonnage des sols et préparation.....	37
2.2.1.2 Les espèces de vers de terre utilisées.....	38
2.2.1.3 Les tests écotoxicologiques.....	39
2.2.2 Expérimentation sur le terrain	40
2.2.2.1 Échantillonnage des sols et préparation.....	40
2.2.2.1 Échantillonnage des vers de terre	41
2.3. Étude du transfert des ETM.....	42
2.3.1 Expérimentation en microcosmes	42
2.3.1.1 Échantillonnage des sols et préparation.....	42
2.3.1.2 Présentation des espèces de vers de terre	42
2.3.1.3 Protocole expérimental.....	43
2.3.2 Le RHYZOtest.....	45
2.3.2.1 Principe	45
2.3.2.1 Protocole.....	46
2.4. Biodisponibilité des ETM et impacts sur la santé humaine.....	48
2.4.1 Mesure de la bioaccessibilité gastro-intestinale	48
2.4.2 Étude de la cytotoxicité intestinale des ETM.....	50
2.4.2.1 La lignée cellulaire d'étude : Caco-2.....	50
2.4.2.2 La culture cellulaire des Caco-2.....	51
2.4.2.3 Les tests d'étude de la cytotoxicité	51
Chapitre 3.....	54
<i>Evaluation de l'écotoxicité des métaux sur les vers de terre</i>	<i>54</i>
3.1. Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species (Eiseina hortensis and Lumbricus terrestris)	56
3.1.1 Introduction	57

3.1.2 Materials and methods	58
3.1.2.1 Soil preparation	58
3.1.2.2 Earthworms.....	59
3.1.2.3 Experimental set-up	60
3.1.2.4 Ecotoxicity parameters	60
3.1.2.5 Metal bioaccumulation	61
3.1.2.6 Micro-X-ray fluorescence (μ XRF) experiments.....	62
3.1.2.7 CaCl ₂ extraction	62
3.1.3 Results	63
3.1.3.1 Mortality and biomass changes	63
3.1.3.2 Cast production.....	63
3.1.3.3 Metal bioaccumulation	63
3.1.3.4 Lead distribution within earthworm tissues: μ XRF.....	64
3.1.3.4 CaCl ₂ extraction	65
3.1.4 Discussion	65
3.1.4.1 Viability and ecotoxicity	65
3.1.4.2 Metal bioaccumulation	69
3.1.4.3	71
Uptake mechanisms and ecotoxicity test sensitivity	71
3.1.5 Conclusions et perspectives	74
3.2. Effects of an metal(loid)s historic pollution on earthworms communities	79
3.2.1 Introduction	82
3.2.2 Materials and Methods	83
3.2.2.1 Description of the study site and sampling strategy	83
3.2.2.2 Soil characteristics	83
3.2.2.3 Determination of total and exchangeable metal(loid) concentrations in soils and earthworm casts	84
3.2.2.4 Determination of earthworm abundance and diversity.....	85
3.2.2.5 Metal(loid) accumulation in earthworms	85
3.2.2.6 Statistical analysis.....	86
3.2.3 Results	86
3.2.3.1 Chemical analysis of soil samples	86
3.2.3.2 Earthworms communities along the contamination gradient.....	88
3.2.3.3 Metal(loid) concentration in <i>A. longa</i> earthworms.....	88
3.2.4 Discussion	90

3.2.4.1 Earthworm abundance	90
3.2.4.2 Species diversity in relation to metalloid concentrations	90
3.2.4.3 The adult to juvenile ratio.....	94
3.2.5 Conclusions and perspectives.....	95
3.3 Communauté de vers de terre et cartographie, outils intéressants pour la gestion des sites et sols pollués.....	101
<i>Chapitre 4.....</i>	106
<i>L'influence de la bioturbation des vers de terre sur les transferts des ETM.....</i>	106
4.1. Earthworms bioturbation influences the phytoavailability of metals released by particles in cultivated soils.....	108
4.1.1 Introduction	109
4.1.2 Materials and methods.....	110
4.1.2.1 Soil preparation	110
4.1.2.2 Earthworms.....	111
4.1.2.3 Experimental set-up	111
4.1.2.4 Phytoavailability measurements.	112
4.1.2.5 Assessment of earthworm induced macroporosity.....	114
4.1.2.6 Statistical analyses	114
4.1.3 Results	114
4.1.3.1 Earthworms survival and biomass	114
4.1.3.2 Effect of earthworm activity on lettuce growth and metal phytoavailability.....	115
4.1.3.3 Behavior and impact of earthworms in polluted soils.....	116
4.1.4 Discussion	118
4.1.4.1 Impact of metals on earthworms	118
4.1.4.2 Influence of earthworm activity on metal phytoavailability inrelation with soil properties and metal compartmentalization.....	119
4.1.5 Conclusions and perspectives.....	122
4.2. Influence de la bioturbation des vers de terre sur la phytodisponibilité des ETM : RHIZOtest®.....	128
4.2.1 Matériel et méthodes	129
4.2.1.1 Echantillonnage des sols et préparation.....	129
4.2.1.2 Ver de terre	129
4.2.1.3 Protocole expérimental	129
4.2.2 Résultats et discussion	133

4.2.2.1 Concentrations en ETM dans les sols	133
4.2.2.2 Survie des vers de terre et biomasse	133
4.2.2.3 Evolution de la biomasse des laitues	135
4.2.2.4 Concentration des ETM dans les feuilles de laitues	136
4.2.3 Conclusions et perspectives	140
Chapitre 5.....	142
<i>Effets des métaux sur la santé humaine et évaluation des risques sanitaires</i>	<i>142</i>
5.1. Quels sont les différents paramètres influençant la bioaccessibilité des ETM ?	
143	
5.1.1 Les paramètres physico-chimiques du sol.....	143
5.1.1.1 Matériel et Méthodes.....	143
5.1.1.2 Résultats et discussion.....	144
5.1.2 La concentration totale en Pb dans le sol	150
5.1.2.1 Matériel et méthodes.....	150
5.1.2.2 Résultats et discussion.....	151
5.1.3 La taille des particules et la spéciation	151
5.1.3.1 Matériel et méthodes.....	151
5.1.3.2 Résultats et discussion.....	153
5.1.4 La compartimentation dans le sol	155
5.1.4.1 Matériel et méthodes.....	155
5.1.4.2 Résultats et discussion.....	155
5.1.5 La matrice végétale.....	158
5.1.5.1 Matériel et Méthodes.....	158
5.1.5.2 Résultats et discussion.....	159
5.1.6 Influence de la bioturbation des vers de terre	161
5.1.6.1 Matériel et méthodes.....	161
5.1.6.2 Résultats et discussion.....	161
5.1.7 Conclusion.....	166
5.2. Toxicité des ETM sur les cellules épithéliales intestinales humaines	169
5.2.1 Matériels et méthodes	170
5.2.1.1 Matériel	170
5.2.1.2 Propriétés physico-chimiques des particules	170
5.2.1.3 Evaluation du risque pour la santé humaine.....	171
5.2.1.4 Statistiques.....	172

5.2.2 Résultats et discussion	173
5.2.2.1 Propriétés physico-chimiques des particules	173
5.2.2.2 Bioaccessibilité gastrique des particules	176
5.2.2.3 Cytotoxicité intestinale des particules	177
5.2.3 Conclusion	185
<i>Conclusions générales et Perspectives</i>	<i>187</i>
<i>Valorisation des travaux</i>	<i>193</i>
<i>Bibliographie.....</i>	<i>199</i>
<i>Résumé.....</i>	<i>213</i>

Chapitre 1

Contexte scientifique et objectifs

Le manuscrit se présente sous la forme d'un premier chapitre d'introduction générale (avec une analyse bibliographique) qui se termine par une présentation des objectifs, puis d'un second chapitre de méthodologie ; la section résultats et discussion est articulée en 3 chapitres : écotoxicité des ETM (Eléments Traces Métalliques) pour les écosystèmes terrestres (chapitre-3); transferts dans les sols et biodisponibilité : plantes, vers de terre et homme (chapitre-4); impact des pollutions métalliques sur la santé humaine (chapitre-5). La conclusion générale reprend les principaux résultats obtenus dans cette thèse et présente également une discussion générale focalisée sur la compréhension des mécanismes et l'étude des liens (éco)toxicité & transfert. Des perspectives à ce travail, une liste des références bibliographiques et des annexes relatives à la valorisation des résultats de thèse clôturent le document.

1.1. Introduction générale

En raison de leurs nombreuses applications industrielles et agronomiques, de leur omniprésence dans les écosystèmes et de leur forte persistance, les **métaux et métalloïdes** sont des contaminants majeurs de l'environnement (Dumat et al., 2001 ; Chen et al., 2005 ; Dumat et Austruy, 2014). Potentiellement toxiques pour les organismes vivants (même à faible concentration pour certains éléments comme le cadmium), ces polluants induisent un risque sanitaire en particulier lors de la contamination des plantes consommées par l'Homme (Canfield et al., 2003 ; Alexander et al., 2006 ; Mouchet et al., 2008 ; Uzu et al., 2009 ; Xiong et al., 2014). C'est pourquoi les quantités totales de métaux émises dans l'environnement par les entreprises ont été réglementées fortement réduites ces dernières années. Elles sont désormais strictement contrôlées en Europe (Glorennec et al., 2007), en particulier pour le cadmium classés substances préoccupantes (SVHC) par le règlement européen REACH (EC 1907/ 2006) qui impose leur suivi tout au long du cycle de vie.

Cependant des particules métalliques fines (notées PM) sont toujours émises dans l'environnement. Les entreprises de recyclage de batteries plomb-acide sont actuellement la principale source d'émissions atmosphériques de particules riches en plomb et autres métaux et métalloïdes (Foucault et al., 2013), c'est-à-dire les Éléments Traces Métalliques (notés ETM) : Pb, Cd, Cu, Zn, As, Sb.... Ces émissions atmosphériques sont une source de contamination des écosystèmes terrestres et de toxicité pour les organismes qu'ils hébergent.

En raison de ses influences importantes et variées sur le fonctionnement du sol, le ver de terre est un organisme clé pour évaluer l'impact des ETM sur cet écosystème terrestre. Les vers de terre sont exposés selon différentes voies de pollution en relation avec les caractéristiques du sol ou la compartimentation des ETM. Ils sont donc des organismes pertinents pour étudier l'écotoxicité des métaux et métalloïdes. De plus, comme mentionné par Capowiez et al. (2010), il y a un manque de tests écotoxicologiques écologiquement pertinents, c'est à dire adaptés et reliés au rôle écologique des différentes espèces dans le sol. D'autre part, les activités de bioturbation des vers de terre, telles que la création de galeries, la production de turricules et l'enfouissement des matières organiques de surface peuvent, avoir d'importantes conséquences sur les propriétés du sol. Les vers de terre peuvent donc ainsi influencer le devenir des ETM, en modifiant leur mobilité (Ruiz et al., 2011; Udovic et al., 2007), leur spéciation (Sizmur et al., 2011) et leur disponibilité (Coourdassier et al., 2007;

Ruiz et al., 2011). Cependant, les modifications induites par la bioturbation des vers de terre pourraient être moins significatives si la toxicité des ETM impactait le comportement des vers (Vorenhout et al., 2000). En effet, il existe un lien entre d'une part l'impact de la bioturbation des vers sur le devenir des polluants et d'autre part les effets toxiques sur les vers (Eijsackers, 2001).

L'ingestion est la principale voie d'exposition aux polluants inorganiques pour les humains. Les légumes étant des constituants majeurs du régime alimentaire de la population mondiale (Mansour et al., 2009), les végétaux pollués représentent donc une source de contamination importante pour les êtres humains. De plus, depuis plusieurs années les concentrations en ETM dans les fruits et légumes sont réglementées en France et en Europe. C'est pourquoi, déterminer comment les ETM sont absorbés par les plantes, accumulés et peuvent finalement entrer dans la chaîne alimentaire humaine est devenu un enjeu primordial pour l'évaluation des risques sanitaires induits par les pollutions environnementales aux ETM (Polichetti et al., 2009; Shahid et al., 2013). Le sol en lui-même est une source de contamination prédominante pour les jeunes enfants (0 à 6 ans), en effet, indépendamment des comportements de type géophagie, il a été évalué qu'un enfant peut ingérer 100 à 150mg/jour de terre par comportement de portage main-bouche (USEPA, 1997 ; Ellis et Schnoes, 2005). Lors d'une démarche d'évaluation des risques sanitaires liés à l'ingestion de contaminants, il est couramment considéré que c'est la concentration totale d'une substance présente dans une matrice qui est responsable de l'effet toxique sur l'être humain (Oomen et al., 2006). Mais, cette méthode ne prend pas en compte les notions de bioaccessibilité et biodisponibilité des polluants. Or de nombreuses études récentes ont montré que la fraction biodisponible d'un élément est souvent beaucoup plus faible que sa quantité totale dans une matrice donnée (Caboche, 2009 ; Denys et al., 2007). Ainsi, il apparaît nécessaire de considérer la biodisponibilité humaine afin d'affiner les évaluations des risques sanitaires liés à l'exposition aux ETM présents dans des végétaux ou sols pollués ingérés.

Dans ce contexte, il paraît indispensable d'étudier de façon détaillée **l'influence des facteurs biotiques (comme la bioturbation des vers de terre) et abiotiques (comme la compartimentation des ETM) sur la biodisponibilité des ETM (phytobiodisponibilité et bioaccessibilité), leur écotoxicité (pour les vers de terre) et leur toxicité pour l'homme et de développer de nouveaux outils ou batteries de tests permettant une meilleure évaluation des risques.**

La figure I.1.1 représente le contexte scientifique général de ces travaux et les interrelations entre les différents compartiments de notre étude.

Ce travail de thèse participe à clarifier le lien « Santé humaine-Environnement » et à éclairer les mécanismes en jeu dans le système sol-plante-vers de terre-ETM.

Plus précisément les objectifs scientifiques sont de :

- i) évaluer la toxicité des ETM sur un organisme clé du sol : le ver de terre ;
- ii) déterminer l'influence du ver sur la biodisponibilité des ETM dans les sols ;
- iii) étudier la biodisponibilité des ETM pour l'Homme et leur impact sur le tractus gastro-intestinal.

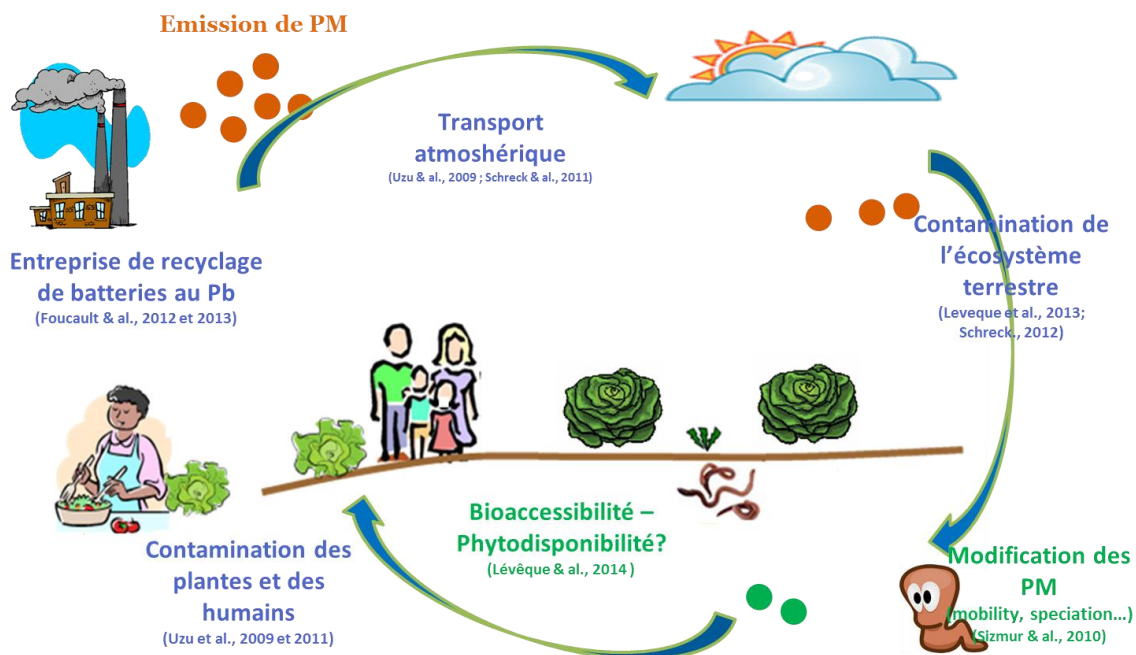


Figure I.1.1: Schéma représentant le contexte scientifique général de la thèse

1.2. Pollution du sol par les ETM

1.2.1 Origines

1.2.1.1 Sources naturelles d'ETM

Des ETM sont naturellement présents dans tous les sols. Ainsi, leur seule présence n'est pas indicative de pollution. Selon [Baize \(1997\)](#), le fond géochimique naturel du sol est la concentration d'un élément dans le sol résultant de l'évolution naturelle sans aucun apport d'origine humaine. Le tableau I.2.1 présente les concentrations en ETM du fond géochimique naturel des sols français (Baize, 1997). Ce niveau de concentration dépend de la roche mère à l'origine du sol et des processus biogéochimiques de pédogénèse tels que l'altération, la lixiviation, la migration, la redistribution des matières minérales et organiques, qui se sont produits lors des périodes géologiques de la formation du sol. Le fond naturel géochimique d'un sol varie ainsi largement selon la zone géographique. Les concentrations en ETM dans les sols non contaminés par les activités humaines sont directement liées à la géologie de la roche-mère à partir de laquelle le sol a été formé. C'est pourquoi, selon la géologie locale, les concentrations en ETM dans les sols peuvent fortement varier et même parfois présenter des teneurs très élevées regroupées sous le terme d'anomalies géochimiques ([Dumat & Austruy, 2014](#)).

Elément	<i>Cd</i>	<i>Co</i>	<i>Cr</i>	<i>Cu</i>	<i>Ni</i>	<i>Pb</i>	<i>Zn</i>	<i>Mn</i>	<i>Fe</i>
Concentration moyenne dans les sols français (mg kg ⁻¹ DW)	0.4	17.1	75.0	14.9	41.3	64.8	149	1585	3.6

Tableau I.2.1: Fond géochimique naturel des ETM (Baize, 1997)

1.2.1.2 Origines anthropogéniques

Comme décrit sur la figure I.2.1, la pollution anthropogénique des sols a différentes origines : les industries, l'agriculture, les activités domestiques ou urbaines.... La contamination diffuse des sols est généralement associée aux dépôts atmosphériques (émissions industrielles ou automobiles) ([Uzu et al., 2009](#)). Les produits conçus pour

améliorer les propriétés physico-chimiques des sols sont souvent riches en ETM (fertilisateurs, composts) (Luo et al., 2011). En conséquence, de nombreuses substances chimiques peuvent se retrouver dans les sols après transfert depuis les compartiments air et eau en interaction (Ali et al., 2013). Les polluants organiques pourront être pour partie biodégradés mais les ETM sont persistants dans les sols. Les déchets miniers et industriels sont une source particulièrement importante de pollution des sols en plomb, cadmium et zinc. Au cours des dernières décennies, la quantité des ETM dans les sols de notre planète a augmentée ; elle est actuellement estimée à 783.000 tonnes de plomb, 22.000 t de cadmium, 939.000 t de cuivre et 1.350.000 t de zinc (Singh et al., 2003).

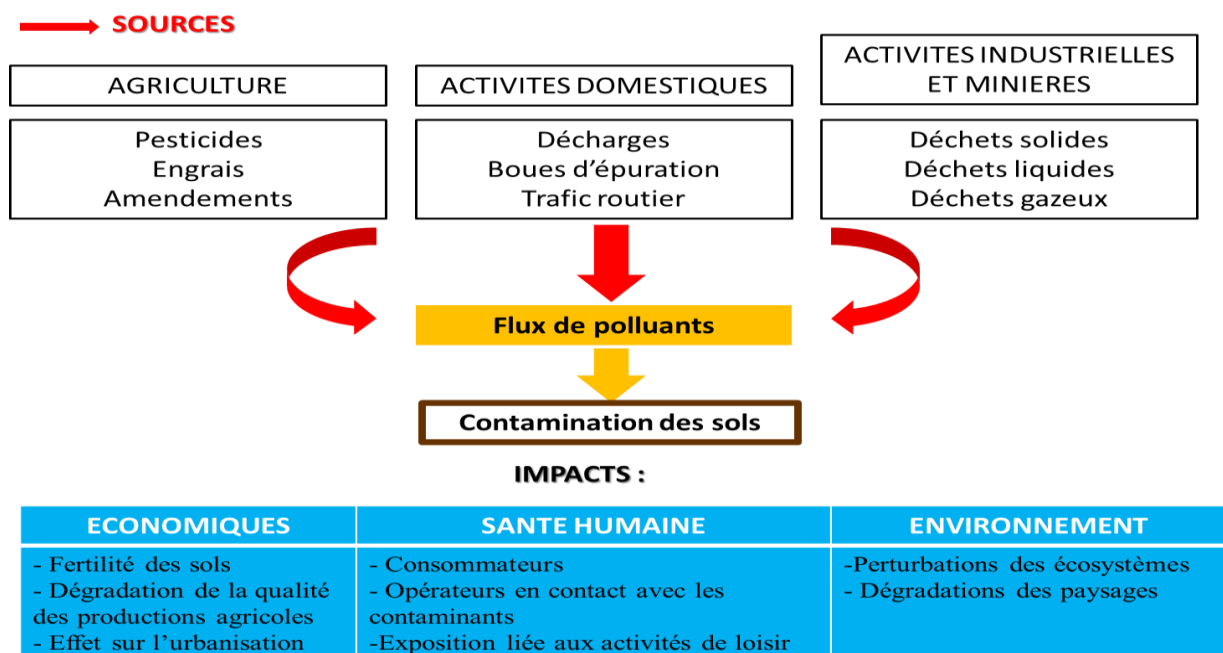


Figure I.2.1 : Les diverses sources de pollutions des sols et leurs conséquences (Austruy & Dumat, 2014)

Un sol est considéré comme pollué quand il contient un ou plusieurs polluant(s) ou contaminant(s) qui peut causer une altération biologique, physique ou chimique de l'écosystème (AFNOR, 1994) et donc en conséquence réduire la capacité du sol à rendre des services écosystémiques (support de culture, milieu de vie des organismes du sol...). Le sol est à l'interface de l'hydrosphère et de l'atmosphère. La pollution du sol a donc généralement des implications diverses comme la contamination d'un ou plusieurs composants de l'écosystème (atmosphère, environnements aquatiques) ou comme l'accumulation et le

transfert de polluants dans la chaîne alimentaire à travers les organismes en contact direct ou indirect avec le sol (plantes, méso faune, champignons, bactéries) (Schreck et al., 2013). A partir d'un certain seuil, dépendants de leur nature chimique, les ETM peuvent devenir toxiques pour les organismes vivants, affecter la biodiversité du sol et s'accumuler dans les chaînes alimentaires.

1.2.2 Propriétés physico-chimiques des ETM

1.2.2.1 Compartimentation/spéciation

La spéciation chimique est définie comme l'étude des différentes formes chimiques d'un élément (Shahid et al., 2011). La compartimentation fait référence à l'association d'un ETM aux phases solides de l'environnement, appelées phases porteuses : argiles, matières organiques, oxydes de fer, etc. (Quenea et al., 2009; Shahid et al., 2013). Afin d'estimer la distribution des ETM à travers les phases porteuses, différentes méthodes physiques (XRD, EXAFS, SEM-EDS...) et chimiques (extraction à l'EDTA, H₂O₂, séquentielles...) peuvent être utilisées (Cecchi et al., 2008). Les notions de compartimentation et spéciation peuvent aussi s'utiliser lorsqu'on s'intéresse aux ETM présents dans une plante ou un ver de terre. En effet la localisation dans tel ou tel organe et l'espèce chimique existante vont influencer l'écotoxicité et la toxicité du polluant.

La variation de la distribution des ETM au sein des phases porteuses du sol dépend de plusieurs paramètres physico-chimiques : pH, teneur et nature de la matière organique, concentration en colloïdes inorganiques, oxydes de fer, manganèse, aluminium. Dans la phase aqueuse du sol les ETM sont sous forme libres, complexés avec des ligands inorganiques (hydroxyde ou chlorure) ou des molécules organiques (Shahid et al., 2012 ; Schreck et al., 2011). La spéciation d'un élément en phase aqueuse (solution du sol en particulier) est fortement contrôlée par le pH et le potentiel redox, ainsi que par le type et la concentration des différents agents complexant dans la solution (Shahid et al., 2013).

1.2.2.2 Mobilité

La mobilité des ETM est principalement contrôlée par leur spéciation dans la phase aqueuse et l'adsorption/ désorption et la dissolution/précipitation des composés insolubles.

Certains paramètres, tels que le pH, le potentiel redox, la composition minérale du sol et la présence de ligands organiques ou colloïdaux dans la phase aqueuse jouent des rôles prédominants (Violante et al., 2005). En effet, ces paramètres peuvent influencer plusieurs mécanismes physico-chimiques qui interviennent dans la solubilisation, la précipitation ou la concentration des ETM présents dans le sol (Manceau et al., 2002).

Le pH du sol est un facteur largement reconnu comme influençant la mobilité et la disponibilité des ETM (Bourrelier et al., 1998 ; Shahid et al., 2012). Quand le pH diminue d'une unité, la concentration des cations métalliques peut augmenter d'un facteur 2 dans la solution de sol (Sanders et al., 1986). La matière organique et les argiles sont les principales phases porteuses pour le plomb (Cecchi et al., 2008). Par exemple, la faible mobilité du plomb dans le sol est principalement due à sa complexation par les substances humiques (Johnson & Petras, 1998). Dans les sols minéraux et calcaires, à faible teneur en matière organique, la présence de minéraux riches en calcium, magnésium ou fer, est responsable de la précipitation du plomb (Hernandez-Soriano & Jimenez-Lopez, 2012).

Des réactions d'adsorption/désorption, dissolution/précipitation, etc. contrôlent la mobilité des ETM dans l'environnement. Ces réactions sont particulièrement influencées par :

- *les caractéristiques des phases solides (nature et teneur en matières organiques, argiles, carbonates...)* ;
- *la composition chimique de la phase aqueuse (pH, potentiel redox, présence d'anions compétiteurs)* ;
- *les organismes vivants (microorganismes, vers de terre)* ;
- *les différentes phases minérales telles que les oxydes et hydroxydes de fer, l'aluminium et le manganèse.*

En conclusion, de nombreux mécanismes entrent en jeu dans la mobilité des ETM et ils sont fortement influencés par les propriétés bio-physico-chimiques du sol et le contexte de pollution : le système étudié est complexe et dynamique !

1.3. Les vers de terre et les ETM dans les sols

1.3.1 Vers de terres « ingénieurs de l'écosystème »

Le terme d' « ingénieurs de l'écosystème » a été utilisé par [Jones et al. \(1994\)](#) et [Lawton \(1994\)](#) pour désigner des organismes qui, directement ou indirectement, modifient les ressources disponibles pour d'autres organismes en provoquant des changements physiques de l'état des matériaux biotiques et abiotiques. Les vers de terre, les termites et les fourmis sont considérés comme les principaux ingénieurs de l'écosystème sol en zone tropicale et tempérée ([Jones et al., 1994](#) ; [Lavelle, 1996](#)).

Les vers de terre, aussi appelés lombriciens (annélides, oligochètes), représentent une composante majeure (en biomasse notamment) de la macrofaune du sol dans la plupart des écosystèmes terrestres. En 1994, plus de 3600 espèces de vers de terre, réparties en 15 familles, avaient été recensées dans le monde, auxquelles s'ajoutent plus de 60 nouvelles espèces chaque année. On estime à 7000 environ le nombre total d'espèces, la majorité vivant sous les tropiques ([Lavelle et al., 1998](#)). Ils jouent un rôle important dans leur environnement grâce à différents mécanismes bio-physico-chimiques permettant d'améliorer la fertilité et de préserver la structure du sol ([Stork et Eggleton, 1992](#) ; [Lavelle et al., 1997](#)). Aussi, en affectant les propriétés physiques et chimiques du sol, ils modifient le biotope des communautés microbiennes ([Lavelle et Gilot, 1994](#) ; [Lavelle et al., 1997](#)).

1.3.2 Taxonomie et catégories écologiques

Les vers de terre sont omniprésents dans les sols tempérés ou tropicaux et leur diversité taxonomique est très importante. Selon des critères morphologiques et comportementaux, les vers de terre se répartissent en trois grandes catégories écologiques : les épigés, les anéciques et les endogés qui vont se comporter de façon très différente et donc influencer de façon variable les ETM ([Bouché, 1977](#)) (Figure I.3.1).

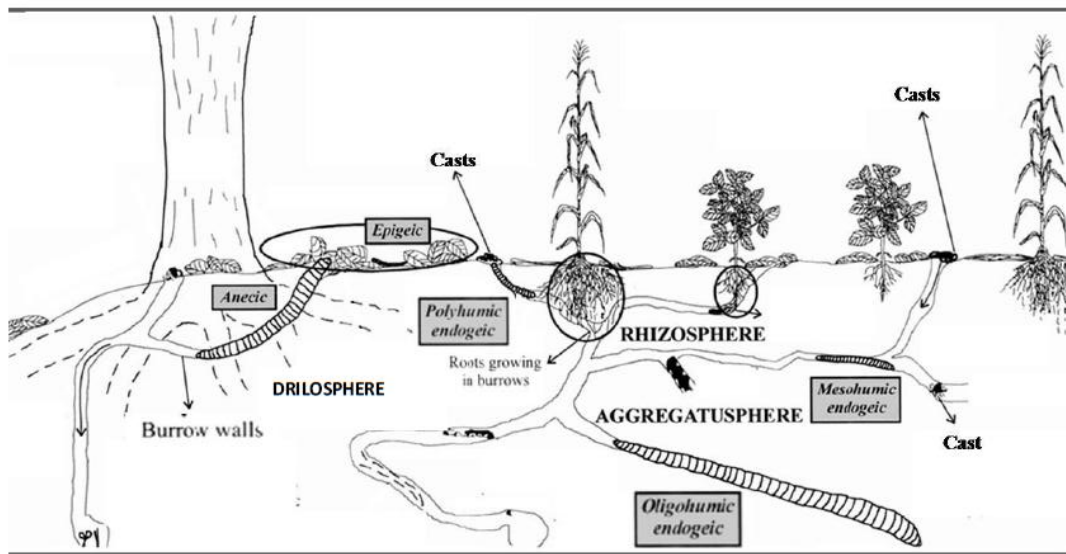


Figure I.3.1 : Localisation des trois catégories écologiques de vers de terre (Brown et al., 2000)

(1) **Les épigés** sont de petite taille (10 à 30 mm) et vivent généralement au niveau de la litière et dans les matières organiques en décomposition (Bouché, 1977 ; Lee, 1985). On les trouvera également dans les excréments des grands herbivores ou dans le bois humides en cours de décomposition. Ces espèces sont localisées en surface et sont donc particulièrement sensibles à la prédation, aux variations climatiques et aux facteurs anthropiques tels que le labour des horizons de surface et l'usage de produits phytosanitaires. Les vers de terre épigés jouent un rôle important dans le recyclage des matières organiques. Ils seront à priori très impactés par les pollutions aux ETM présents en surface.

(2) **Les anéciques** sont des individus de taille moyenne à très grande, dans le cas des espèces méditerranéennes (10 à 110 cm), vivant dans des galeries verticales à subverticales plus ou moins ramifiées et s'ouvrant en surface (Bouché, 1977). Au cours de l'ingestion du sol et de l'enfouissement des matières organiques, ils assurent un mélange intime avec la fraction minérale des différents horizons du sol. Ces espèces, localisées sur toute la hauteur du profil, disposent d'une forte musculature leur permettant de s'adapter à des compacités de sol relativement élevées et de résister aux pressions anthropiques connues en sols cultivés.

(3) **Les endogés** sont de taille variable (1 à 20 cm). Ils représentent 20 à 50% de la biomasse des terres fertiles. Ils vivent en permanence dans le sol dans lequel ils creusent des galeries d'orientation quelconque et sont couramment observés près des racines. Ces vers se

nourrissent de terre plus ou moins riche en matières organiques et se déplacent donc beaucoup pour satisfaire leurs besoins alimentaires. [Bouché, \(1977\)](#) et [Lavelle, \(1981\)](#) précise cette classification en fonction de la richesse en matières organiques du sol qu'ils ingèrent. Il existe selon cet auteur trois sous-catégories d'endogés : polyhumiques, mésohumiques et oligohumiques (en fonction de la richesse en matières organiques du sol ingéré).

1.3.3 Impact des vers de terre sur l'écosystème terrestre

L'impact des vers de terre sur le sol varie selon leur catégorie écologique. Les endogés et les anéciques sont les plus influents ([Bouché, 1977](#)). Les activités mécaniques principales des vers comprennent (i) l'élaboration de réseaux de galeries dans lesquelles ils se déplacent et (ii) l'excrétion de déjections dans les galeries (fèces) ou en surface du sol (turricules) (Figure 7). La « **drilosphère** » est la zone d'influence des vers de terre sur le fonctionnement des sols. Elle comprend toutes les structures physiques dépendantes des vers telles que le contenu du tube digestif, les turricules, et les galeries ainsi que les communautés d'invertébrés et de micro-organismes qui y sont présentes. La structure et l'importance relative de la drilosphère sont déterminées par le climat, les paramètres du sol et la qualité des apports organiques ([Lavelle et al., 1998](#)). De plus, les vers de terre participent à la redistribution des matières et éléments sur le profil de sol, à la transformation et à la minéralisation des matières organiques, améliorant ainsi leur recyclage ([Boyer et al., 2010](#)) et leur décomposition par les microorganismes du sol ([Jusselme et al., 2013](#)). Les éléments ainsi minéralisés sont plus facilement assimilables par les plantes.

1.3.3.1 Les galeries

Selon la catégorie écologique des vers de terre, le réseau de galeries sera différent (étendue, orientation, diamètre...). Le nombre de galeries dans un sol dépend de l'abondance des vers mais peut atteindre plusieurs centaines par m² ([Lee, 1985](#)). Dans les sites avec des communautés de vers importantes, le volume des galeries contribue pour une grande part à la porosité du sol et fournit ainsi une voie de passage pour l'air et l'eau dans le sol ([Tomlin et al., 1995](#)). Ces activités conduisent à l'amélioration de la macroporosité et des échanges gazeux du sol. Par exemple, des expérimentations en microcosmes ont montré que les galeries de *L. terrestris* augmentaient de 8 à 9 fois la conductivité hydraulique ([Capowiez et al., 2010](#)). Des études au champ viennent conforter ces résultats en montrant un transfert important d'eau

par les galeries de *L. terrestris* (Edwards et al., 1989, 1992) et une forte corrélation du taux d'infiltration avec la longueur, la surface et le volume des galeries d'un ver anécique *A. longa* (Spurgeon et al., 2000). De plus, les galeries favorisent le transfert de composés dans les différents horizons du sol, à la fois passivement (percolation et infiltration) mais également par le rôle fouisseur actif des espèces anéciques. Les vers de terre tapissent les galeries de mucus et de déjections riches en nutriments au cours de leurs passages successifs dans le sol (Sims et Gerard, 1985 ; Binet et Curmi, 1992). Binet et al. (1993) montrent que les parois de galeries de *L. terrestris* sont plus riches en C organique et N que le sol environnant. L'incorporation de matières organiques dans les galeries par *L. terrestris* a été démontrée dans les écosystèmes forestiers (Van hoof, 1983). Ces rapports (C/N) favorisent le développement de la microflore bactérienne tout au long des parois des galeries, ce qui entraîne une augmentation des activités respiratoires et de minéralisation enzymatique (Jusselme et al., 2013).

1.3.3.2 Les turricules

Les vers ingèrent le sol, puis excrètent leurs turricules à la surface du sol ou dans les galeries. La quantité de turricules déposée à la surface du sol se situe entre 2 et 250 tonnes ha⁻¹ par an en sol tempéré, ce qui représente une épaisseur de sol de 3 à 4 mm (Lee, 1985). Binet et Le Bayon (1999) évaluent la production de turricules de 2,5 à 3,5 kg m⁻² an⁻¹ (poids sec) pour 100 g de ver m⁻². Ces chiffres illustrent bien le potentiel des vers de terre à modifier de façon significative les caractéristiques du sol et donc son interaction avec les ETM. Les turricules ont un rôle de protection de la matière organique. D'abord très fragile (pluie), ils deviennent ensuite plus résistants et constituent les futurs agrégats du sol.

1.3.4 Vers de terre et ETM

1.3.4.1 Intérêts en écotoxicologie

Dans une perspective écotoxicologique, le profil éco-physiologique des vers de terre en a fait des bioindicateurs de choix de la pollution des sols (Edwards et Bohlen, 1992, 1996 ; Lanno et al., 2004 ; Sanchez-Hernandez, 2006). En effet, ces organismes sont en contact direct et permanent avec les différentes phases du sol : solide, liquide et gazeuse sol, contrairement à de nombreux vertébrés qui sont exposés par l'intermédiaire de la chaîne

trophique (Kammenga et al., 2000 ; Sanchez-Hernandez, 2006). Comme les vers absorbent des quantités conséquentes de sol, ils sont exposés aux contaminants par leurs surfaces d'assimilation alimentaire, mais il a aussi été démontré que la voie tégumentaire est un mode d'exposition non négligeable (Vijver et al., 2003 ; Scott-Fordsmand et al., 2004). La surface externe de leur épiderme est vascularisée, mais dépourvue de cuticule, ce qui favorise l'entrée directe des contaminants du milieu par les téguments. L'aptitude des vers à bioassimiler et à bioaccumuler (concentration dans le vers supérieure à la concentration dans le sol) les ETM est bien documentée (Hopkin, 1989 ; Nahmani et al., 2007). Les polluants internalisés peuvent alors atteindre les niveaux trophiques supérieurs via la chaîne alimentaire (Cooke et al., 1992 ; Edwards et Bohlen, 1992 ; Reinecke et al., 2000). Enfin, l'existence de connaissances relatives à leur écologie, leur physiologie et leur écotoxicologie est un motif supplémentaire permettant de qualifier les vers de « bons bioindicateurs ». Plusieurs protocoles standardisés de tests de toxicité avec les vers de terre ont d'ailleurs été élaborés et peuvent être utilisés en routine pour déterminer les effets écotoxiques de sols contaminés (OCDE, 1984 ; Abdul-Rida et Bouché, 1997 ; ISO, 1998 ; Ribera et Saint-Denis, 1999).

1.3.4.2 Impact des vers de terre sur la mobilité des ETM

Selon Sizmur and Hodson (2009), les vers de terre peuvent augmenter la mobilité et la disponibilité des ETM dans les sols. Ceci peut se traduire par une augmentation des concentrations en ETM lixiviés du sol à la solution du sol (Tomlin et al., 1993) ou une assimilation plus importante par les plantes (Ruiz et al., 2010). Les vers de terre creusent des galeries et produisent des turricules qui sont chimiquement, biologiquement et physiquement différents du sol alentour (Edwards, 2004). Les turricules des vers de terre ont des communautés microbiennes plus actives (Jusselme et al., 2013) et présentent des concentrations plus importantes de carbone organique soluble que le sol global (Daniel and Anderson, 1992). Certains auteurs ont rapporté des concentrations en ETM extractibles à l'eau augmentées dans les turricules (Sizmur et al., 2011) mettant en évidence que le passage dans le système digestif du ver de terre pouvait être responsable des modifications de mobilité et de phytodisponibilité des ETM. Les mécanismes impliqués dans ces modifications de mobilité et de biodisponibilité des ETM restent peu clairs et relativement peu documentés. Il est pourtant important de comprendre comment la faune du sol influence la biodisponibilité des ETM dans les sols.

1.4. Risques pour la santé humaine et ETM

1.4.1 Évaluation quantitative des risques sanitaires

La démarche d'évaluation quantitative des risques sanitaires (EQRS), telle que pratiquée en France pour la réhabilitation des sites et sols pollués depuis 2007, consiste en une estimation de la survenue d'effets néfastes sur la santé humaine en tenant compte de la toxicité des substances et des différentes voies d'expositions de l'homme à ces substances. L'Homme peut assimiler les contaminants présents dans les sols par trois voies majeures d'exposition : l'inhalation, l'absorption cutanée et l'ingestion (Lanphear et al, 1997 ; Paustenbach, 2000). L'ingestion de végétaux, de terre et de poussières contaminés est la voie d'exposition prédominante en ce qui concerne les ETM non volatils (Paustenbach, 2000 ; Kwon et al., 2004 ; Carrizales et al., 2005 ; Yamamoto et al., 2006). Pour des raisons physiologiques et comportementales, la population la plus sensible à l'ingestion de terre sont les enfants de 0 à 6 ans (Lanphear et al, 1996 ; Wang et al., 2003). Cela est dû principalement au comportement de portage des mains à la bouche qui est courant chez les enfants âgés de 12 mois à 2 ans (Ellis et Schnoes, 2005 ; Ljung, 2006). Indépendamment des comportements de type géophagie, il est évalué qu'un enfant va ingérer 100 à 150 mg/j de terre (USEPA, 1997 ; Calabresse et al., 1999). De plus, ce type de population est plus sensible à la toxicité des polluants métalliques, comme le Pb (paroi hémato-encéphalique plus perméable) (WHO, 1995 ; ATSDR, 1992). Les enfants présentent une absorption gastro-intestinale plus forte que les adultes : l'absorption du Pb par le système digestif est de 10 à 20 % chez les adultes et de 30 à 50 % pour les enfants (Laquatra, 2001).

Actuellement, lors d'une démarche d'évaluation des risques concernant l'ingestion des polluants du sol, on considère que c'est la concentration totale d'une substance présente dans un sol qui est susceptible de produire un effet toxique sur l'être humain (Oomen et al., 2006). L'estimation du niveau de risque repose sur la comparaison directe de la dose ingérée avec le sol à la valeur toxicologique de référence (VTR) pour la voie orale. Cependant, cette méthode ne prend pas en compte la différence de biodisponibilité de l'élément considérée dans le sol contaminé et la matrice utilisée pour l'établissement de la VTR. Or de nombreuses études montrent que la biodisponibilité d'un élément dans un sol est plus faible que dans une matrice telle que la nourriture et l'eau (Casteel et al., 1997 ; Schröder et al, 2004). Ainsi, négliger cette différence de biodisponibilité revient à surestimer les risques associés à l'ingestion d'un sol

pollué. Il est donc nécessaire de considérer ce paramètre en vue d'une amélioration du calcul de risque. Pour approcher, la biodisponibilité de façon simplifiée, nous allons nous intéresser à la mesure de la bioaccessibilité, qui selon [Denys et al \(2007\)](#) est une étape pertinente pour estimer la biodisponibilité des métaux.

1.4.2 Les notions de biodisponibilité et bioaccessibilité

La biodisponibilité orale est la fraction de composés ingérée qui est absorbée et atteint la circulation systémique ([Casteel et al, 2006](#)). La biodisponibilité absolue peut donc se définir comme le ratio de la dose absorbée sur la dose administrée ([Basta et al., 2000](#) ; [Ruby et al., 1996](#)).

La notion de biodisponibilité relative vise à comparer l'absorption d'un composé sous deux spéciations, tel que le carbonate de Pb vs l'acétate de Pb, ou du même composé administré par différents milieux tels que la nourriture, le sol et l'eau ([Kelley et al., 2002](#)). Cette notion est importante car un calcul de risque revient à mettre en relation les doses d'exposition et les VTR, celles-ci étant établies à partir d'une matrice spécifique comme les aliments ou l'eau, pour laquelle la substance en question a une biodisponibilité spécifique. Donc si la biodisponibilité de la substance incriminée dans le sol est supérieure à la biodisponibilité dans la matrice utilisée pour l'étude menant à l'obtention de la VTR, la biodisponibilité relative sera supérieure à 1 et le niveau de risque sera supérieur au niveau calculé sans intégrer ce paramètre.

La biodisponibilité se mesure par le biais d'expérimentation *in vivo* sur des modèles animaux dont le système digestif est proche de celui de l'homme. Les modèles les plus souvent utilisés sont les porcs juvéniles ([US-EPA, 2007](#)). Mais ces méthodes sont coûteuses et demandent un savoir-faire en expérimentation animale. De plus ces expériences sur animaux soulèvent des questions éthiques, notamment, dans le cadre de la réglementation REACH, où une diminution des expérimentations *in vivo est* demandée.

On mesure la biodisponibilité absolue en comparant les concentrations de l'élément mesurées dans le sang après injection intraveineuse et après une administration par voie orale.

La biodisponibilité peut également se mesurer à partir de la concentration de la substance considérée dans un organe cible, après une période d'exposition de quelques semaines (Casteel et al, 2006 ; US-EPA, 2007).

Pour éviter le passage par l'expérimentation animale pour mesurer la biodisponibilité, il faut intégrer un autre paramètre, **la bioaccessibilité**. La bioaccessibilité est la fraction de polluant qui est extraite par les fluides digestifs au niveau du système salivaire et du tractus gastro-intestinal. Elle peut s'exprimer selon le ratio :

$$- \quad \text{Dose extraite de la matrice du sol} / \text{Dose administrée} \times 100.$$

L'équation suivante est ensuite utilisée pour déterminer la biodisponibilité d'une substance polluante:

$$- \quad B = Ba \times Fa \times Fh$$

avec :

B : biodisponibilité absolue

Ba : bioaccessibilité absolue

Fa : taux d'absorption par le système digestif de la fraction bioaccessible

Fh : taux de transmission à la circulation systémique de la fraction absorbée.

La fraction biodisponible d'une substance est donc inférieure à la fraction bioaccessible de cette substance, ce qui nous permet de dire que la bioaccessibilité est un paramètre limitant de la biodisponibilité. Le lien entre bioaccessibilité absolue et biodisponibilité absolue est schématiquement illustré sur la figure suivante (Figure I.4.1).

Comme pour la biodisponibilité relative, la notion de bioaccessibilité relative vise à comparer l'extraction d'un composé sous deux spéciations différentes (carbonate de Pb vs acétate de Pb) ou du même composé extrait à partir de différentes matrices (nourriture, sol ou eau). Pour un calcul de risque, dans lequel il convient de distinguer la différence de bioaccessibilité entre

le sol et la matrice utilisée pour l'établissement de la VTR, la notion de bioaccessibilité relative est donc cruciale.

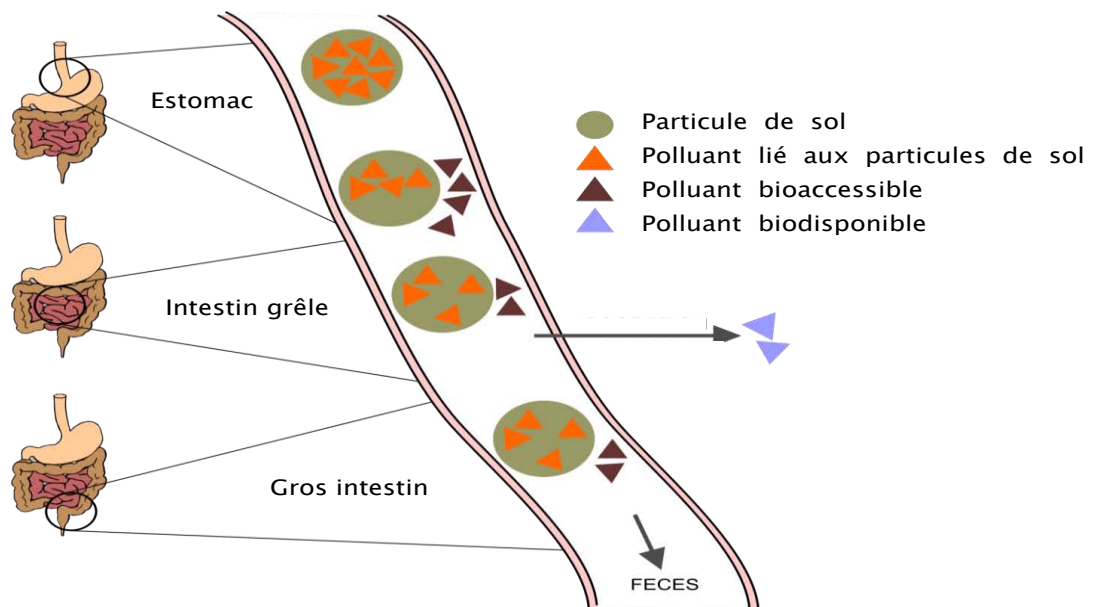


Figure I.4.1 : Schéma de la relation entre bioaccessibilité et biodisponibilité (Caboche, 2009)

1.5. Objectifs de la thèse

L'objectif général de cette thèse est la compréhension de l'impact et du devenir des ETM dans un écosystème terrestre. **Dans ce travail les ETM ont pour origine des retombées de particules microniques et submicroniques (voire nanométriques) émises dans l'environnement par des entreprises de recyclage de batteries chargées en métaux et métalloïdes.** La complexité des phénomènes impliqués dans le transfert des substances dans l'environnement impose une meilleure compréhension des mécanismes afin d'anticiper les impacts sur les organismes vivants. C'est pourquoi, il est essentiel de mieux caractériser les sols, de prendre en compte des notions telles que la biodisponibilité et d'avoir une approche multidisciplinaire liant biogéochimie, écotoxicologie et toxicologie.

Dans ce contexte scientifique, la thèse avait pour but :

- 1) D'évaluer l'impact des ETM sur les vers de terre**
- 2) De déterminer l'influence de la bioturbation du ver de terre sur le transfert des ETM dans les sols pollués**
- 3) D'étudier la biodisponibilité gastrique des ETM et leur impact sur le tractus – gastro intestinal humain.**

Ces trois grands objectifs structurent la section « résultats et discussion » du manuscrit. La figure I.5.1 suivante présente le contexte et les différentes questions qui sont abordées dans le cadre de cette thèse.

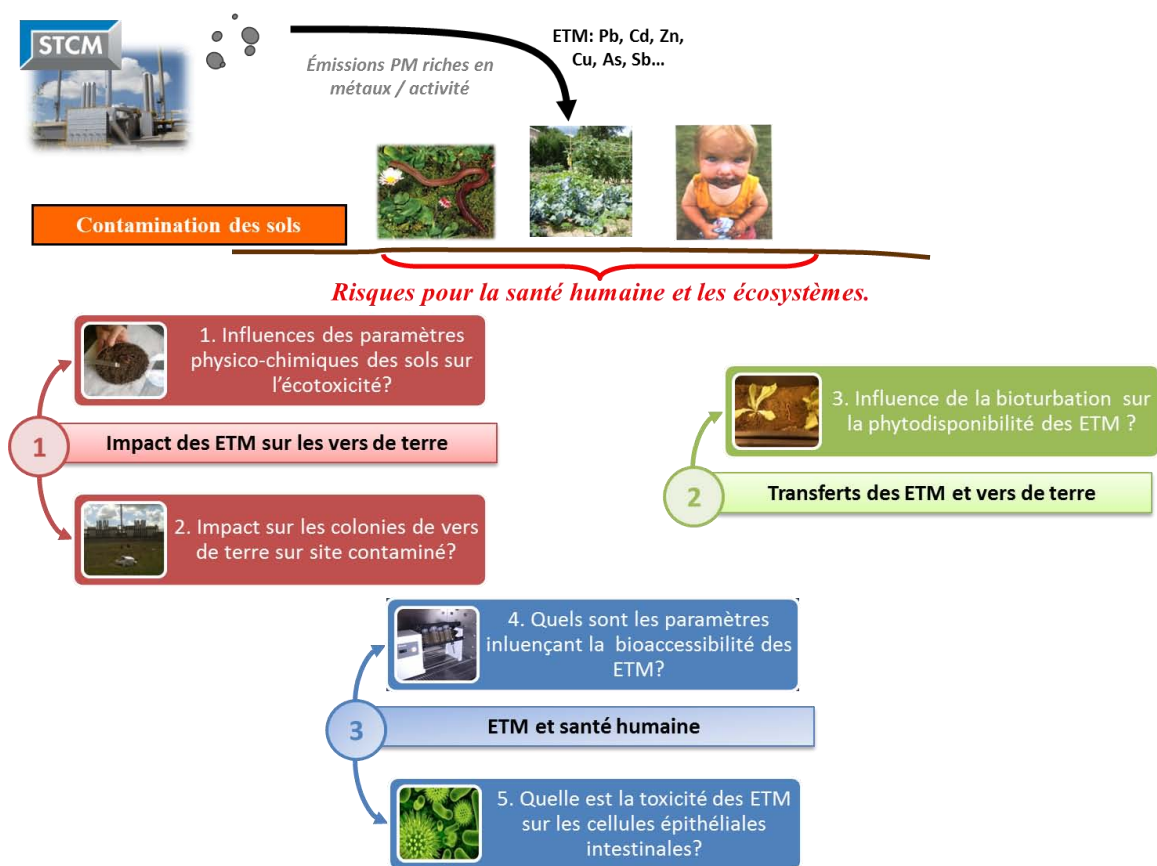


Figure I.5.1: Représentation des objectifs scientifiques abordés dans la thèse

► La notion de biodisponibilité est au cœur des investigations scientifiques menées au cours de cette thèse. **En effet, les mesures de biodisponibilités sont encore relativement peu prises en compte dans les évaluations de risques.** Pourtant, c'est un point crucial, déterminant l'impact et la toxicité d'une substance sur les organismes vivants. C'est pourquoi dans la première partie de ces travaux, l'impact des ETM sur les vers de terre est évalué en intégrant la notion de biodisponibilité.

De façon plus détaillée, les trois objectifs précis suivants ont été traités au cours du travail de thèse :

Objectif scientifique n°1 : effets des ETM sur les vers de terre

Les études d'impact sont le plus souvent réalisées à partir de sols dopés et l'établissement de DL_{50} sans prendre en compte les caractéristiques physico-chimiques des sols et la biodisponibilité des ETM.

Le premier objectif a été d'évaluer l'impact de sols contaminés historiquement en ETM et aux caractéristiques physico-chimiques contrastées sur un organisme clé du sol, le ver de terre.

Un nouveau test écotoxicologique, relié aux rôles écologiques du ver de terre a été utilisé pour plus de pertinence écologique.

La deuxième partie de ces travaux a porté sur l'influence du ver de terre sur les transferts des ETM dans les sols pollués.

Objectif scientifique n°2 : effet réciproque des vers sur le transfert des ETM dans les sols

L'objectif de cette partie a été de déterminer l'influence de la bioturbation du ver de terre sur la biodisponibilité des ETM dans les sols pollués.

Une première question a porté sur l'influence du ver sur la phytodisponibilité des ETM avec une analyse des mécanismes impliqués. Des expérimentations en mésocosmes et l'utilisation du RHIZOtest® ont permis d'y répondre.

Une deuxième question a porté sur l'influence du ver de terre sur la bioaccessibilité humaine des ETM dans les sols et les végétaux contaminés.

La troisième partie et dernière partie de cette thèse concerne l'évaluation des risques des ETM sur la santé humaine.

Objectif scientifique n°3 : évaluations des risques engendrés par les ETM pour la santé humaine

L'évaluation des risques sanitaires des ETM telle qu'elle est pratiquée en France, se base sur les concentrations totales dans une matrice. Afin d'évaluer de façon pertinente le niveau d'exposition des populations, il est important de prendre en compte les notions de biodisponibilité et de se baser sur les concentrations biodisponibles en ETM.

Dans cette partie, les travaux ont portés sur l'étude des paramètres influençant la bioaccessibilité gastro-intestinale des ETM, ainsi que leur toxicité sur les cellules épithéliales intestinales humaines. Enfin le transfert des ETM à travers un modèle mimant la barrière intestinale a été investigué.

Chapitre 2

Matériels et Méthodes

2.1. Présentation des sites d'études

Afin de répondre aux questions scientifiques visées dans le cadre de cette thèse, différents sites et friches industriels ont été étudiés avec plusieurs objectifs. Cette première partie (2.1) permet de donner des informations sur l'entreprise de recyclage de batteries partenaires du projet (STCM) et de comprendre le contexte général de chacun des sites pollués étudiés.

2.1.1 La Société de Traitements Chimiques des métaux (STCM)

2.1.1.1 Présentation de l'entreprise

La STCM est spécialisée dans la fabrication et la commercialisation de Pb secondaire, issu du recyclage et du traitement de batteries au plomb (automobiles & industriels) et autres matériaux plombeux (déchets, oxydes, etc.)

La STCM produit du plomb de différentes puretés et des alliages de plomb (calcium – antimoine – étain). Avec 65.000 tonnes de plomb par an, la STCM est le premier producteur de plomb recyclé en France. Les principaux marchés sont la construction de batteries, la fabrication des câbles électriques pour la distribution de l'électricité et les protections contre les rayonnements ionisants.

Établie en 1952 à Toulouse, une deuxième usine fut construite à Bazoches les Gallerandes (45) en 1967. Par la suite, cette entreprise été achetée en 1993 par un groupe allemand « Metallgesellschaft » puis en 1996 par le groupe américain « Quexco » via sa filiale anglaise « ECO-BAT technologies ». En juin 2001, la STCM a intégré l'usine GAST (située à Pont-Sainte-Maxence). L'usine continue de fonctionner sous le nom APSM

(Affinerie de Pont-Sainte-Maxence) tandis que les usines de Toulouse et Bazoches opèrent sous le nom STCM. Le siège de la STCM se situe à Bazoches les Gallerandes et comprend les ressources humaines, les ventes, les achats et les finances de la STCM et l'APSM.

2.1.1.2 Qualité, sécurité et politique environnementale

La STCM est certifiée ISO 9001 depuis août 2003 pour son système de management de la qualité (SMQ). La certification ISO 14007 a été obtenue en septembre 1999 puis recertifiée avec la certification OHSAS 18001 depuis décembre 2002 pour le Système de Management de l'Environnement (SME) et le Système de Management de la Santé et de la Sécurité au travail (SMS). Toutes ces certifications sont réunies en un Système de Management Intégré.

En France, les entreprises telles que la STCM susceptibles de générer des risques pour l'environnement et la santé sont soumises à une législation et une réglementation particulière, relatives à ce que l'on appelle « les Installations Classées pour la Protection de l'Environnement » (ICPE). Les dirigeants de ces entreprises sont responsables de la réalisation et l'exécution de stratégies de management afin de minimiser les impacts sur l'environnement et la santé humaine. Ce règlement des ICPE apporte d'ailleurs de façon indirecte une protection fonctionnelle des sols en garantissant en particulier des budgets réservés à la réhabilitation des sols lorsque nécessaire (Dumat & Austruy, 2014).

2.1.1.3 La STCM Toulouse

Lors de sa création en 1952, l'usine de Toulouse était dans une zone éloignée de toute habitation. Avec le temps, la zone s'est progressivement développée. Le nord de Toulouse est devenu le centre industriel de la ville. Le site STCM-Toulouse d'une superficie de 23. 650 m² est maintenant entourée d'un dépôt de carburant (Esso) classé Seveso (sites industriels présentant des risques d'accidents majeurs : explosion, incendie), une laiterie, d'autres La 1^{ère} instruction du PPRT (plan de préventions des risques technologiques) d'Esso a montré qu'en cas d'explosion, une partie des infrastructures de la STCM ne résisterait pas au souffle de l'explosion. Dans ce contexte, et pour des raisons stratégiques et économiques, la STCM a pris l'option de l'expropriation des infrastructures abritant les fours et a donc stoppé son activité de fusion et d'affinage fin 2011. Conformément à la législation sur la cessation

d'activités des ICPE, et sur le respect du principe pollueur-payeur, l'entreprise devra à terme réhabiliter ses sols contaminés en Pb et autres métaux et métalloïdes (Cd, Cu, Zn, Sb, etc.) selon l'usage futur des sols. Le plan de situation du site de la STCM est présenté ci-dessous (Figure II.1.1).

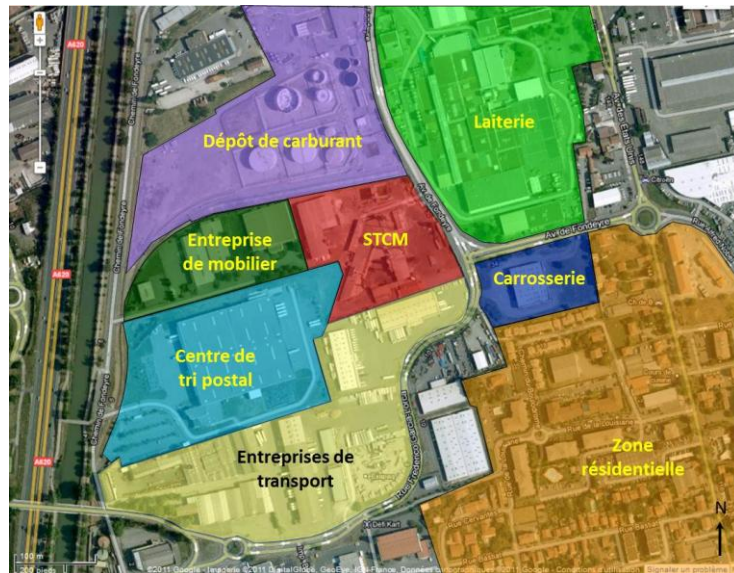


Figure II.1.1: Plan de situation du site STCM de Toulouse et des infrastructures situées à proximité.
(Source : Google Map pour le fond de carte)

2.1.1.4 La STCM Bazoches les Gallerandes

Créée en 1967 pour répondre à la forte demande en Pb au nord de la Loire, à Bazoches les Gallerandes (Loiret), l'usine s'est rapidement révélée trop petite. Un second site (B2) a été construit à quelques centaines de mètres du village et est maintenant destiné au regroupement / tri / broyage des batteries usagées et au procédé de fusion-réduction du Pb tandis que le site original (B1) est actuellement dédié à l'affinage.

Le site d'étude est une prairie en jachère attenante à l'enceinte du bâtiment de fusion-réduction de la STCM (B2). Cette parcelle a été achetée par la STCM dans les années 90 afin d'éviter les cultures à proximité directe de l'usine (Fig II.1.2)



Figure II.1.2: Photographie de la zone d'échantillonnage (friche) à proximité de la STCM BAZoches les Gallerandes.

2.1.2 Ancienne mine de plomb et d'argent de Pongibaud

Ce site d'étude est une ancienne mine de plomb et d'argent situé à Pongibaud dans le Massif Central. Elle est abandonnée depuis les années 1900. De 1860 à 1900, la mine a produit environ 64100 m³ de déchets miniers riches en métaux et métalloïdes qui sont restés entreposés en pile à l'air libre. Le manque de végétation et les résidus miniers induisent une instabilité des matériaux. En effet les résidus miniers sont exposés à l'érosion hydraulique et éolienne entraînant leur dispersion dans la rivière voisine. De plus, un terrain de foot a été créé à proximité directe des déchets (figure II.1.3), ces matériaux ayant été utilisés en tant que sous couche pour la construction du terrain de foot. De nos jours, des activités de loisirs (rivière et terrain de foot) ont pris place sur le site participant à augmenter l'exposition humaine aux polluants, et particulièrement les joueurs de foot et les jeunes enfants.

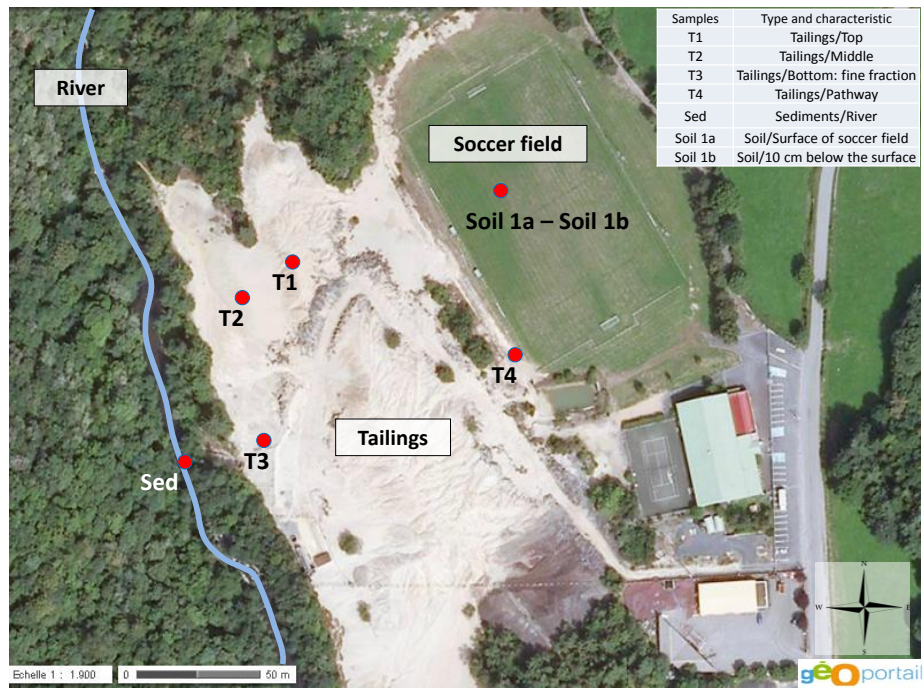


Figure II.1.3: Photographie aérienne de l'ancienne mine de Pongibaud et localisation de l'échantillonnage.

2.2. Étude de l'écotoxicité des ETM

2.2.1 Expérimentations en conditions contrôlées

2.2.1.1 Échantillonnage des sols et préparation

Afin d'étudier l'écotoxicité, un sol contaminé en plomb et autres ETM a été prélevé à la STCM Toulouse. Ce sol noté S1 a été collecté entre 0 et 25cm de profondeur, séché, débarrassé des racines et tamisé à 2mm pour les expériences d'écotoxicité. Par la suite ce sol a été dilué à l'aide de deux sols non contaminés aux paramètres physico-chimiques contrastés (teneurs en matières organiques, pH...), dans le but de créer un gradient de concentrations en ETM. Le tableau II.2.1 présente les caractéristiques de ces sols. Le sol non contaminé S2 a été prélevé dans l'enceinte du laboratoire d'analyse Galys à Toulouse et le sol non contaminé S3 a été collecté à proximité d'un champ en culture sur les terrains de l'INRA de Toulouse.

Tableau II.2.1 : caractéristiques physico-chimiques des sols non contaminés notés S2 et S3

Sols	Argile (%)	Limon (%)	Sable (%)	pH	OM (g.kg ⁻¹)	CEC (cmol (+) kg ⁻¹)	CaCO ₃ (g.kg ⁻¹)
S2	13	48	38	5.7	44.7	12.3	0
S3	22	26	52	7.6	10.1	10.1	<1

Le tableau II.2.2 suivant présente les techniques utilisées pour chaque mesure.

Paramètres	Technique
<i>pH</i>	ISO 10390
<i>CEC</i>	NF X 31-310
<i>OM</i>	ISO 10694
<i>CaCO₃</i>	ISO 10693
<i>Granulométrie</i>	ISO 11277
<i>ETM (Pb, Cd, As, Sb, Cu, Zn)</i>	ISO 11466

Table II.2.2: Paramètres mesurés et techniques normalisées correspondantes

2.2.1.2 Les espèces de vers de terre utilisées

2.2.1.2.1 *Lumbricus terrestris*

Embranchement : Annélida

Classe : Clitellata

Ordre : Haplotaxida

Famille : Lumbricidae

Genre : *Lumbricus*

Espèce : *L. terrestris*



Figure II.2.1 : Ver de terre, *Lumbricus terrestris*

Lumbricus terrestris est une espèce anécique appartenant à la famille des lumbricidae. Il s'agit d'un ver à tête rougeâtre mesurant de 12 à 30 cm et pesant entre 5 et 10 g. Ce ver représente la plus grande biomasse de ver de terre dans la plupart des écosystèmes tempérés et c'est le ver anécique le plus commun en Europe. Il se nourrit partiellement de matières organiques de surface et de la matière organique du sol. Il forme des galeries verticales permanentes dans le sol et il incorpore la matière organique qu'il va chercher à la surface dans les couches plus profondes du sol induisant ainsi des transferts de matières organiques au sein du sol ainsi que des polluants potentiellement associés. Son intérêt en écotoxicologie est évident vu son impact sur la structure du sol et sa grande densité dans la plupart des écosystèmes. De plus il est intéressant de comprendre l'impact des ETM sur une espèce de vers qui ne se nourrit pas exclusivement de la matière organique du sol.

2.2.1.2.2 *Eisenia hortensis*

Embranchement : Annélida

Classe : Clitellata

Ordre : Haplotaxida

Famille : Lumbricidae

Genre : *Eisenia*



Figure II.2.2 : Ver de terre, *Eisenia hortensis*

Espèce : *E. hortensis*

Eisenia hortensis est une espèce épigée, généralement de couleur rose-gris avec un aspect à rayures, pesant environ 1.5g pour les adultes. Le bout de la queue est souvent couleur crème ou jaune pâle. Il est généralement trouvé dans la litière des zones forestières et des jardins où le sol est riche en matière organique. C'est un excellent digesteur de la matière organique ce qui en fait un très bon ver de compost. Il est aussi physiologiquement très proche d'*Eisenia fetida* qui est un organisme cible utilisé pour les tests écotoxicologiques standardisés.

2.2.1.3 Les tests écotoxicologiques

2.2.1.3.1 Mortalité, et évolution de la biomasse

La mesure de la mortalité et du changement de la biomasse d'un organisme sont des tests couramment utilisés pour déterminer l'impact des substances écotoxiques sur les vers de terre. La mesure de la mortalité consiste à calculer la CE_{50} qui est la concentration en polluants induisant 50% de mortalité chez la population exposée. Elle est spécifique à une substance, pour une espèce, avec un temps d'exposition déterminé. Le changement de biomasse est la différence entre la masse initiale du ver de terre et sa masse à la fin de la période d'exposition au contaminant. Elle est exprimée en pourcentage de la masse initiale et est comparée à un témoin.

2.2.1.3.2 Production de turricules (ou Cast production)

La cast production est la quantité de turricules produite par le ver de terre. Les vers de terre creusent des galeries dans le sol soit par ingestion de particules de sol soit par forage (Lee et Foster, 1991). En outre l'ingestion de sol est nécessaire pour des raisons alimentaires. Après passage dans l'intestin, le sol est éjecté en une forme spécifique : le turricule. Il est déposé directement sur la surface du sol ou dans le sol lui-même (Whalen et al., 2004). Les turricules jouent un rôle écologique important dans le sol (Le Bayon et Binet, 1999). La cast production contribue donc à la bioturbation du sol et peut également être utilisée comme proxy pour évaluer l'activité des vers de terre. Ce paramètre se révèle donc très pertinent pour évaluer l'écotoxicité des ETM dans les sols.

La cast production a été mesurée selon le protocole décrit par [Capowiez et al., \(2010\)](#) puis modifié par [Dittbrenner et al., \(2011\)](#). Les turricules ont été séparés en utilisant un ensemble de quatre tamis (diamètre : 15cm et maillages : 5,6 – 4 – 3,15 – 2,5 mm). Le principe est que l'activité des vers va modifier la granulométrie du sol conduisant à une augmentation de la quantité de sol contenue dans certains des tamis et à une diminution dans d'autres tamis. Le jeu de tamis a été secoué pendant dix secondes et le sol retenu dans chaque tamis pesé. L'effet de la bioturbation a ensuite été examiné en déterminant les changements dans la distribution des tailles de particules, c'est-à-dire le poids du sol frais dans chaque tamis soustrait au poids correspondant pour le sol contrôle. La cast production est exprimée en poids de turricules produits par masse de ver de terre et par jour.

2.2.2 Expérimentation sur le terrain

Le site d'étude est la parcelle en jachère attenante à la STCM de Bazoches les Gallerandes (45).

2.2.2.1 Échantillonnage des sols et préparation

Un point d'échantillonnage a été réalisé tous les 10 m à partir du bord de l'usine jusqu'au bout de la parcelle à 140m. Cet échantillonnage a été répété 5 fois sur la largeur de la parcelle comme montré sur la figure II.2.3 ci-dessous.

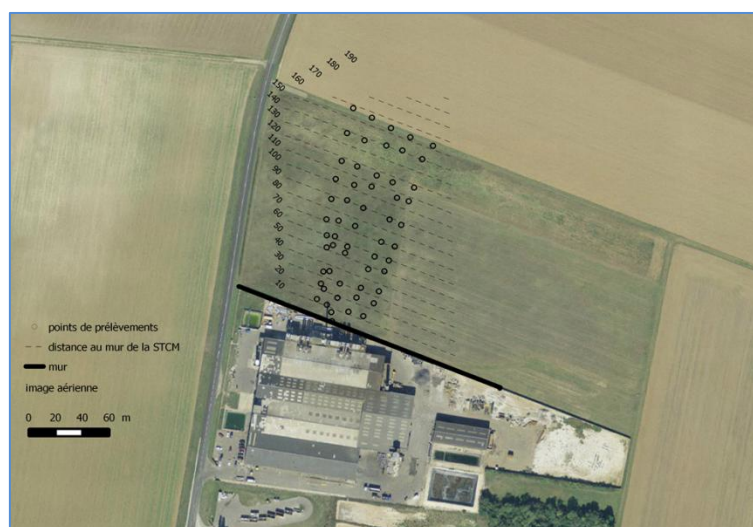


Figure II.2.3: Photographie satellite de la parcelle d'étude et localisation GPS des points d'échantillonnage.

Les échantillons de sols ont été collectés entre 0 et 25 cm, mis à sécher à l'air libre une semaine, puis quartés afin de disposer d'échantillons homogènes. Ils ont ensuite été broyés, tamisés à 2 mm puis caractérisés.

2.2.2.1 Échantillonnage des vers de terre

Les vers de terre ont été collectés selon le même plan d'échantillonnage que les sols (Figure II.2.4). Pour chaque point d'échantillonnage, les vers de terre ont été cherchés à la main sur des quadrats de 0.09 m² jusqu'à une profondeur de 30 cm. Les vers ont été conservés dans l'alcool à 70° pour identification. L'identification fut réalisée au laboratoire selon la clef de [Bouché \(1972\)](#). Les noms ont ensuite été traduits selon la clef de [Simms and Gérard \(1991\)](#) puisque la nomenclature anglo-saxonne est la référence. Cette identification consiste à analyser les différentes espèces collectées en fonction de critères morphologiques (principalement la position du clitellum) et les stades de maturité des vers de terre (présence ou non de clitellum).



Figure II.2.4: Échantillonnage des vers de terre

2.3. Étude du transfert des ETM

Cette section décrira les différents tests et expérimentations mis en place afin d'étudier l'influence de la bioturbation des vers de terre sur la biodisponibilité des ETM.

2.3.1 Expérimentation en microcosmes

2.3.1.1 Échantillonnage des sols et préparation

Le sol contaminé utilisé pour cette étude est le sol S1 décrit précédemment (2.2.1.1). Il a été mélangé avec le sol non contaminé S2 également décrit dans la section 2.2.1.1, afin de diluer les concentrations en ETM.

Suite à l'étude d'impact des ETM sur les vers de terre (section 3.1), il a été montré que les vers de terre restaient actifs jusqu'à 4000 mg.kg^{-1} de plomb dans le sol. Ces résultats ont été utilisés pour définir les concentrations en ETM dans le sol pour cette étude. Ainsi quatre concentrations en ETM ont été choisies (voir section 4.1).

2.3.1.2 Présentation des espèces de vers de terre

2.3.1.2.1 *Lumbricus terrestris*

Voir section 2.2.1.2.1.

2.3.1.2.2 *Aporrectodea caliginosa*

Embranchement : Annelida

Classe : Clitellata

Ordre : Haplotaxida

Famille : Lumbricidae

Genre : Aporrectodea

Espèce : *A. caliginosa*



Figure II.3.1 : Ver de terre, *Aporrectodea caliginosa*

Aporrectodea caliginosa communément appelé « ver gris » est une espèce endogée. C'est un ver de terre pâle facilement identifiable en raison des différentes nuances de couleur le long de son corps. Il se nourrit de la matière organique du sol et vit généralement proche des racines. Afin de satisfaire ses besoins alimentaires, il doit beaucoup se déplacer et a donc une forte activité de bioturbation.

2.3.1.3 Protocole expérimental

Des bacs rectangulaires (mésocosmes) en PVC (50×20×15 cm) ont été remplis avec 6 kg de sol tamisé à 2mm. Quatre séries expérimentales différentes ont été réalisées simultanément, i) sol seul ; ii) sol + vers de terre ; iii) sol + laitue ; iv) sol + laitue + vers de terre. Deux espèces de vers de terre ont été choisies pour cette expérimentation, un anécique et un endogé décrits ci-dessus. Afin de respecter les densités relatives de ces espèces dans les sols, il a été introduit 9 *A. caliginosa* (endogés) et 2 *L. terrestris* (anéciques) dans les mésocosmes devant héberger les vers. Chaque série expérimentale était constituée de quatre différentes concentrations en ETM dans les sols et en cinq répliques.

Afin de maintenir dans de bonnes conditions d'alimentation *L. terrestris*, 6 grammes de litière sous forme de paille séchée ont été disséminés à la surface de chaque mésocosmes. *L. terrestris* étant connu pour ses activités d'enfouissement de la matière organique, ce procédé a permis de vérifier régulièrement l'activité du ver de terre et aussi de mesurer l'impact des ETM sur ce comportement. Sur les photographies ci-dessous, il est possible d'observer que la litière a été déplacée par le ver de terre. De plus, à certains endroits, on peut apercevoir de la paille dépassant de l'embouchure des galeries creusées par *L. terrestris* (Fig II.3.2).



Figure II.3.2: Photographie de la litière disséminée à la surface des mésocosmes

Trois jeunes pousses de laitues, au stade de 8 jours, (*Lactuca sativa capitata*) ont été plantées dans chaque mésocosme devant comporter des laitues. L'expérimentation a duré 6 semaines avec 18h de lumière par jour et une température moyenne de 22°C. Le taux d'humidité du sol a été ajusté à 19% (correspondant à 65% de sa capacité de rétention) au début de l'expérience. Chaque pot a été pesé et ensuite tous les deux jours, le poids perdu a été remplacé par de l'eau du robinet. La figure ci-dessous représente le plan de l'expérience et les expérimentations annexes ayant été réalisées (Figure II.3.3).

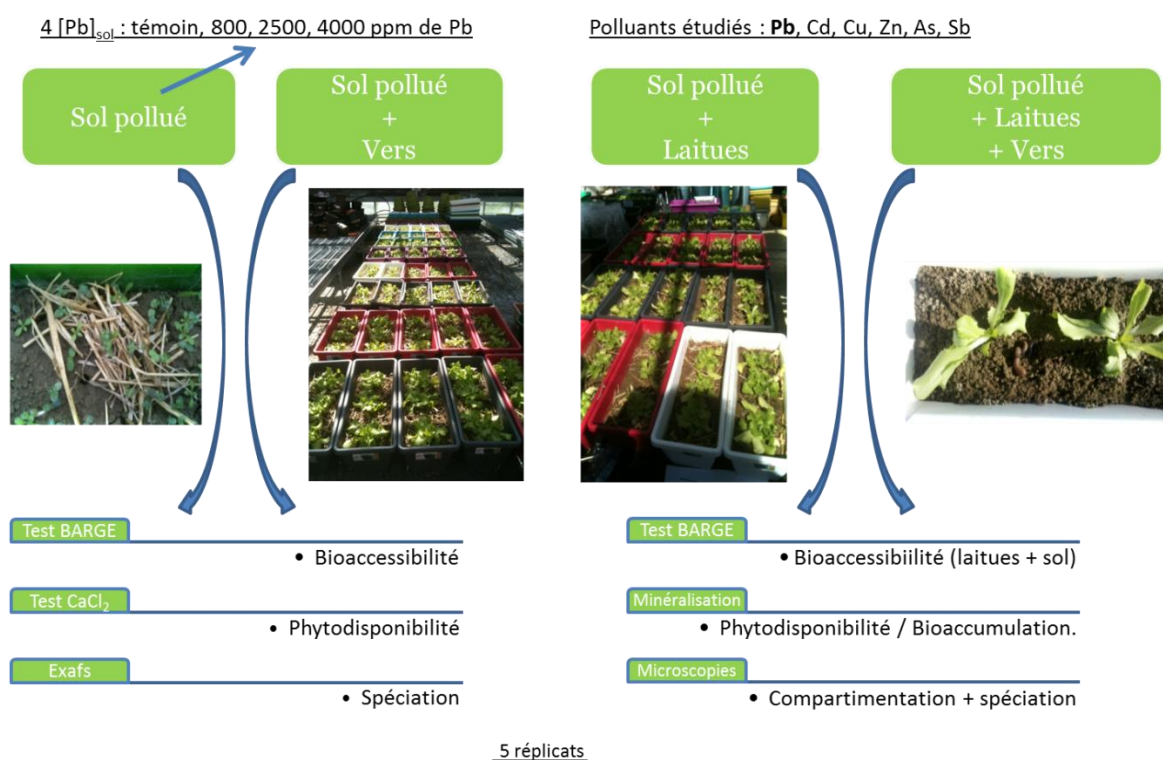


Figure II.3.3: Schéma du plan d'expérimentation en mésocosmes

2.3.2 Le RHYZOtest®

2.3.2.1 Principe

Créée par Niebes et al., (1993) et adaptée par Guivarch et al., (1999) et Chaignon & Hinsinger (2003), la technique de micro-culture en hydroponie permet la croissance de plantes dont les racines sont en contact avec le sol tout en étant séparé. Compte tenu de la petite quantité de terre utilisée et du contact intime sol-racines, le sol étudié peut être considéré comme un sol rhizosphérique, c'est-à-dire directement sous l'influence des racines. Le test fait l'objet d'un projet de norme intitulée « Qualité des sols – Expérimentation pour évaluer la disponibilité environnementale des ETM pour les plantes ».

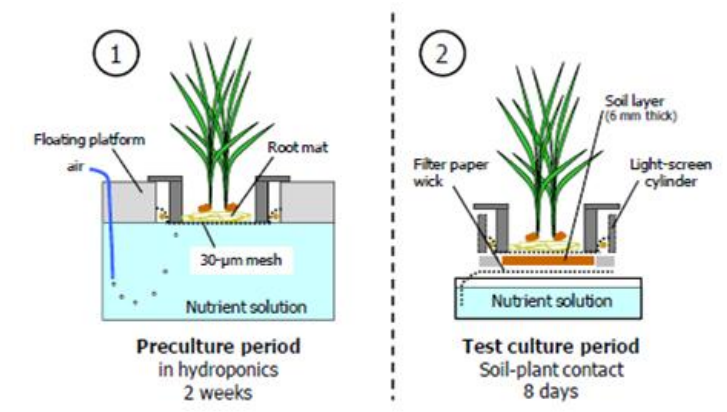


Figure II.3.4: Schématisation des deux étapes du protocole expérimental du le RHYZOtest® (ISO, 2011).

L'expérimentation en RHYZOtest® se compose de deux étapes pour la croissance des plantes. Dans la première étape (pré-culture), les plantes sont cultivées en hydroponie deux semaines pour atteindre une biomasse végétale conséquente et un système racinaire dense. Dans la deuxième étape (phase d'exposition) les plantes sont mises en contact huit jours avec une fine couche (environ 6 mm) de sol tamisé à 2 mm.

Une série de plantes témoins (feuilles et racines) ont été récoltées à la fin de la pré-culture de manière à contrôler leurs concentrations en éléments avant l'exposition avec le sol. Les concentrations en éléments traces dans les plantes sont déterminées à la fin de la phase d'exposition. Les objectifs de ce test biologique est de i) déterminer la concentration en éléments traces dans les feuilles et les racines à la fin de la période de culture ; ii) évaluer le flux d'absorption des éléments par les plantes au cours de la période de croissance.

2.3.2.1 Protocole

Les graines sont d'abord désinfectées au peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) à 6% (v/v) pendant dix minutes puis rincées à l'eau déionisée. Chaque graine est ensuite déposée sur la grille à la base de chaque cylindre afin d'obtenir une plante dans le dispositif. Le pot hébergeant la plante est conçu pour la maintenir du début de la période de la pré-culture jusqu'à la fin de la phase d'exposition. Le pot doit permettre à la plante de développer un système racinaire dense et plat, tout en maintenant une séparation physique avec les échantillons de sols analysés. Le pot est constitué d'un cylindre (PVC, Ø = 25mm) avec sa partie inférieure équipée d'une maille de nylon ayant une taille de pore de 30 µm (Figure II.3.5).

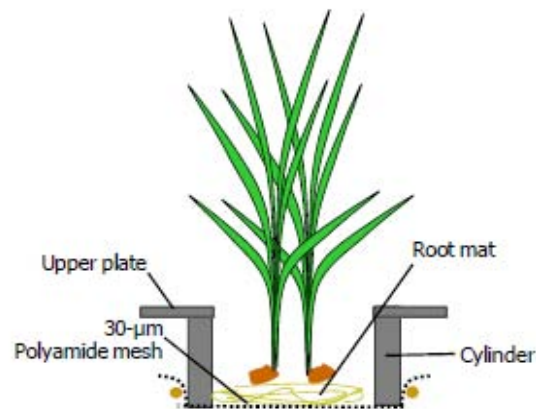


Figure II.3.5: dispositif utilisé pour accueillir la plante (ISO, 2011).

Le dispositif utilisé pour la phase de pré-culture est conçu pour permettre la germination des graines, le développement des semis et un mas dense de racines (Fig II.3.6). Ceci doit permettre un contact étroit ou une immersion partielle des graines et des racines dans la solution nutritive contenue dans un bac. Le dispositif se compose en une plate-forme perforée flottant à la surface de la solution nutritive et un système pour aérer continuellement cette dernière. La flottabilité de la plateforme est essentielle pour assurer un contact uniforme avec les pots et les différentes solutions nutritives en dépit de l'aération continue.

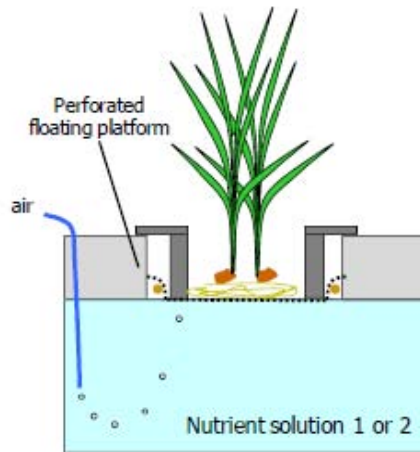


Figure II.3.6: Dispositif utilisé pour la phase de pré-culture (ISO, 2011).

Le dispositif utilisé pour la période d'exposition est conçu pour permettre un contact étroit entre l'amas de racines et la couche d'échantillon de sol (Figure II.3.7). Il se compose de deux chambres et d'une mèche de papier filtre insérée entre i) un système qui presse fermement le bac sur la couche de sol ii) un pot rempli de la solution nutritive. Ceci permet de maintenir le système racinaire en contact avec la surface de la couche de sol et de garder la mèche de papier filtre humide pendant toute la période du test.

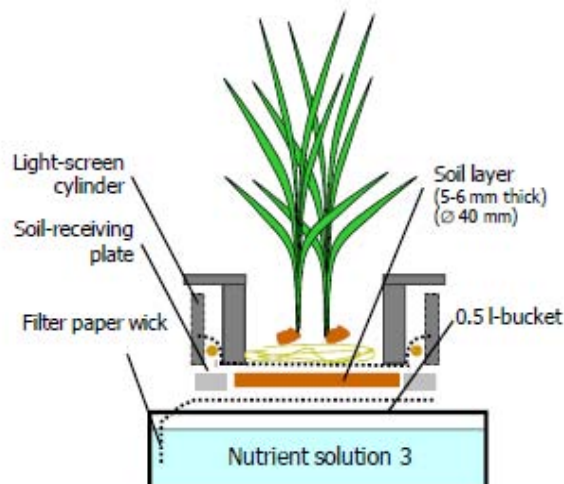


Figure II.3.7: Dispositif utilisé pour la phase d'exposition (ISO, 2011).

2.4. Biodisponibilité des ETM et impacts sur la santé humaine

Cette section portera sur l'étude de l'exposition des populations humaines aux ETM en se focalisant sur les notions de bioaccessibilité et biodisponibilité et sur l'étude de la toxicité des ETM sur les cellules épithéliales intestinales.

2.4.1 Mesure de la bioaccessibilité gastro-intestinale

Les mesures de bioaccessibilité gastro-intestinale ont été réalisées en utilisant le protocole européen BARGE (Oomen, 2000 ; Sips et al., 2001) qui simule les processus chimiques se produisant dans les différents compartiments du système digestif, la bouche, l'estomac et les intestins.

Table II.4.1: Composition des solutions digestives pour le test de bioaccessibilité UBM

	Salivaire (pH = 6.5 ± 0.5)	Solution gastrique (pH = 1.0 ± 0.2)	Solution intestinale (pH = 7.4 ± 0.2)	Solution billiaire (pH = 8.0 ± 0.2)
Inorganique	448 mg KCl 444 mg NaH ₂ PO ₄ 100 mg KSCN 285 mg Na ₂ SO ₄ 149 mg NaCl 0.9 ml NaOH 1M	1376 mg NaCl 133 mg Na ₂ PO ₄ 412 mg KCl 200 mg CaCl ₂ 153 mg NH ₄ Cl 4.15 ml HCl (37% g g ⁻¹)	3506 mg NaCl 2803 mg NaHCO ₃ 40 mg KH ₂ PO ₄ 282 mg KCl 25 mg MgCl ₂ 90 µl HCl (37% g g ⁻¹)	2630 mg NaCl 2893 mg NaHCO ₃ 188 mg KCl 90 µl HCl (37% g g ⁻¹)
Organique	100 mg urea	325 mg glucose 10 mg glucuronic acid 42.5 mg urea 165 mg glucosamine hydrochloride	50 mg urea	125 mg urea
Autres	72.5 mg α-amylase 25 mg mucin 7.5 mg uric acid	500 mg bovine albumin 1500 mg mucin 500 mg pepsin	100 mg CaCl ₂ 500 mg bovine albumin 1500 mg pancreatin 250 mg lipase	111 mg CaCl ₂ 900 mg bovine albumin 3000 mg porcine bile

Ceci est réalisé grâce à 3 étapes d'extractions successives mettant en œuvre des solutions digestives synthétiques. Quatre solutions digestives sont nécessaires pour le test in vitro BARGE : une solution salivaire, stomacale, duodénale et une biliaire. Leur composition et pH sont décrits dans le tableau II.4.1.

Les solutions digestives sont préparées la veille du test afin d'être agitées à l'aide d'un barreau magnétique pendant toute une nuit et peuvent être conservées pendant 48h en prenant soin de les maintenir au frais (4°C) après utilisation. Le pH doit être vérifié et ajusté si nécessaire avant le début du test à l'aide d'une solution de NaOH 1M et/ou HCl 37%.

Le jour des mesures, les solutions digestives sont placées au bain-marie à 37°C pendant 1 heure avant la première extraction. La température est ensuite maintenue à 37°C pendant toute la procédure d'extraction.

Pour chaque échantillon, nous avons besoin de deux répliques pour la phase gastrique nommés G1 et G2 et deux répliques pour la phase intestinale nommés I1 et I2, contenant chacun 0,6g d'échantillon à analyser.

La première extraction consiste à mélanger la matrice à tester (sol, végétal) avec 9 mL de solution salivaire (pH 6,5). Cette suspension est agitée à la main pendant quelques secondes. Ensuite 13,5 mL de solution gastrique (pH 1,1) sont ajoutés à la suspension. Le pH est vérifié et ajusté si nécessaire à 1,2 avec de l'HCl (concentration : 37% g/g). La suspension est par la suite mélangée pendant 1 heure à l'aide d'un agitateur « end-over-end » placé dans une étuve réglée à 37°C. Cette étape terminée, les échantillons sont retirés de l'étuve et une mesure de pH est alors nécessaire. En effet le pH de la suspension doit être compris entre 1,1 et 1,5 afin de rester proches des conditions stomachales. Si le pH est supérieur à 1,5, le test doit être recommencé depuis le début. Si la mesure de pH est satisfaisante les échantillons de la phase gastrique G1 et G2 sont centrifugés à 4500g pendant 15 minutes. Le surnageant est prélevé avec précaution et acidifié avec 500 microlitres d'HNO₃ (concentration 65% g/g) puis conservé à 4°C avant analyse par ICP-OES.

Les prochaines étapes s'appliquent seulement aux échantillons de la phase intestinale I1 et I2. 27,5 mL de solution duodénale et 9 mL de solution biliaire sont ajoutés à la suspension obtenue à la fin de la phase gastrique. Le pH est vérifié et doit être ajusté si

nécessaire avec NaOH 1M ou HCl 37% pour être compris entre 5.8 et 6.8. Les échantillons sont ensuite placés en agitation « end over end » à 37°C pendant 4 heures. Après cela le pH final est noté et les tubes sont centrifugés à 4500g pendant 15 minutes. Le surnageant est prélevé puis acidifié avec 1 mL d'HNO₃ 65% et conservé à 4°C pour être analysé par ICP OES. Cette manipulation est résumée sur le schéma ci-contre (figure II.4.1).

Test BARGE

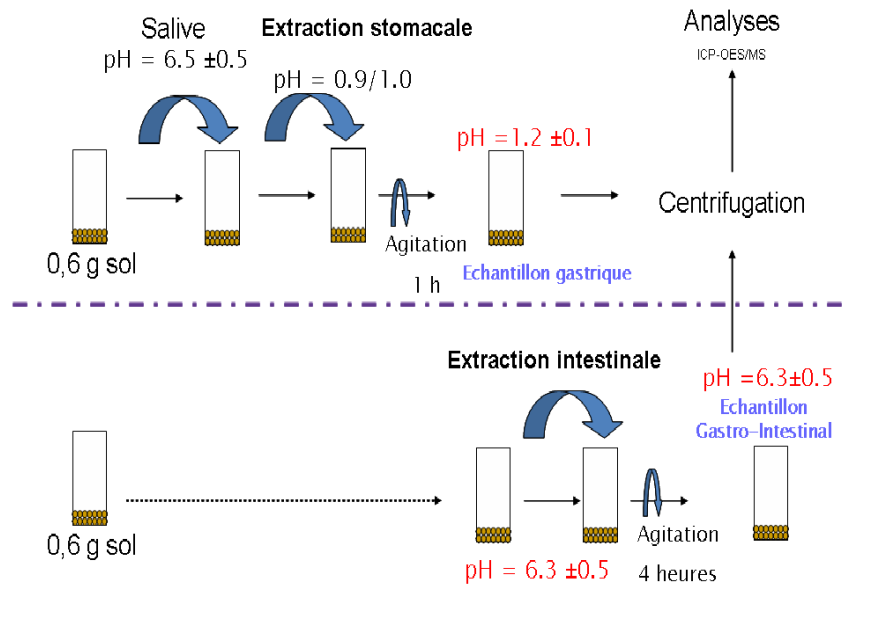


Figure II.4.1 : Description du test de bioaccessibilité BARGE (Caboche, 2009)

*

2.4.2 Étude de la cytotoxicité intestinale des ETM

2.4.2.1 La lignée cellulaire d'étude : Caco-2

Les cellules Caco-2 constituent une lignée cellulaire tumorale humaine d'origine intestinale isolée d'un adénocarcinome colique. Cette lignée cellulaire se différencie spontanément après avoir atteint la confluence en culture et présente plusieurs caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des entérocytes matures. La lignée cellulaire Caco-2 représente un modèle bien établi pour les études pharmacologique et toxicologique et pour l'étude du transport intestinal des nutriments et des xénobiotiques (Liu et al., 2004).

2.4.2.2 La culture cellulaire des Caco-2

Les cellules Caco-2 ont été cultivées dans un milieu de culture appelé « Minimum Essential Medium ». C'est un milieu de culture mis au point par Harry Eagle et utilisé pour l'apport d'éléments nutritifs nécessaires au maintien et à la prolifération de différents types de lignée cellulaire. Pour la culture des cellules, le milieu contient un supplément en sérum fœtal bovin, glutamine et streptomycine.

2.4.2.3 Les tests d'étude de la cytotoxicité

Les tests de cytotoxicité sont utilisés pour prédire la toxicité aiguë de substances chimiques pour les cellules et les tissus.

2.4.2.3.1 Test WST-1

WST-1 est un test colorimétrique d'évaluation de la prolifération et de la viabilité cellulaire. Le test est basé sur la réduction d'une molécule le WST-1 par la succinate déshydrogenase mitochondriale en un produit coloré le formazan (Fig. II.4.2). Plus la coloration est importante dans le milieu de culture, plus il y a eu de formazan formé et donc plus il y a de cellules conservant une activité mitochondriale. **Ainsi, le test WST-1 indique les effets chimiques sur le métabolisme mitochondrial et la toxicité respiratoire.**

L'absorbance est ensuite mesurée par spectrométrie à 450nm et comparée à l'absorbance témoin afin de déterminer l'effet cytotoxique des substances testées.

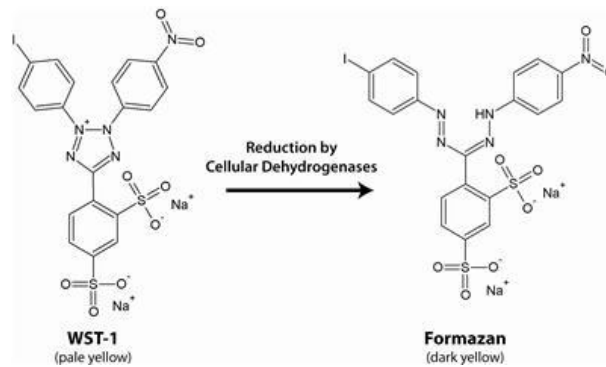


Figure II.4.1 : Réduction du WST-1 en Formazan

2.4.2.3.2 Test de perméabilité cellulaire

Dans certaines conditions de culture, ces cellules ont la capacité de se différencier spontanément en cellules intestinales polarisées pour former un épithélium mimant une barrière intestinale fonctionnelle (présence de microvillosités, jonctions serrées, transporteurs spécifiques, enzymes du processus de métabolisation,...).

L'essai sur cellules Caco-2 permet d'évaluer la perméabilité intestinale d'un composé chimique, c'est à dire sa capacité à traverser la paroi intestinale pour rejoindre la circulation sanguine et se distribuer dans l'organisme. Les cellules Caco-2 sont cultivées sur une membrane microporeuse d'insert placé dans des chambres de culture individuelles. Après une période de culture de 21 jours, les cellules forment une monocouche différenciée isolant les compartiments supérieurs et inférieurs de la chambre de culture.

L'utilisation d'un tel système permet d'avoir un accès direct et aisé aux cotés apical (lumière intestinale) et basal (milieu intérieur) de l'épithélium intestinale, permettant ainsi l'évaluation des échanges de matières entre les 2 compartiments.

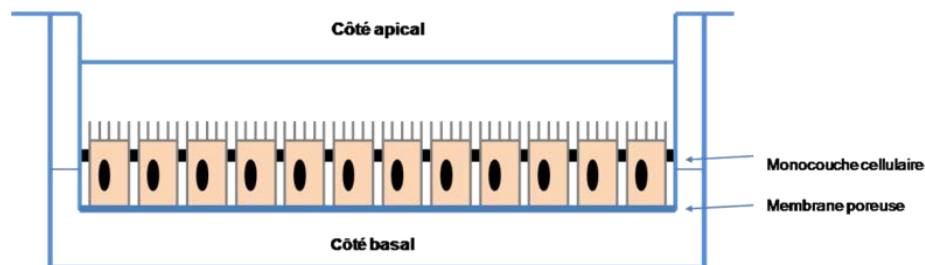


Figure II.4.3 : Schéma du puits d'étude de transfert cellulaire

Résultats et Discussion

► La première partie de cette section Résultats et Discussion concernera l'impact de la pollution en ETM sur un organisme clé du sol, le ver de terre (chapitre 3). L'écotoxicité des ETM sur cet organisme sera investiguée et discutée en fonction de leur biodisponibilité. Les vers de terre, par leur activité de bioturbation vont modifier la mobilité, le transfert et la biodisponibilité des ETM dans les sols. C'est pourquoi la deuxième partie de cette discussion (chapitre 4) portera sur l'influence de la bioturbation des vers de terre sur le transfert des ETM dans le sol. Les ETM sont ensuite absorbés par les plantes par transfert racinaire et les végétaux ainsi contaminés sont consommés par les populations. Ainsi la troisième et dernière partie de cette section (chapitre 5) s'intéressera à la bioaccessibilité gastro intestinale des ETM dans différentes matrices ainsi qu'à leur toxicité sur la barrière intestinale.

► J'ai choisi, pour le manuscrit, ce découpage qui met plus particulièrement en évidence les interactions entre biodisponibilité, écotoxicologie et toxicologie. La biodisponibilité étant au centre de ma problématique de thèse.

Chapitre 3

Evaluation de l'écotoxicité des métaux sur les vers de terre

Avant-propos

Les effets délétères des ETM sur la santé des vers de terre ont été largement étudiés au cours de ces dernières décennies. Nombre d'auteurs ont étudié l'effet du plomb, zinc, cadmium et cuivre sur les vers de terre mais le plus souvent individuellement (cf. références citées ensuite dans la publication) et peu d'études ont porté sur l'impact des sols pollués par un cocktail de contaminants dans le cas de sources particulières. De plus, ces études sont généralement focalisées sur du sol dopé par des solutions ou des particules riches en métaux. Il était donc important d'étudier l'effet d'une pollution multi élémentaire sur un organisme terrestre tel que le ver de terre. Ainsi dans l'étude qui suit, deux espèces de vers de terre ont été mises en contact, dans des microcosmes, avec un sol historiquement pollué par les rejets atmosphériques d'une usine de recyclage de batteries au plomb contaminé en Pb, Zn, Cu, Cd, As et Sb.

Lors d'une évaluation de risques sanitaires concernant les sols pollués en ETM, les notions de biodisponibilité ne sont pas prises en compte, seulement le sont les concentrations totales. Or, comme il sera illustré au cours de cette étude, à même concentration, les ETM ont un effet différent sur les vers de terre selon le type de sol testé. Afin de le démontrer, un sol historiquement pollué en ETM a été mélangé avec deux sols non contaminés aux caractéristiques physico-chimiques différentes afin d'en diluer les concentrations en ETM. La bioaccumulation des ETM par les vers de terre exposés à des sols aux caractéristiques contrastées s'est révélée différente. De plus, cette bioaccumulation a été corrélée aux effets observés des ETM sur les vers de terre. Ces effets ont été évalués grâce à différents paramètres écotoxicologiques : la mortalité, l'évolution de la biomasse et la cast production. Les études d'impact sont généralement réalisées avec l'établissement de DL_{50} (concentrations en contaminants provoquant 50% de mortalité dans la population d'organismes étudiés), parfois l'évolution de la biomasse et les effets sur la reproduction (production de cocons). Il y

a un manque de paramètres d'évaluation écotoxicologique pertinents adaptés aux rôles écologiques des vers de terre dans les sols. C'est pourquoi dans cette étude, un test mis en place par Capowiez et al., (2010) puis modifié par Dittbrenner et al., (2011) a été utilisé : la cast production. C'est la mesure de la production de turricules par les vers de terre. C'est un paramètre écotoxicologique comportemental puisqu'il permet d'évaluer l'activité de bioturbation des vers de terre dans les sols.

En résumé, cette étude porte sur l'impact des ETM sur deux espèces de vers de terre de groupes écologiques différents. Le sol testé est un sol pollué historiquement par les rejets atmosphériques et diffus d'une entreprise de recyclage de batteries au plomb et il est contaminé par un cocktail d'ETM. Il est intégré l'étude la biodisponibilité des ETM pour les vers de terre avec l'identification de paramètres physico-chimiques du sol influençant cette dernière. Enfin, la cast production, test écotoxicologique pertinent pour évaluer le rôle écologique des vers dans le sol a été utilisé. Les objectifs de cette étude sont résumés dans le schéma ci-dessous (Figure III.1.1)

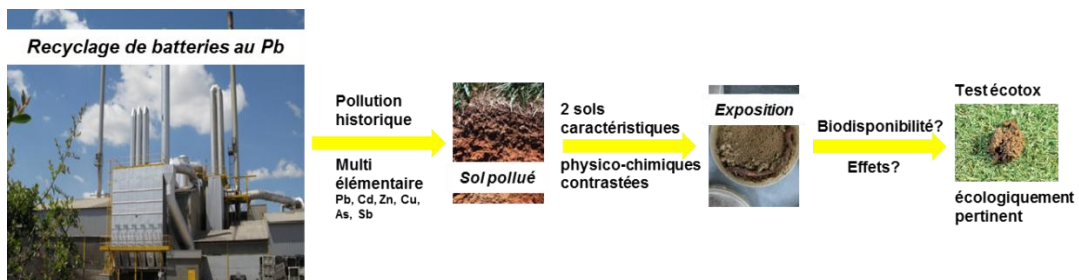


Figure III.1.1 : objectifs de l'étude d'impact des ETM sur les ver de terre

► Le travail réalisé dans ce chapitre a été valorisé par une publication acceptée dans la revue *Environmental Pollution* : Lévêque et al. 2013. « Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species ». *Environmental Pollution* 179, 232-241. Cette publication est présentée dans son ensemble ci-dessous.

3.1. Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species (*Eiseina hortensis* and *Lumbricus terrestris*)

Thibaut Leveque^{a,b}, Yvan Capowiez^c, Eva Schreck^d, Christophe Mazzia^e, Mélanie Auffan^f, Yann Foucault^{a,b,g}, Annabelle Austruy^{a,b}, Camille Dumat^{a,b,*}

^a Université de Toulouse, INP-ENSAT, Av. Agrobiopôle, PO Box 107, Auzeville-Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France

^bUMR 5245 CNRS-INP-UPS, EcoLab, Av. Agrobiopôle, PO Box 107, Auzeville-Tolosane, 31326 Castanet-Tolosan, France

^c INRA, UR 1115, Plantes et Systèmes Horticoles, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 09, France

^d GET, UMR 5563 CNRS/UPS/IRD/CNES, 14 Avenue Edouard Belin, 31400 Toulouse, France

^e IMBE, UMR CNRS 7263 e IRD 237, France

^f CEREGE, Europôle Méditerranéen de l'Arbois, Avenue Louis Philibert, BP 80, 13545 Aix en Provence cedex 04, France

^g STCM, 30 Avenue Fondeyre, 31200 Toulouse, France

Mots-clefs : Earthworms, Inorganic trace elements, Ecotoxicity, Cast production, Soil properties, Biodisponibilité

3.1.1 Introduction

In the last decade, the soil area polluted by atmospheric fine particles enriched with metals and metalloids (noticed PM) has increased (Schreck et al., 2011), especially due to the development of metal recycling activities (Foucault et al., 2013; Uzu et al., 2009). As reported by Cecchi et al. (2008), the different stages in the recycling process in these facilities lead to PM emissions which contaminate the soil and therefore have a potential impact on terrestrial ecosystems (Schreck et al., 2011). Earthworms are the dominant soil organisms in most temperate and tropical grassland soils (Lee, 1985). As reported by Nahmani et al. (2007a) they modify chemical and physical soil parameters, mix leaf litter with the soil, form and stabilize aggregates and generate soil porosity. According to Ruiz et al. (2011), they can also influence the behaviour of inorganic elements in soils (pollutants and nutrients). Earthworms are therefore important terrestrial model organisms for toxicity testing to assess environmental pollution (Schreck et al., 2008; Capowiez et al., 2010; Schreck et al., 2012). These soil organisms can provide important information about environmental risks and could serve as useful biological indicators of contamination because of the fairly consistent correlation between the concentration of some contaminants in their tissues and in soils (Nannoni et al., 2011). Pauget et al. (2011) concluded that only partial information is obtained from the chemical extractions currently used to assess metal bioavailability: biota measures are therefore needed for risk assessment studies. In their review about the interactions between earthworms and

inorganic trace element (ITE), Nahmani et al. (2007b) considered several parameters such as earthworm species, soil type, metal type and experimental conditions. They suggested several priority areas for further studies: in particular, other earthworm species besides *Eisenia fetida* (currently used in normalized ecotoxicity tests) should be studied in order to apply the large existing database on this earthworm to other soil dwelling species. Then, so that studies from different research experiments can be accurately compared, a set of standard protocols for the exposure and depuration periods is needed and precise parameters, such as soil chemical and physical properties, should be defined. It was also recommended that more field or terrestrial model studies using real contaminated soils rather than metal-amended artificial soils should be performed. Recently Schreck et al. (2011) showed that ageing can influence metal transfer and ecotoxicity. Furthermore, although ITE bioaccumulation by earthworms has been widely studied for one ITE in particular (Nahmani et al., 2007b) and with spiked soils (Nahmani et al., 2007a,b), studies on multi-metal pollution under field or close to real conditions remain not numerous (Andre et al., 2010a, 2010b; Nannoni et al., 2011). It is increasingly accepted that for risk assessments, measures of total ITE concentrations must be complemented with data on the available or mobile ITE concentrations in soils. Therefore numerous studies reported the use of chemical extractions such as CaCl₂ extraction to assess metal bioavailability (Uzu et al., 2009; Schreck et al., 2011).

Actually, these chemical extractions can break bonds between metals and clay or organic matter, releasing metals and making them bioavailable for earthworms (Owojori et al., 2009). Moreover, fewsoluble and unfixated to organic matter particles are then available for earthworms via soil ingestion. According to Morgan and Morgan (1999), earthworm behavior such as burrowing and feeding affect their exposure to the pollutants. Parameters such as the earthworm species and soil conditions could therefore strongly influence metal ecotoxicity (Tomlin, 1992). In addition, as mentioned by Capowiez et al. (2010), there is currently a lack of ecotoxicity tests adapted to ecologically relevant earthworm species and with endpoints which could be directly related to their ecological role in the soil. A new behavioural biomarker, cast production, was thus recently proposed by Capowiez et al. (2010). This test was first elaborated for *Lumbricus terrestris* (high bioturbation activity) under laboratory conditions, but was then adapted to *Aporrectodea caliginosa* (Dittbrenner et al., 2011). Once deposited on the soil surface, PM can have deleterious effects on soil micro and macrofauna. Earthworm soil activities such as burrowing, casting and mixing of litter and soil (bioturbation) have important consequences for soil processes and properties. Thus earthworms may also modify PM fate, mobility (Sizmur and Hodson, 2009), availability (Ruiz et al., 2011) and speciation. However, those modifications will be less pronounced if PM toxicity affects earthworm behaviour (Vorenhout et al., 2000). It is therefore important to first assess any behavioural changes in earthworms which may be induced by PM. The aim of the present study was to assess the toxicity of various

polluted soils on two earthworm species (*Eiseina hortensis* and *Lumbricus terrestris*). The soils were collected from a lead recycling facility and contaminated with Pb, Cd, Cu, Zn, As and Sb. The two earthworm species belong to two different ecological types and are thus likely to have contrasting behavioural responses. The original and innovative aspect of this paper consists in the utilization of historically polluted soil from a lead recycling facility. In this way, a cocktail of metals and metalloids, as well as the influence of different soil characteristics, could be studied, to carry out complementary ecotoxicity tests. Then, metal bioaccumulation studies and microscopy experiments will be performed to better understand metal localization and tissues storage in earthworms in order to investigate the uptake pathway.

3.1.2 Materials and methods

3.1.2.1 Soil preparation

The heavily polluted soil (noted as S1) used in this study was collected from a lead recycling facility at a chemical metal treatment company (STCM) which currently recycles batteries. The facility is located in the urban area of Toulouse, in the southwest of France (43_3801200 N, 01_2503400 E). For several decades, the industrial activities at the site have produced high concentrations of Pb and other ITE such as Cd, Cu, As, Sb, Zn in surface soils (Uzu et al., 2009; Schreck et al., 2011). This historically polluted soil (from the facility courtyard) was sampled from the top 0-25 cm soil layer, air-dried at ambient temperature for a week,

disaggregated and, finally, sieved to retain aggregates smaller than 2 mm. Total ITE concentrations were measured according to [Dumat et al. \(2006\)](#) by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES) on an IRIS Intrepid II XXDL apparatus, following triacid (HF, HCl and HNO₃) digestion of the solid samples. A standard reference soil (GRX2) was used to verify the digestion protocol and measurement accuracy. All the results correspond to the mean of two replicates. Values were the following: Pb=39800, Sb=2095, Zn=294, As=288, Cu=286 and Cd=18.36 mg.kg⁻¹. This highly contaminated soil was used to establish a pollution concentration gradient to which earthworms were exposed.

The polluted soil was diluted with two uncontaminated control soils: referred to as S2 and S3, according to [Uzu et al. \(2009\)](#). The soil was then left in the open air to stabilize for one month ([Schreck et al., 2011](#)). The uncontaminated S2 had similar characteristics to polluted S1 (pH, texture and OM %) whereas S3 was poorly enriched in organic matter and more calcareous. This soil preparation procedure allowed both the influence of ITE concentration and soil type (organic matter concentration and pH, in particular) on earthworm ecotoxicity to be studied. [Table 1](#) provides details on the concentrations and some physico-chemical information of these three soils measured according to normalized procedures. [Table 2](#) shows the notations used and ITE concentrations in the soils used. When S1 is pure, the pollutant concentration is maximal, noted as C5-S1. When the uncontaminated soils S2 and S3 are pure, the concentrations are minimal and noted as C0-S2 and C0-S3, respectively. The following notations were then used: (C1-S2, C2-S2, C3-S2 and C4-

S2) or (C1-S3, C2-S3, C3-S3 and C4-S3) when mixtures of (S1 & S2) or (S1 & S3), respectively, were studied. For convenience, the different dilutions were referred to for their final total lead concentration: C1=100; C2=825; C3=1650; and C4=4000 mg kg⁻¹. The emission of particles from the recycling plant is the source of the S1 soil pollution. These PM sources were characterized and their solubility measured by [Uzu et al. \(2009\)](#). All the process particles contained the same major lead phases (Pb, PbS, PbO, PbSO₄ and PbO, PbSO₄) but differed on the nature and amount of minor phases. The size distribution of the particles was previously determined by laser granulometric analyses using a Malvern Mastersizer S: the PM mainly contains fine particles (91% are less than 10 μm). Their total element contents were determined by ICP-OES Intrepid II XXDL after heat digestion ([Uzu et al., 2009](#)): lead was the main metal (33.4%) and the other metal contents were Cd, Sb, As, Cu and Zn at 2.7, 1.8, 0.09, 0.09 and 0.7% respectively. The estimation of their metal solubility was performed using 0.01 M CaCl₂ extraction procedure.

3.1.2.2 Earthworms

Two earthworm species (*Eisenia hortensis* and *Lumbricus terrestris*) were chosen in the experimental set-up. *Eisenia hortensis* is an epigeic species closely related to *Eisenia fetida*, which is currently used for normalized ecotoxicity tests ([Fuller-Espie, 2010](#)). *Lumbricus terrestris* is an anecic species that dominates earthworm biomass in various temperate ecosystems and strongly affects organic matter transformation and soil

development (Maleri et al., 2008). Adult earthworms (*L. terrestris* and *E. hortensis*) were purchased from a local supplier (Decathlon, France). Before exposure experiment, earthworms were acclimatized during one week in the experiment conditions (temperature, obscurity, soil moisture.).

3.1.2.3 Experimental set-up

Small plastic Petri dishes (diameter=8 cm and height=3 cm) were filled with 100 g of wet soils sieved to 2 mm. Earthworms were added in the boxes: one earthworm by petri dish for *L. terrestris* and *E. hortensis*. Six experimental series were carried out simultaneously for each soil and each earthworm species, one series for each metal concentration. Each series consisted in seven replicates with either *L. terrestris* or *E. hortensis* and three boxes were used as controls without earthworms. Earthworms were exposed for 14 days. The

boxes were stored in a dark chamber at a constant temperature of 12 °C. At the beginning of the experiment, soil moisture was measured and adjusted to 19%, corresponding to 65% and 75% of water holding capacity respectively for S2 and S3, then checked regularly by weighing the Petri dishes and adjusted to the desired value by adding distilled water and mixing the soil (without destroying the casts).

3.1.2.4 Ecotoxicity parameters

To evaluate the impact of contaminated soils on earthworms, three endpoints were monitored: mortality, biomass changes and cast production (CP). Earthworm weight was determined at the beginning of the experiment, after 7 days and at the end of the exposure period. For this, earthworms were rinsed in distilled water and gently dried on filter paper (without gut voiding). Biomass changes were expressed as a percentage of the initial biomass.

Table 1: Detailed characteristics of each of three soil types used in this study

Soil	Soil characteristics
S1	pH = 6
	Organic matter : 5.2%
	12% clay, 47 % silt and 41% sand
S2	pH=5.7
	Organic matter: 4.5%
	13 % clay, 48 % silt and 38 % sand
S3	pH=7.6
	Organic matter: 1%
	22 % clay, 26 % silt and 52 % sand

According to Capowiez et al. (2010), CP is an ecologically meaningful and promising biomarker for ecotoxicity tests, but some aspects should be carefully considered for this marker to be widely used and accepted. First of all, preliminary tests need to be carried out to adapt (i) mesh size and test duration to the earthworm species under investigation and (ii) soil water content to soil texture. The key parameters are the soil moisture content and the initial soil particle size distribution. CP was therefore measured according to the protocol recently described by Capowiez et al. (2010) and modified by Dittbrenner et al. (2011). Casts were separated using a set of four sieves (diameter=15 cm and mesh sizes= 5.6, 4, 3.15, 2.5 mm). The principle is that earthworm activity will modify soil granulometry leading to an increase in the amount of soil retained in some sieves (casting) and a decrease in others (soil consumption). All soil from each Petri dish, including the soil that adhered to the walls of the dishes which was removed with a knife, was sieved taking care not to break up the casts. The set of sieves was manually shaken for 10 s. The soil retained in each sieve was weighed. The effect of

earthworm bioturbation was then examined by determining the changes in the particle size distribution (PSD), i.e. weight of fresh soil in each sieve minus the corresponding weight of soil for the control soil (without earthworm). CP was measured immediately after the 14th day of exposure. It was expressed as cast fresh weight per earthworm fresh body mass per day.

3.1.2.5 Metal bioaccumulation

ITE concentrations in earthworm bodies were determined after acidic digestion. Invertebrates were digested with a mixture of 1 mL HNO₃ 70% and 0.5 mL of fluorhydric acid 51% in Teflon bombs placed on heating plates at 90 C for 2 days. After evaporation, 1 mL H₂O₂ 30% and 1 mL of HNO₃ 70% were added and the Teflon bombs replaced on heating plates at 90°C for 2 days. The samples were then evaporated at 50°C. Ultra-high purity water was used for dilutions. Solutions were stored at 4°C in polyethylene tubes before analysis.

Table 2: Metals and metalloids concentrations in the studied soils (mg kg⁻¹)

Concentrations	Pb	Cd	Cu	Zn	As	Sb
C ₀	19.2	0.27	21.6	75.7	0.05	0.05
C ₁	100	0.31	22.3	76.2	0.7	5.3
C ₂	825	0.64	27.1	80.2	6	43.4
C ₃	1650	1	32.6	84.8	11.9	86.8
C ₄	4000	2.1	48.2	97.6	28.9	210.5

ITE concentrations were measured by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry ICP-OES (IRIS Intrepid II XXDL) or inductively coupled plasma-mass spectrometry ICP-MS (X Series II, Thermo Electron). Ten blank samples were submitted to the same treatment (mineralization and assay) for method control. They were performed to verify the non-contamination during acidic digestion. Each sample was analysed in triplicate. The detection limits for Pb, Cd, Sn, Sb, As, Cu and Zn were 0.3, 0.2, 0.2, 0.2, 0.2, 1.3 and 2.2 mg.L⁻¹ respectively, whereas, the limits of quantification were about 0.4, 0.3, 0.3, 0.4, 0.3, 2 and 3 mg.L⁻¹ respectively for the same inorganic trace elements. Measurement accuracy was verified using reference material: lobster tissue (TORT-2) was used as a reference material for earthworm mineralization whereas standard soil reference material (from National Institutes of Standards and Technology: NIST) was used for soil acidic digestion. The concentrations found were within 95-102% of the certified values for all measured elements. Internal ITE concentrations were indicated as (IC). Following Nannoni et al. (2011), Bio Accumulation Factors (BAF) were calculated as the ratio of the element concentration in the earthworm (in mg.kg⁻¹ of dry weight) to the total soil element content (in mg.kg⁻¹ of dry weight).

3.1.2.6 Micro-X-ray fluorescence (μ XRF) experiments

In order to investigate the distribution of accumulated Pb within earthworm tissues, X-ray fluorescence micro-spectroscopy (μ -XRF) analysis was performed on transversal histological

sections of *L. terrestris* earthworms in the intestinal region. For μ XRF experiments, earthworms were exposed to the most polluted soil (S1) during 14 days and lead was the principal metal investigated because of its high content in S1. μ XRF measurements were performed after a gut-voiding period on filter paper during five days. During the analysis the samples were fix and kept frozen using a Peltier freezing system. Experiments were carried out using a microscope (XGT7000, Horiba Jobin Yvon) equipped with an X-ray guide tube producing a finely focused beam with a 10 μ m or 100 μ m spot size (Rh X-ray tube, 30 kV, 1 mA equipped with an EDX detector), as described by [Lapied et al. \(2011\)](#).

3.1.2.7 CaCl₂ extraction

To assess the available fraction of inorganic pollutants in the soil, extraction with neutral salts is the most useful indication ([Menzies et al., 2007](#)). A 0.01 M CaCl₂ extraction procedure gives a good indication of lead availability. The CaCl₂ procedure was performed on S2 + S1 and S3 + S1 for all concentrations. 30 mL of 0.01 M CaCl₂ solution was mixed with 3 g of soil (1:10 solid solution ratio) in 50 mL polypropylene centrifugation tubes placed on a shaker table (Heidolph promax 1020) at 50 oscillations min⁻¹ for 2 h, 20 C. After extraction, the tubes were centrifuged at 10,000 g for 30 min. The supernatant liquid was then filtered (0.22 mm), acidified to 2% with distilled HNO₃ (15 M, suprapur 99.9%) and stored at 4°C before analysis. Extracted ITE concentrations were determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry

(ICP-AES) on IRIS Intrepid II XXDL apparatus.

3.1.3 Results

3.1.3.1 Mortality and biomass changes

Throughout the experimental period, no earthworms died in the uncontaminated control soils (C0). Thus, this suggests that the experimental conditions were valid in terms of providing suitable media for earthworm survival. Regardless of the concentration of polluted soil applied, earthworm mortality was less than 5% in S2 and no mortality was observed for S3. For both earthworm species, the most significant weight losses were always observed following incubation in polluted soil S1 (Fig. 1) and the mortality recorded in this S1 soil was about 10.5%. After 14 days of exposure to increasing concentrations of ITE, the *L. terrestris* biomass was significantly reduced in S2 at concentrations C3 and C4 compared to the control group and increased significantly for C1 and C2. In contrast, no significant differences were found for worms incubated in the S3 soil, regardless of the pollutant concentration. Similar results were observed for *E. hortensis* (Fig. 1), but weight losses were only significant for the C4 concentration in S2 (-6.6%). No significant decreases in weight were observed for any pollutant concentration mixed with S3 control soil, however earthworm weight did significant increase after 14 days at concentrations C2, C3 and C4.

3.1.3.2 Cast production

According to Fig. 2, both earthworms' species produced significantly

less casts in the polluted soil S1 compared to the control group. For *L. terrestris*, CP was significantly lower compared to the control group at the C4 concentration in S2, with a decrease of 30.5%. In contrast, no significant differences in CP were observed in S3 soil mixed with polluted soil compared to controls (Fig. 2). For *E. hortensis*, a significant decrease was observed for the C3 and C4 concentrations in S2, with a decrease in CP of approximately 65.5% and 99.5%, respectively, compared to controls. As observed for *L. terrestris*, no significant differences were observed for S3 conditions (Fig. 2).

3.1.3.3 Metal bioaccumulation

The mean concentrations of Pb, Cd, Cu, As, Sb, and Zn (expressed as mg kg⁻¹ dry weight) in *L. terrestris* and *E. hortensis* specimens are reported in Table 3 for S1 and in Fig. 3 for S2 and S3. Differences were observed between the element contents in tissues and between the two earthworm species for all the concentrations. Except for Zn, the ITE concentration in *L. terrestris* and *E. hortensis* exposed to C2, C3, C4 was higher than in the control group, in both soil types. Internal concentrations of pollutant (except for Zn and Cd) in *L. terrestris* were significantly higher in earthworms incubated in S2 than in S3 (Fig. 3). IC of Pb and Sb in *E. hortensis* were higher in earthworms incubated in S2 than in S3 (Fig. 3). Table 4 shows all the bioaccumulation factors (BAF) for *L. terrestris* and *E. hortensis*. For both species, BAF values were ranked as follows: Cd > Zn >> As > Cu > Pb Sb. Only Cd and Zn had BAF values above 1,

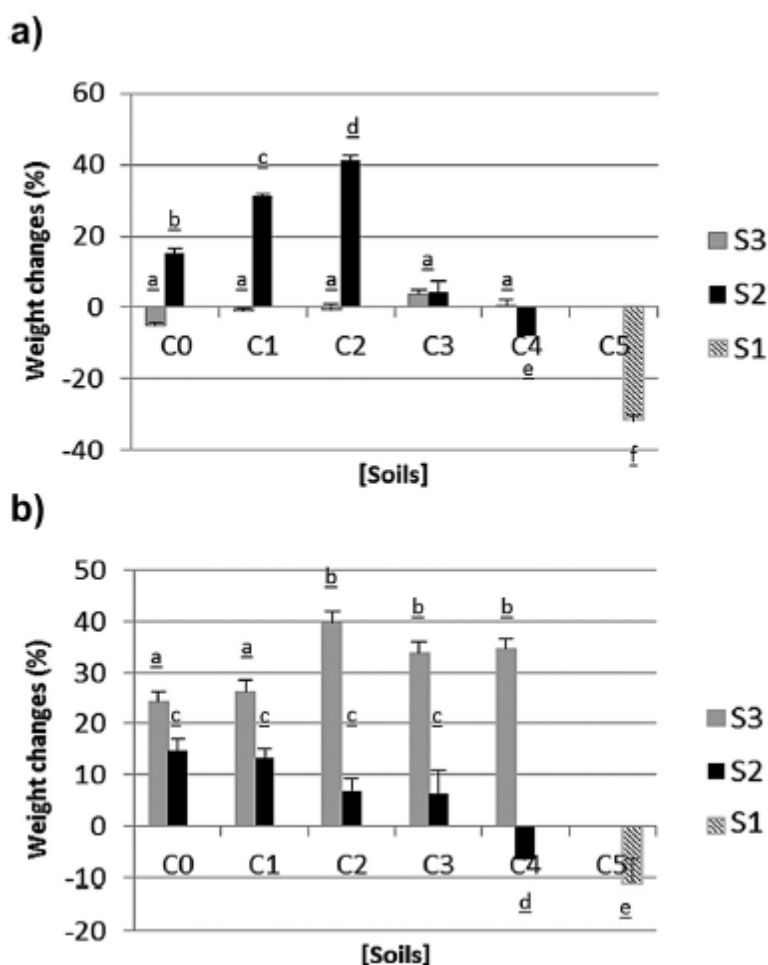


Fig. 1. Biomass changes as a percentage of the initial mass at the end of the 14 day experiment for *Lumbricus terrestris* (a) and *Eisenia hortensis* (b) incubated in different concentrations of polluted soil (a,b,c,d,e,f weight changes significantly different ($p < 0,05$) for one way ANOVA.).

indicating that the two elements were not only taken up but also bio-accumulated in the earthworms. For the other ITE, BAF values were below 1.

3.1.3.4 Lead distribution within earthworm tissues: μ XRF

The distribution of accumulated Pb within transversal histological sections of earthworms in the intestinal region was performed by μ -XRF and microscopy

observations were given in (Fig. 4). Results showed that even after depuration, Pb remains localized in the gutwall and above all in the longitudinal muscles of exposed earthworms (Fig. 4). The mean XRF spectra generated from the hyperspectral maps and the presence of the fluorescence lines at 10.5 KeV (Pb La emission line) and 12.6 KeV (Pb Lb emission line) confirmed the presence of Pb (Fig. 4).

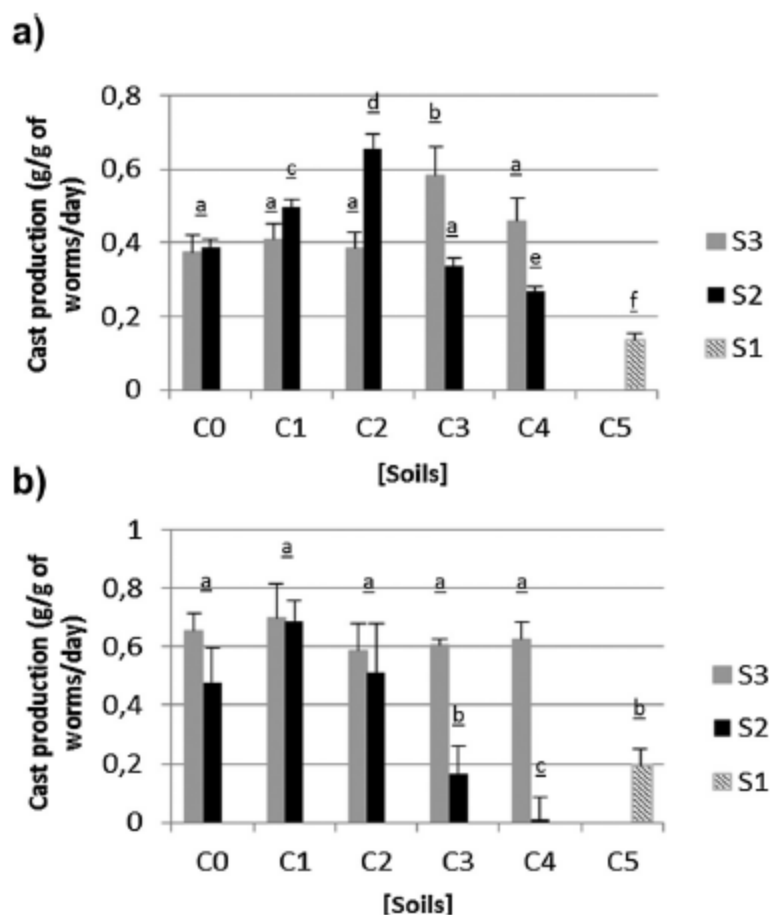


Fig. 2. Casts produced over the course of the experiment (g g⁻¹ of earthworm day⁻¹) by *Lumbricus terrestris* (a) and *Eisenia hortensis* (b) incubated in different concentrations of polluted soil (a,b,c,d,e cast production significantly different ($p < 0,05$) for one way ANOVA.).

3.1.3.4 CaCl₂ extraction

Table 5 shows the results of CaCl₂ metal extraction from S1, S2 and S3 (expressed as a percentage of the soil concentration) and from the PM emission (expressed as the percentage of total metal content.). The fraction of extractable ITE was always higher from S2 than S3 for all the considered ITE. Table 5 reported the values only for C4 concentration because ITE extractable fraction was not detectable by ICP-OES for C1, C2 and C3 concentrations.

3.1.4 Discussion

3.1.4.1 Viability and ecotoxicity

This experiment focused on the effects of a cocktail of ITE (lead being the major pollutant), on earthworm health and behaviour. Lethality effects were only observed in the soil containing the highest ITE concentrations (40,000 mg Pb kg⁻¹ and other ITE, see Table 1). These results confirm that the control experimental conditions were suitable for earthworm survival and that PM polluted soil is not toxic enough to have lethal effects on earthworms until 4000 mg Pb kg⁻¹.

Table 3: Internal concentrations of metals in *Lumbricus terrestris* and *Eisenia fetida* for S1 (=C5) (mg kg⁻¹)

	Species	Pb	Cd	Cu	Zn	As	Sb
S1	<i>Lumbricus terrestris</i>	8659	26.2	85.3	503.2	24	695
	<i>Eisenia hortensis</i>	932	7.2	23.9	130.6	8.2	45.9

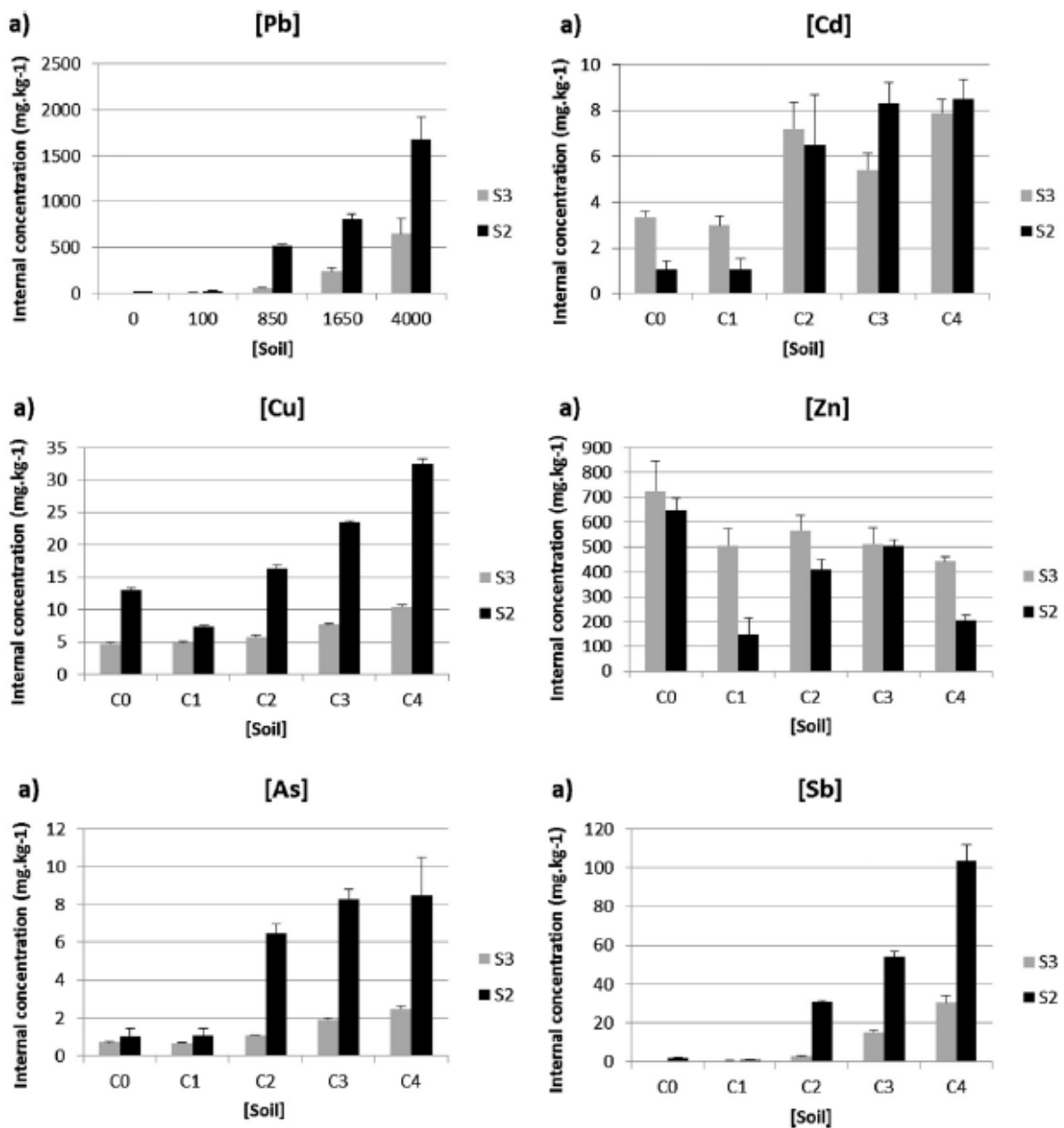


Fig. 3. Total internal content of each element in *Lumbricus terrestris* (a) and *Eisenia hortensis* (b) incubated in S2 and S3 and different concentrations of polluted soil.

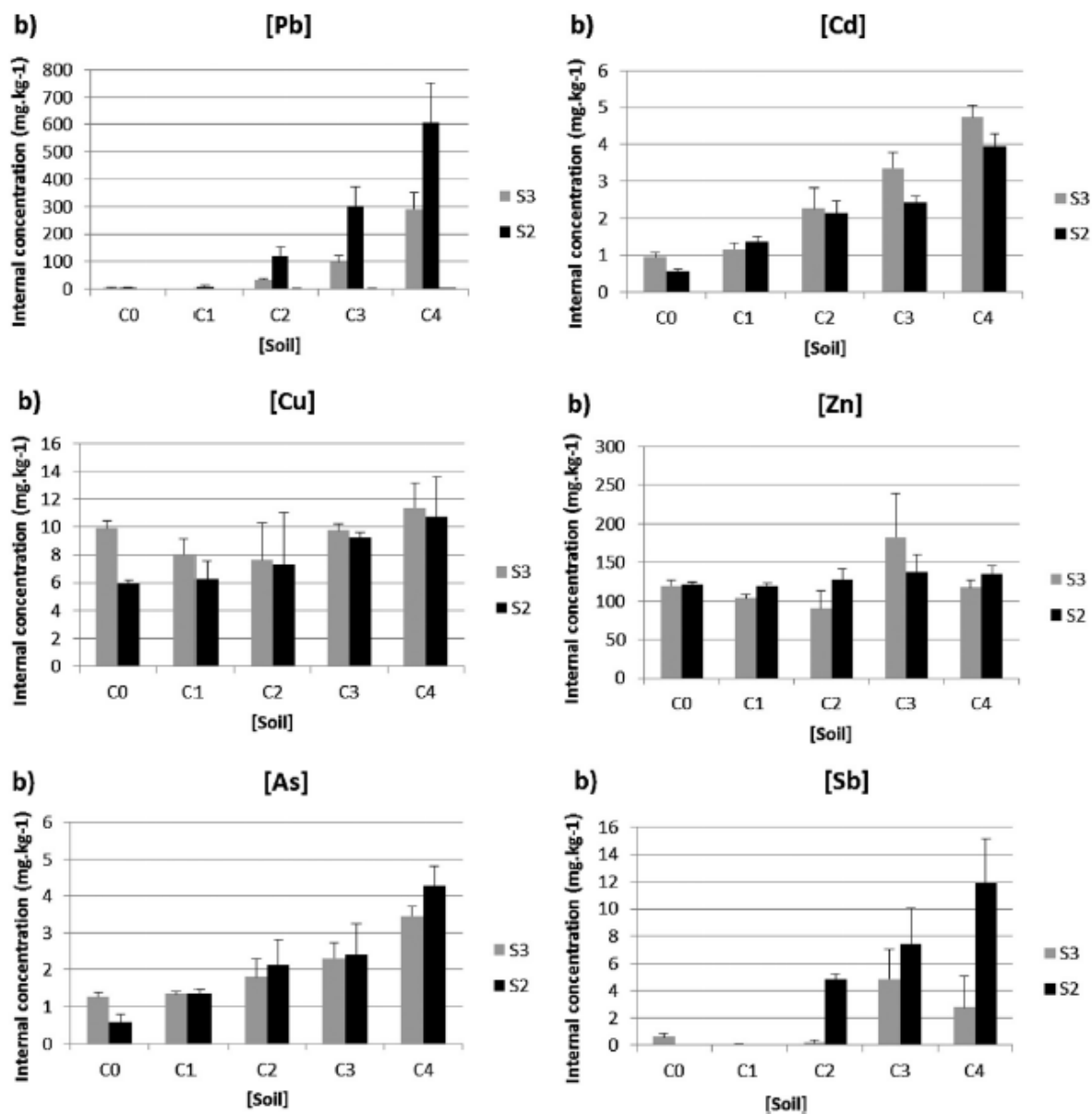


Fig 3. (continued)

Davies et al. (2003) measured a LC50 of 5311 mg Pb kg⁻¹ for earthworms exposed for 14 days to nitrate lead spiked soil. This lower lethal concentration could be explained by the different experimental conditions. The stability and lack of lethality for biological organisms observed here were previously reported by Schreck et al. (2011) working with the same long-term polluted soil. However, several sublethal effects were observed in this Petri dish experiment. Changes to physiological and behavioural endpoints

such as biomass and CP were observed at the highest concentrations. These effects suggest that atmospheric pollution can have a significant impact on earthworm physiology (locomotion, nutrition.). As shown in Table 6, ITE can impact earthworm physiology and ecotoxicity depends on earthworm species and soil characteristics. Indeed, Reinecke et al. (2001) studied the cocoon viability of three earthworm species following exposure to substrates contaminated with lead nitrate, cadmium sulphate and zinc sulphate for 36

months. They concluded that different earthworm species can have significantly different sensitivity to ITE. As reported by Ernst et al. (2008), soil properties can modify metal bioavailability and their subsequent impacts on earthworm physiology and behaviour. In the present study we compared a clayed, organic matter rich, acidic soil (S2) with a higher pH sandy soil (S3), and showed that S3 had less impact on earthworm health. Furthermore, extraction with CaCl₂ (Table 4) to simulate solid solution transfer for pollutants, showed that metals were more

mobile in the more acidic soil S2 which suggests that soil pH plays an important role. According to Bradham et al. (2006), soil pH can increase the fraction of soluble metals. Van Decastele et al. (2004) reported that, compared to the surrounding environment, earthworm biomass was four times lower in contaminated dredged sediment-derived heavy clay soils, but comparable when earthworms were incubated in sandy loam soils. The same results were observed in the present experiment.

Table 4: Heavy metal bioaccumulation factors (BAF) for *L. terrestris* and *E. hortensis*

		Sols	Pb	Cd	Cu	Zn	As	Sb
<i>Lumbricus terrestris</i>	S2	C0	1.2	3.9	0.6	8.55	ND	ND
		C1	0.19	3.33	0.33	1.97	1.454	0.19
		C2	0.62	10.1	0.6	5.12	1.090	0.71
		C3	0.41	8.13	0.27	5.93	0.695	0.78
		C4	0.42	4.07	0.67	2.10	0.294	0.49
	S1	C5	0.31	1.8	0.42	2.27	0.121	0.46
		Sols	Pb	Cd	Cu	Zn	As	Sb
	S3	C0	0.22	12.33	0.22	9.58	ND	ND
		C1	0.06	9.46	0.22	6.63	0.93	0.10
		C2	0.07	11.16	0.21	7.05	0.18	0.06
		C3	0.14	5.28	0.23	6.04	0.16	0.17
		C4	0.16	3.77	0.21	4.53	0.08	0.14
	S1	C5	0.12	1.06	0.17	1.14	0.04	0.19
<i>Eisenia hortensis</i>	S2	Sols	Pb	Cd	Cu	Zn	As	Sb
		C0	0.28	2.11	0.27	1.60	ND	ND
		C1	0.07	4.29	0.28	1.56	1.87	ND
		C2	0.14	3.30	0.27	1.59	0.35	0.11
		C3	0.18	2.37	0.28	1.62	0.20	0.08
	C4	0.15	1.89	0.22	1.38	0.14	0.05	
	S1	C5	0.03	0.40	0.07	0.44	0.05	0.04
		Sols	Pb	Cd	Cu	Zn	As	Sb
	S3	C0	0.26	3.49	0.45	1.57	ND	ND
		C1	0.003	3.70	0.36	1.36	1.85	ND
		C2	0.04	3.50	0.28	1.12	0.30	0.004
		C3	0.06	3.29	0.30	2.15	0.19	0.05
		C4	0.07	2.26	0.23	1.2	0.12	0.01
S1	C5	0.02	0.38	0.09	0.44	0.007	0.004	

3.1.4.2 Metal bioaccumulation

Excepted for Zn, a significant (r^2) positive linear correlation was observed between ITE concentration in earthworms and total contents in soil, for both earthworm species (Table 7). Logically, the highest ITE concentrations were found in earthworms incubated in S1 (historically polluted soil). These findings are consistent with previous studies (Morgan and Morgan, 1993, 1998). Unlike the other ITE, there was no linear relationship between the internal Zn concentration in earthworms and its total soil content. Indeed Zn is an essential element and its internal level is regulated directly by earthworms (Nannoni et al., 2011). It has been suggested that in earthworms Zn plays essential roles (respiratory control and tissue growth, development and regeneration processes) suggesting that is specifically taken up by earthworms (Wróblewski et al., 1979; Morgan, 1984). In addition, the bioavailable fraction estimated by 0.01 M CaCl₂ extraction (Table 4) showed that Zn should be highly bioavailable to earthworms (in comparison with other metals), even if its soil concentration was low. In this present study, the BAF for Zn was above 1, which indicates that Zn was bioaccumulated by the two earthworm species. The efficiency of Zn accumulation probably relates to a necessity for a stored pool of available Zn in anticipation of future physiological demand (Nannoni et al., 2011). At such high internal exposure levels, earthworms must either suffer from Zn toxicity or have adapted to resist toxicity, resulting in a higher capacity to store this element (Hobbelen et al., 2006). Despite its toxicity, Cd was also highly accumulated by earthworms. This phenomenon could be

explained by its high mobility and availability in soil together with its chemical analogy with Zn (Li and Thornton, 2001; Nannoni et al., 2011). In a smelter contaminated area in northern Kosovo, Nannoni et al. (2011) previously observed that earthworms bioaccumulate both Zn and Cd. Thus, internal concentrations and bioaccumulation factor values both suggest that earthworms could be used as bioindicators of ITE pollution in soils. In addition, less uptake and bioaccumulation of all ITE was observed in *E. hortensis* than in *L. terrestris*. Indeed, Suthar et al. (2008) reported that a species specific metal accumulation pattern depending on the earthworm ecological type could be observed. They suggested that species specific feeding behaviour, earthworm niche structure, the ecological category of inhabiting earthworms and even the horizontal distribution of contaminants in soil layers are major determinants for metal accumulation patterns in soil dwelling earthworms. The well-characterized differences in burrowing patterns between endogeic and anecic worms could influence the patterns of metal bioaccumulation, although other factors may also contribute (Suthar et al., 2008). Nannoni et al. (2011) did not observe any significant differences in terms of metal uptake and bioaccumulation between different species within a same ecological group. Lukkari and Haimi (2005) showed that *Eisenia fetida* (epigeic) appeared to be more tolerant to metals than *A. tuberculata* (endogeic) and seemed to regulate the tissue metal concentrations more strictly. Morgan and Morgan (1999) studied the accumulation of ITE by two

Table 5: The Lead fraction extractible using the 0.01 M CaCl₂ procedure in PM and S1 and at the C4 concentration in S3 and S2

Soil	Metal extractable by CaCl ₂ (% of total metal content)			
	Zn	Cu	Cd	Pb
S1	1.91 ± 0.6	0.5 ± 0.1	1.1 ± 0.5	0.3 ± 0.1
S2	5.2 ± 0.4	1.9 ± 0.2	4.5 ± 0.1	0.5 ± 0.05
S3	4.1 ± 0.2	4.9 ± 0.4	4 ± 0.1	0.3 ± 0.05
PM	3.1 ± 0.8	ND	9.8 ± 0.4	0.01

ecologically contrasting earthworm species and found that Cd, Cu and Pb concentrations were significantly higher in *A. caliginosa* (endogeic) than in *L. rubellus* (epigeic). However, concerning Zn accumulation, a difference between the two earthworm species was only observed at the lowest soil concentrations, suggesting differences in metal behaviour inside the earthworms, mostly related to elimination mechanisms (Morgan and Morgan, 1999). Internal concentrations and bioaccumulation factors were also different depending on the soil characteristics. According to our results, soil properties influence ITE bioavailability in relation to mobility (solid/solution transfer) and consequently the mechanisms of transfer (ingestion or transdermal uptake). van Gestel et al. (2011) reported that Mo uptake by earthworms is affected by soil pH, with the highest uptake levels occurring at a pH=4. Díez-Ortiz et al. (2010) also found that BAF total values for metal uptake in *E. andrei* correlated with the soil organic matter content. In the

present experiment, ITE were generally more bioavailable in S2 which was acidic and enriched in organic matter and uptake of Pb, Cu, Sb and As by earthworms (especially for *L. terrestris*) was also higher when they were incubated in this soil type. As reported by Nannoni et al. (2011), organic matter is the main food source for earthworms and consequently represents an important source of ITE, which are largely bound to this component and later absorbed in the gut. Cecchi et al. (2008) observed a strong association of lead with the soil organic matter from a historically polluted soil impacted by process particles from lead recycling batteries. Thus, S2, enriched in organic matter, was a more important source of toxic ITE than S3 for the two species in the study. In contrast, the same proportion of Cd and Zn, which are more mobile in soils, bioaccumulated regardless of the soil type. These two ITE are more present in soluble and extractable fractions, allowing an easy uptake in sandy soil.

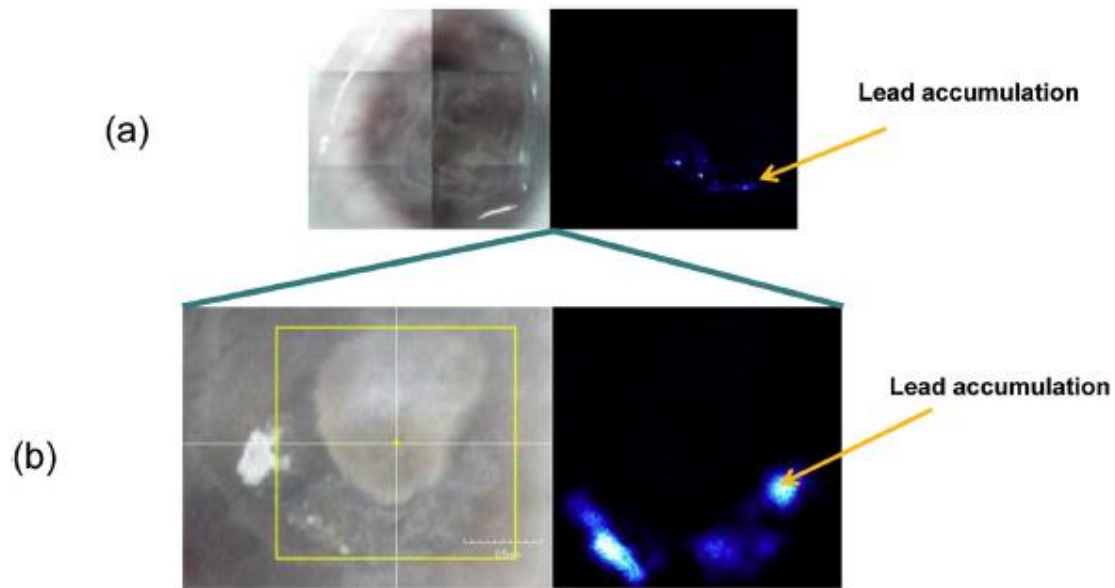


Figure 4: Micro-XRF images of a transversal section ($10\times$ magnification) of the earthworm *L. terrestris* (intestinal region, about 10 segments behind the clitellum) after exposure to S1.

(a) Cross-section of *L. terrestris* (after 14 days of exposure to S1) observed by μ XRF. Lead localization (1 pixel = 14 micron, 512 px, 1000 s/px)

(b) Zoom on the cross section. Lead localization (1 pixel = 12 μ m, 128 px, 1000 s/px) in the gut wall and the longitudinal muscles of earthworm.

3.1.4.3

Uptake mechanisms and ecotoxicity test sensitivity

Even at very low metal concentration in solution (maximum 0.5% of lead was extracted by CaCl_2 for more acidic soil S2), the absorption of lead by earthworms was observed. Our hypothesis is therefore a strong absorption of metals from solid particles throughout the gut and only a small absorption achieved throughout teguments. Depending on ITE type, the mechanism by which earthworms are exposed can vary: direct soil ingestion versus transfer through the teguments (Vijver et al., 2003). The study of lead

localization in earthworm tissues by μ XRF have bring precious information about lead distribution in exposed earthworms and could bring hypothesis on the uptake way of Pb. Actually, as showed by the Fig. 4, Pb remains localized in the gut wall and the longitudinal muscles of exposed earthworms. These kind of observations were recently reported by Kılıç (2011) working with autometallography in the same earthworm species: their observations revealed that heavy metals were found to be accumulated mainly in circular and longitudinal muscles of gut. By the way, ITE absorption by earthworms often depends on the proportions of reducible and oxidable fractions in the soil, suggesting also that the intestine is likely the most important uptake route (Nannoni et al., 2011).

Table 6: Review of ITE impact on earthworms

References	ITE	Soil total content	Time of exposure	Earthworm species	Soil preparation	Observation
Zheng Rongquan & al. 2008	Pb	0-7500 mg/kg	14 days	<i>Pheretima guillelmi</i>	Soil spiked with lead nitrate solution	<ul style="list-style-type: none"> - LC50 = 4300 mgPb/kg soil - Biomass and locomotion decreased at 2800 mg Pb/kg soil
Nahmani & al., 2007	Cd, Cu, Fe, Pb, Zn, Ag, Al, Ba, Sr.	30-42100 mgPb/kg 120-53400 mgZn/kg 0,5-347 mgCd/kg	7, 14, 21, 28 and 42 days	<i>Eisenia fetida</i>	Historically polluted soils	<ul style="list-style-type: none"> - Effect on earthworm survival, body weight, cocoon production and hatching. - Those effects are influenced by soils parameters (texture, pH, [Ag], [Cd]...)
Lukkari & al., 2005	Cu, Zn	2-246 mgCu/kg 13-453 mgZn/kg	48h-14 days	<i>Aporrectodea tuberculata</i>	Soil spiked with copper and zinc solution and field soils	<ul style="list-style-type: none"> - Artificial soils : (Cu/Zn) LC50 = 134/234 mg/kg soil - Field soils : (Cu/Zn) LC50 = 333/582 mg/kg soil - Avoidance test : 80% at 79/138 (Cu/Zn) mg/kg soil
Wu & al., 2012	Pb, Cd	0,1-10 mgCd/kg 5-500 mgPb/kg	7 days	<i>Eisenia fetida</i>	Soil spiked with lead and cadmium solution	<ul style="list-style-type: none"> - Cd+Pb : inhibit cellulase activity - For low [Cd], addition of Pb= ↗ DNA damages - For high [Cd], addition of Pb= ↘ DNA damages
Li & al., 2009	Cd, Zn	0,1 µM- 10 µM Cd 0-1000 µn	2 days	<i>Eisenia fetida</i>	Cattle manure spiked with simulated soil solution	<ul style="list-style-type: none"> - LC 50 = 145 µM Zn - LC 50 = 316 µM Zn with pre-exposure of Cd (1 µM) - Cd uptake is regulated by Ca
Jones & al., 2009	Pb	300-2249 mgPb/kg	4-90 days	<i>Eisenia fetida</i>	Soil spiked with lead nitrate solution	<ul style="list-style-type: none"> - LC50=2490 mgPb/kg soil - Effect on reproduction (cocoon count and juvenile count) at 400 mgPb/kg soil
Owojori & al., 2008	Zn	0-750 mgZn/kg	28 days	<i>Eisenia fetida</i>	Soil spiked with ZnCl ₂ and NaCl solution.	<ul style="list-style-type: none"> - Mortality observed at 750 mgZn/kg soil - Cocoon viability decreased at 500 mgZn/kg soil - ↗ toxic effects with salinity

ITE absorption by earthworms often depends on the proportion of reducible and oxidable fractions in the soil, suggesting also that the intestine is likely the most important uptake route (Nannoni et al., 2011). If bioavailable ITE concentrations are high in the solid soil phase and low in the soil solution, the absolute uptake of metals could be higher via the gut exposure route than via the dermal exposure route (Hobbelen et al., 2006) (Fig. 5). It is possible that ITE which bind strongly to organic matter in earthworm food, are taken up in the gut, as was found in this study for S2. However, as previously mentioned, the water soluble fraction plays

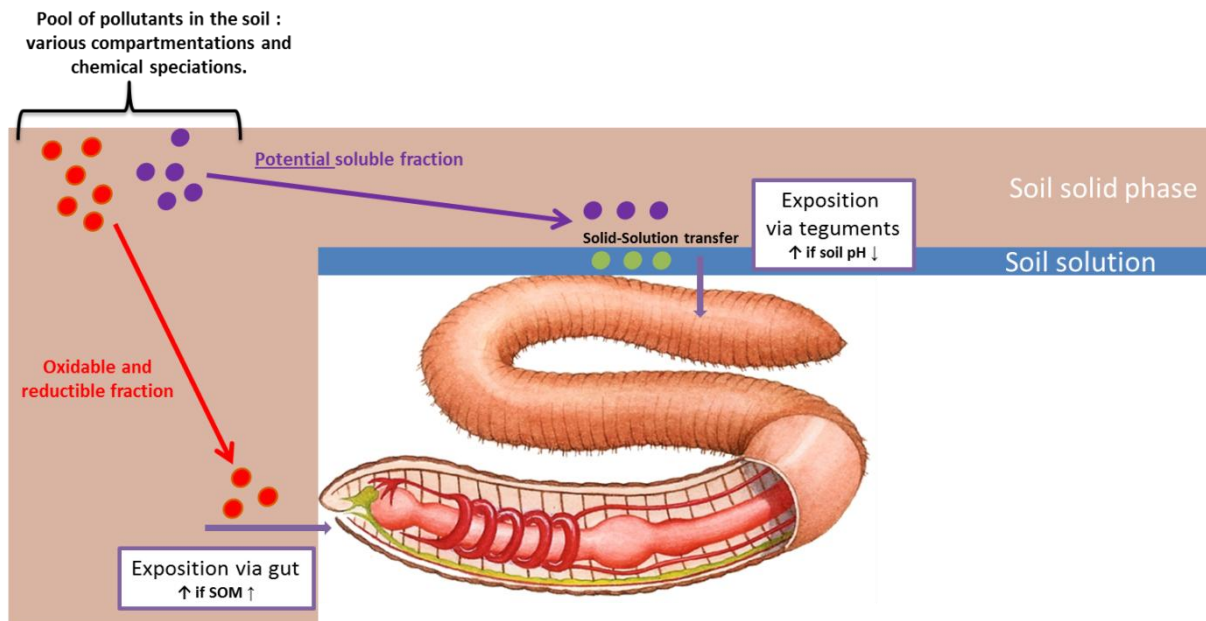
an important role especially for the most mobile elements such as Cd and Zn, suggesting that dermal uptake is considerable, especially in acidic soils such as the experimental S2. To conclude, Coeurdassier et al. (2002) suggested that digestive and cutaneous contamination routes for Cd are responsible for sublethal toxic effects on snail growth in laboratory bioassays. However, cutaneous transfer of Cd was thought to be a secondary intoxication pathway, compared to digestive absorption, in the accumulation and induction of toxic effects in natural conditions.

Table 7: Linear correlation coefficients between the internal heavy metal concentration in earthworms and the total element content in the soil

Soil	Species	Pb R ²	Cd R ²	Cu R ²	Zn R ²	As R ²	Sb R ²
S2	<i>Lumbricus terrestris</i>	0.9987	0.9522	0.9866	0.252	0.9589	0.9996
	<i>Eisenia hortensis</i>	0.8454	0.85	0.939	0.0809	0.975	0.9967
S3	<i>Lumbricus terrestris</i>	0.9986	0.9336	0.9992	0.5137	0.9962	0.9993
	<i>Eisenia hortensis</i>	0.8752	0.7237	0.9827	0.0114	0.9943	0.7371

Finally, antagonistic and synergistic phenomena between ITE can also occur. Wu et al. (2012) recently reported that Cd and Pb have combined and complex toxicological effects on earthworms. Cd bioavailability is often modified by its competitive sorption with Pb in soil fractions. Li et al. (2008) found that the presence of Pb significantly decreased the percentage of Cd in the cytosolic fraction but increased it in the cell membrane fraction of *E. fetida*, which could influence Cd bioaccumulation and toxicity. In the case of acute toxicity due to a cocktail of metals on an estuarine meiobenthic harpacticoid copepod, the mixture had a significantly greater than additive effect on survival, with the mixture being more toxic than that expected by simple additivity of the toxic effects of each metal (Hagopian et al., 2001). In order to assess ITE ecotoxicity, it is necessary to perform several complementary tests with various sensitivity levels. Indeed, the use of internal ITE concentrations in earthworms appears to be an effective and sensitive

indicator of soil contamination, even in the case of pollution due to atmospheric fallout deposition near a lead recycling factory. This extractable fraction could become a good predictor of ITE bioavailability and thus ecotoxicity in soils, taking into account soil properties, ITE type and mobility. Lukkari and Haimi (2005) reported that a battery of tests on earthworms (avoidance, acute toxicity and reproduction tests) can be an efficient tool to assess the ecological risks of contaminated soils. However, careful choice of the species and even populations is largely recommended to gain the most insight into soil contamination and its toxicity for invertebrates.



Leveque et al., 2012

Figure 5: Heavy metal exposure pathways in earthworms related to soil characteristics

3.1.5 Conclusions et perspectives

This study focused on the ecotoxicity of two soils polluted with a cocktail of metals and metalloids on two earthworm species belonging to two different ecological types (*Eiseina hortensis* and *Lumbricus terrestris*). Earthworms were exposed under laboratory conditions but with a realistic source of pollution using soil collected from a lead recycling facility. The combination of behavioural factor measurements (cast production) and earthworm ITE absorption, their bioaccumulation and localization in invertebrate tissues provided a valuable indication of pollutant bioavailability and ecotoxicity. The soil properties

significantly affected the impact of soil ecotoxicity and ITE uptake by earthworms, as well as their bioturbation activities in the soil.

Studies examining uptake pathways and toxicity mechanisms are still in progress on various metals and the effect of ITE on metabolic enzymes or gene expression which could be highly sensitive markers, should be investigated further. The role of earthworms in the fate of ITE in the environment (phytoavailability and human bioaccessibility) associated with their burrowing activities should also be investigated in further studies

Acknowledgments

We gratefully acknowledge INSU-EC2CO program, ADEME, the French Agency of the Environment and Energy as well as the STCM Chemical Metal Treatment Company for their technical help in experimental set-up and for their financial support. The authors also thank Perrine Chaurand and Daniel Borschneck for their technical advices with the mXRF experiment, as well as the ECCOREV federation.

References

- Andre, J., King, R.A., Stürzenbaum, S.R., Kille, P., Hodson, M.E., Morgan, A.J. 2010 a. Molecular genetic differentiation in earthworms inhabiting a heterogeneous Pb-polluted landscape. *Environmental Pollution* 158:883 – 890.
- Andre, J., Stürzenbaum, S.R., Kille, P., Morgan, A.J., Hodson, M.E. 2010 b. Metal bioaccumulation and cellular fractionation in an epigeic earthworm (*Lumbricus rubellus*): the interactive influences of population exposure histories, site-specific geochemistry and mitochondrial genotype. *Soil Biology and Biochemistry* 42:1566 - 1573.
- Bradham, K.D., Dayton, E.A., Basta, N.T., Schroder, J., Payton, M. and Lanno, R.P. 2006. Effect of soil properties on lead bioavailability and toxicity to earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(3): 769–775.
- Capowiez, Y., Dittbrenner, N., Rault, M., Triebkorn, R., Hedde, M. and Mazzia, C. 2010. Earthworm cast production as a new behavioural biomarker for toxicity testing. *Environmental Pollution* 158(2): 388–393.
- Cecchi, M., Dumat, C., Alric, A., Felix-Faure, B., Pradere, P. and Guiresse, M. 2008. Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma* 144(1–2): 287–298.
- Cœurdassier, M., Vaufleury, A.G., Lovy, C. and Badot P.M. 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53(3): 425–431.
- Davies, N.A., Hodson, M.E. and Black, S. 2003. The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test. *Environmental Pollution* 121(1): 55–61.
- Díez-Ortiz, M., Giska, I., Groot, M., Borgman, E.M. and Van Gestel, C.A.M. 2010. Influence of soil properties on molybdenum uptake and elimination kinetics in the earthworm *Eisenia andrei*. *Chemosphere* 80(9): 1036–1043.
- Dittbrenner, N., Moser, I., Triebkorn, R. and Capowiez Y. 2011. Assessment of short and long-term effects of imidacloprid on the burrowing behaviour of two earthworm species by using 2D and 3D post-exposure techniques. *Chemosphere* 84(10): 1349-55.

- Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S. and Benedetti, M.F. 2006. Study of the trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soils. *Environmental Pollution* 142(3): 521–529.
- Ernst, G., Zimmermann, S., Christie, P. and Frey B. 2008. Mercury, cadmium and lead concentrations in different ecophysiological groups of earthworms in forest soils. *Environmental Pollution* 156(3): 1304–1313.
- Fuller-Espie, S.L. 2010. Vertebrate cytokines interleukin 12 and gamma interferon, but not interleukin 10, enhance phagocytosis in the annelid *Eisenia hortensis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 104(2): 119–124.
- van Gestel, C.A.M., Ortiz, M.D., Borgman, E. and Verweij, R.A. 2011. The bioaccumulation of Molybdenum in the earthworm *Eisenia andrei*: Influence of soil properties and ageing. *Chemosphere* 82(11): 1614–1619.
- Hagopian, T., Chandler, G. and Shaw, T. 2001. Acute toxicity of sediment associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Marine Environmental Research* 51(3): 247–64.
- Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E. and van Gestel, C.A.M. 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental Pollution* 144(2): 639–646.
- Kılıç, G.A. 2011. Histopathological and biochemical alterations of the earthworm (*Lumbricus Terrestris*) as biomarker of soil pollution along Porsuk River Basin (Turkey). *Chemosphere* 83:1175–1180.
- Lapied, E., Nahmani, J.Y., Moudilou, E., Chaurand, P., Labille, J., Rose, J., Exbrayat, J.M., Oughton, D.H., Joner, E.J. 2011. Ecotoxicological effects of an aged TiO₂ nanocomposite measured as apoptosis in the anecic earthworm *Lumbricus terrestris* after exposure through water, food and soil. *Environment International* 37(6):1105-1110.
- Li, L.Z., Zhou, D., Wang P. and Luo, X.S. 2008. Subcellular distribution of Cd and Pb in earthworm *Eisenia fetida* as affected by Ca²⁺ ions and Cd–Pb interaction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71(3): 632–637.
- Lukkari, T. and Haimi, J. 2005. Avoidance of Cu and Zn contaminated soil by 3 ecologically different earthworm species. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 62(1): 35–41.
- Maleri, R.A., Reinecke, A.J. and Reinecke, S.A. 2008. Metal uptake of two ecophysiologicaly different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) exposed to ultramafic soils. *Applied Soil Ecology* 38(1): 42–50.
- Menzies, N.W., Donn, M.J. and Kopittke, P.M. 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution* 145(1): 121–130.
- Morgan, J.E. and Morgan, A.J. 1993. Seasonal changes in the tissue-metal (Cd, Zn and Pb) concentrations in two ecophysiologicaly dissimilar earthworm species: pollution-monitoring implications. *Environmental Pollution* 82(1): 1–7.

- Morgan, J.E. and Morgan, A.J. 1998. The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from an unpolluted and a metal-contaminated site. *Environmental Pollution* 99(2): 167–175.
- Morgan, J.E. and Morgan, A.J. 1999. The accumulation of metals (Cd, Cu, Pb, Zn and Ca) by two ecologically contrasting earthworm species (*Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa*): implications for ecotoxicological testing. *Applied Soil Ecology* 13(1): 9–20.
- Nahmani, J., Hodson, M.E. and Black, S. 2007a. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution* 149(1): 44–58.
- Nahmani, J., Hodson, M.E. and Black, S. 2007b. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution* 145(2): 402–424.
- Nannoni, F., Protano G. and Riccobono, F. 2011. Uptake and bioaccumulation of heavy elements by two earthworm species from a smelter contaminated area in northern Kosovo. *Soil Biology and Biochemistry* 43(12): 2359–2367.
- Owojori, O.J., Reinecke, A.J. and Rozanov, A.B. 2008. Effects of salinity on partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 40(9): 2385–2393.
- Owojori, O.J., Reinecke, A.J., Rozanov, A.B. 2009. Role of clay content in partitioning, uptake and toxicity of zinc in the earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(1), 99-107.
- Pauget, B., Gimbert, F., Coeurdassier, M., Scheifler, R. and de Vaufleury, A. 2011. Use of chemical methods to assess Cd and Pb bioavailability to the snail *Cantareus aspersus*: A first attempt taking into account soil characteristics. *Journal of Hazardous Materials* 192(3): 1804–1811.
- Reddy, N.C., Rao J.V. 2008. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (Savigny) to an organophosphorous pesticide Profenofos. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71:574–582.
- Reinecke, A.J., Reinecke, S.A. and Maboeta, M.S. 2001. Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species. *Pedobiologia* 45(1): 61–68.
- Ruiz, E., Alonso-Azcárate, J. and Rodríguez, L. 2011. *Lumbricus terrestris* L. activity increases the availability of metals and their accumulation in maize and barley. *Environmental Pollution* 159(3): 722–728.
- Schreck, E., Foucault, Y., Geret, F., Pradere, P. and Dumat, C. 2011. Influence of soil ageing on bioavailability and ecotoxicity of lead carried by process waste metallic ultrafine particles. *Chemosphere* 85(10): 1555–1562.
- Schreck, E., Foucault, Y., Sarret, G., Sobanska, S., Cécillon, L., M., Uzu, G. and Dumat C. 2012. Metal and metalloid foliar uptake by plant species exposed to atmospheric industrial fallout. *Science of The Total Environment* 427–428(0): 253–262.

- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L. and Treilhou, M. 2008. Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere* 71(10): 1832–1839.
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L. and Treilhou, M. 2009. ChE, GST and CAT: Evaluation of the efficiency of a combined buffer for protein extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(5): 1609–1613.
- Sizmur, T. and Hodson, M.E. 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? A review. *Environmental Pollution* 157(7): 1981–1989.
- Suthar, S., Singh, S. and Dhawan, S. 2008. Earthworms as bioindicator of metals (Zn, Fe, Mn, Cu, Pb and Cd) in soils: Is metal bioaccumulation affected by their ecological category? *Ecological Engineering* 32(2): 99–107.
- Tomlin, A.D. 1992. Behaviour as a source of earthworm susceptibility to ecotoxicants. In : Greig-Smith PW, Becker H, Edwards PJ, Heimbach F (eds.) *Ecotoxicology of Earthworms*, Intercept, Andover pp 116-125
- Uzu, G., Sobanska, S., Aliouane, Y., Pradere, P. and Dumat, C. 2009. Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. *Environmental Pollution* 157(4): 1178–1185.
- Vandecasteele, B., Samyn, J., Quataert, P., Muys, B. and Tack, F.M.G. 2004. Earthworm biomass as additional information for risk assessment of heavy metal biomagnification: a case study for dredged sediment-derived soils and polluted floodplain soils. *Environmental Pollution* 129(3): 363–375.
- Vijver, M.G., Vink, C.J. and van Gestel C.A. 2003. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* 35(1): 125–132.
- Wu, B., Liu, Z. Xu, Y. Li D., and Li. M.2012. Combined toxicity of cadmium and lead on the earthworm *Eisenia fetida* (Annelida, Oligochaeta). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 81(0): 122–126.

3.2. Effects of an metal(loid)s historic pollution on earthworms communities

Avant-propos

Après avoir étudié l'impact écotoxicologique des ETM sur les vers de terre en conditions contrôlées (microcosmes au laboratoire), il est nécessaire d'investiguer leurs effets en conditions réelles sur site contaminé. Au laboratoire, les effets mesurés sont à courts-termes (14 jours) et dans un espace confiné (pas de comportement d'échappement possible). Ces résultats sont donc à confirmer sur site pour des raisons de pertinence écologique.

Il existe en effet seulement quelques études concernant l'impact des ETM sur les vers de terre sur site contaminé (Spurgeon & Hopkin, 1996 ; Lukkari et al., 2004 ; Van Gestel et al., 2008). Pourtant, les vers de terre représentent une part importante de la biomasse du sol et sont de très bons indicateurs de la santé et la qualité du sol. En analysant les communautés de vers de terre présentes sur un site contaminé, il est possible d'évaluer la qualité des sols. C'est précisément l'objectif de l'étude suivante. Sur une parcelle en jachère attenante à l'entreprise de recyclage de batteries au plomb sur le site de Bazoches les Gallerandes, la distribution des vers de terre a été analysée. L'abondance, la diversité des espèces et la reproduction des vers de terre ont été observées le long d'un gradient de concentration marqué.

L'étude sur site contaminé permet d'évaluer l'effet délétère des ETM dans sa globalité. En effet, les vers de terre ont des rôles écologiques et physico-chimiques très importants dans les sols. Ils participent à la distribution et au recyclage de la matière organique, ils interagissent avec les micro-organismes du sol, ils améliorent la macroporosité du sol etc... Si les communautés de vers de terre sont impactées par la pollution en ETM, le sol ne profitera plus des services écosystémiques rendus par les vers de terre.

► Le travail réalisé a été valorisé sous forme d'une publication soumise dans la revue *Science of the Total Environment*. Leveque et al. 2014. "Effects of an metal(loid)s historic pollution on earthworms communities". Cette publication présentée ci-dessous est actuellement en révision.

Thibaut Lévêque^{1,2,3}, Yvan Capowiez⁴, Eva Schreck⁵, Stéphane Mombo^{1,2}, Christophe Mazzia⁶, Yann Foucault^{1,2,7}, Camille Dumat^{1,2*}

¹Université de Toulouse, INP-ENSAT, Av. Agrobiopôle, 31326 Castanet-Tolosan, France.

²UMR 5245 CNRS-INP-UPS, EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle), Avenue de l'Agrobiopôle, BP 32607, 31326 Castanet-Tolosan, France.

³ADEME (French Agency for Environment and Energy Management), 20 avenue du Grésillé, BP 90406, 49004 Angers Cedex 01, France.

⁴INRA, UR 1115, Plantes et Systèmes Horticoles, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 09.

⁵Géosciences Environnement Toulouse (GET), Observatoire Midi Pyrénées, Université de Toulouse, CNRS, IRD, 14 avenue E. Belin, F-31400 Toulouse, France.

⁶IMBE, UMR CNRS 7263 – IRD 237, France.

⁷STCM, Société de Traitements Chimiques des Métaux, 30 Avenue Fondeyre, 31200 Toulouse, France.

Key words: lead, metal(loid)s bioavailability, *Aporrectodea longa*, soil pollution, soil physico-chemical properties.

Abstract

The effects of metal(loid)s (Pb, Cd, Cu, Zn, As and Sb) from atmospheric fallout on earthworm communities were investigated in a fallow meadow located close to a 60-year-old lead recycling factory. We examined abundance and species diversity as well as the ratio of adult-to-juvenile earthworms, along five 140 m parallel transects. The influence of soil pollution on the earthworm community at the plot scale was put in context by measuring some physico-chemical soil characteristics, as well as total and bioavailable metal(loid) concentrations. Earthworms were absent in the highly polluted area (concentration from 30,000 to 5000 mg Pb. kg⁻¹ of dried soil), just near the factory (0-30 m area). A clear and almost linear relationship was observed between the proportion of juvenile earthworms and the pollution gradient, with a greater proportion of adults in the most polluted zones (only adult earthworms were observed from 30 to 50 m). *A. longa* was the main species present just near the smelter (80% of the earthworms were *A. longa* from 30 to 50 m). The earthworm density was then found to increase progressively from five individuals.m⁻² at 30 m to 135 individuals.m⁻² at 140 m from the factory. On average metal(loid) accumulation in earthworm tissues decreased linearly with the distance from the factory. The fraction of exchangeable metal(loid)s in earthworm surface casts was higher compared with the overall soil illustrating the important role of anecic earthworms in metal(loid) bioavailability. Finally, our field study clearly demonstrated that metal(loid) pollution has a direct impact on earthworm communities.

3.2.1 Introduction

Over several decades the activities of industrial sites around the world polluted their surrounding ecosystems (Křibek et al., 2014; Schreck et al., 2011). Activities related to metal(loid) processing have a strong impact on ecosystems (Doshi et al., 2008; Shahid et al., 2014) and human health (Pascaud et al., 2014; Uzu et al., 2011; Xiong et al., 2014) due to the particles gradually emitted into the atmosphere and deposited in the environment which eventually lead to ecosystem pollution. Sectors of the metal industry release fine lead (Pb)-enriched particles into the atmosphere (Schreck et al., 2012). As reported by Cecchi et al. (2008), the different stages of the metal(loid) recycling process (crushing, fusion, reduction and refining) in these facilities generate undesirable by-products enriched with metal(loid)s. These elements have been, for the most part, classified as Substances of Very High Concern (SVHC) in the European REACH law (Regulation EC 1907/2006 of the European Parliament and of the Council of 18 December 2006). European regulations have thus imposed management measures for these industrial sites to determine and reduce the potential impacts on the environment and human health (Foucault et al., 2013).

Earthworms are important organisms in terms of soil functionality Nahmani et al. (2007a), (Brown et al., 2000) and consequently play a key role in terrestrial ecotoxicological risk assessments (Hankard et al., 2004). However, very few field studies examined the impact of pollution on earthworms in industrial sites. In general short-term microcosm experiments in controlled

conditions were performed with artificially spiked soils (Nahmani et al., 2007a) and a single metal element. However in reality field pollution often concerns a cocktail of pollutants (Dumat et al., 2006; Pascaud et al., 2014). The main studies on the effects of metal(loid)s on earthworms measured mortality, weight loss and fertility (Nahmani et al., 2007b) or were focused on ecotoxicity tests (Leveque et al., 2013). Furthermore, as previously reported (Leveque et al., 2014), it is now well-known that metal(loid) transfer in soils strongly depends on pollutant compartmentalization and speciation that are directly related to soil edaphic properties such as soil organic matter (SOM) and pH (Shahid et al., 2013). According to Chenot et al. (2013) and Dumat et al. (2013), various environmental and human factors can strongly modify soil pH, texture and SOM content and type. Earthworms preferentially ingest SOM (Lee, 1985) and are thus responsible for indirect and feedback effects between metals, soil living organisms and SOM (Quenea et al., 2009). As a consequence, earthworms can also modify metal mobility (Sizmur and Hodson, 2009) and bioavailability (Capowiez et al., 2011; Wen et al., 2006).

In this context, we carried out a field study at an industrial site established in the 1960s consisting of the surrounding parcel of a secondary lead smelter that recycles car batteries. Our aim was to investigate the consequences of soil pollution on the earthworm communities at the field scale. Thus, earthworm communities (abundance, young/adult, and species diversity) were studied under field

conditions along with some soil physico-chemical properties to better understand the mechanisms involved in the context of a soil historically polluted with a cocktail of metal(loid)s (mainly Pb and secondary Cd, Cu, Zn, As and Sb). Soil physico-chemical characteristics (pH, total N and organic matter contents) as well as the total and exchangeable metal(loid) quantities in the soil were determined. Additionally, metal(loid) concentrations in earthworm tissues and surface casts were measured at the plot scale.

3.2.2 Materials and Methods

3.2.2.1 Description of the study site and sampling strategy

The study site is located in Bazoches-les-Gallérandes in the Loiret department (45, France), 45 km from Orleans and 80 km south of Paris. The study was carried out in a fallow grassland, on a calcic cambisol (FAO, 1998), adjoining a lead recycling factory: the Chemical Treatment Company (Société de Traitements Chimiques des Métaux, STCM) which has been in operation since 1967. This plant currently recycles lead batteries and the recycling process is carried out in several stages (crushing, fusion, reduction and refining), each generating, in addition to Pb, undesirable by-products such as Cu, Zn, As and Sb. Thus, soils close to this kind of plant can contain multi-metallic contamination due to atmospheric fallout (Schreck et al., 2011; Shahid et al., 2014). At the field scale, the vegetation is widely developed, even in the strongly polluted area. *Silene*

vulgaris, a metal tolerant pseudometallophyte species, was the most largely observed species. Many authors highlighted that the metallophyte grassland is evidence of adaptation to an ecosystem disrupted due to anthropogenic activities (Austruy et al., 2013).

Five linear transects along the field site were defined as shown in Figure 1, all beginning close to the factory walls (distance = 0 m) and ending in the nearest cultivated plot (distance = 140 m) (Figure 1). These transects followed the direction of the prevailing wind (Figure 1). Each transect consisted in 12 sampling points at 0, 10, 20, 30, 40, 50, 70, 80, 95, 110, 130 and 140 m from the factory wall.

3.2.2.2 Soil characteristics

Soil samples were collected from the upper soil horizon at all transects points (topsoil: 0-20 cm) and dried in the open air for a week. The soils were then ground and sieved through a 2 mm stainless steel sieve and a 250 µm nylon sieve. Several soil characteristics were determined, every 10 m, along the meadow. The soil pH was measured in water using a 1/5 (v/v) soil/solution ration according to the standard ISO 10390 procedure. The soil organic carbon and total nitrogen content were determined by heating the samples at 1000°C in the presence of oxygen according to standard procedures ISO 10694 and ISO 13878 respectively. Those soil characteristics were determined at an independent analysis laboratory in France (INRA, Arras).



Figure 1: Map of the study site: lead recycling smelter in Bazoches-les-Gallérandes and the experimental plot. The sampling strategy is drawn by the five transects from 10 to 150 m to the smelter courtyard.

3.2.2.3 Determination of total and exchangeable metal(loid) concentrations in soils and earthworm casts

At each point of each transect, 100 g of soil was sampled and, whenever possible, surface casts were collected.

To determine total metal(loid) concentrations, soil samples (0.5 g per sample) were acid mineralized with a mixture of 1 mL HNO₃ 70% and 0.5 mL of

51% fluorhydric acid in Teflon bombs placed on heating plates at 90°C for 2 days. After evaporation, 1 ml 30% H₂O₂ and 1 mL of 70% HNO₃ were added and the Teflon bombs replaced on heating plates at 90°C for 2 days. The samples were then evaporated at 50°C. Ultra-high purity water was used for dilutions. Solutions were stored at 4°C in polyethylene tubes before analysis.

EDTA, which has a high capacity for complexing metals (Zhang et al., 2014) is a promising extraction agent for metal-contaminated sites. As reported in previous studies, in aged contaminated sites where heavy metals are primarily bound to oxides or organic matter, EDTA-promoted

dissolution can play a substantial role in metal removal (Yip et al., 2009). To assess the exchangeable fraction and the role of earthworms in metal(loid) fate, soil and earthworm cast samples collected in the plot were extracted with EDTA. 1 g of soil sample was mixed with 10 ml of 0.05 M EDTA in a centrifuge tube. The tubes were agitated for 2h using an end-over-end shaker at 5 rpm at 20°C. After extraction, samples were centrifuged at 10,000 g for 30 min. The supernatant was then filtered at 0.22 µm, acidified to 2% with distilled HNO₃ (15 M, suprapur 99.9 %), and then stored at 4 °C before analysis.

After acidic mineralization or chemical extraction, metal(loid) concentrations (total and exchangeable fractions) were then measured by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry ICP-OES (IRIS Intrepid II XXDL) or inductively coupled plasma-mass spectrometry ICP-MS (X Series II, Thermo Electron). Ten control blank samples were submitted to the same treatment (mineralization and assay) for method control. Controls were performed to verify that samples were not contaminated during acidic digestion. Each sample was analyzed in triplicate. The detection limits for Pb, Cd, Cu, Zn, As and Sb were 0.3, 0.2, 1.3, 2.2, 0.2 and 0.2 µg L⁻¹ respectively, whereas, the limits of quantification were approximately 0.4, 0.3, 2, 3, 0.3, and 0.4 µg L⁻¹ respectively for the same inorganic elements. The accuracy of the acid digestion or chemical extraction and the analytical procedures was verified/examined using reference materials: the standard reference soils Montana Highly Elevated Trace Element Concentration 2710 and 2711 which were obtained from the American National

Institute for Standards and Technology (NIST). The concentrations found in reference samples were within 96–101% of the certified values. Three soil samples were analyzed for sampling point and ICP-OES or MS measures were also done in triplicate.

3.2.2.4 Determination of earthworm abundance and diversity

Earthworms were sampled at two dates (April of 2012 and March of 2013). For each sampling point of the linear transects, earthworms were hand-sorted from a 0.16 m² area to a depth of 0.30 m. Earthworms were stored in 70°C alcohol for further identification. They were identified to the species level under laboratory conditions using Bouché's (1972) key. The number of adult earthworms (presence of a clitellum) was recorded for each species. Due to the relatively low number of species found, it was possible to identify both adults and juveniles. Very small earthworms (less than 0.1 g) were discarded from the analysis.

3.2.2.5 Metal(loid) accumulation in earthworms

The total metal(loid) concentration in adult or sub-adult earthworm bodies was determined according to the protocol previously described by Leveque et al. (2013). After five days of depuration, invertebrates were digested with a mixture of 1 ml 70% HNO₃ and 0.5 ml of 51% fluorhydric acid in Teflon bombs placed

on heating plates at 90 °C for 2 days. After evaporation, 1 ml 30% H₂O₂ and 1 ml of 70% HNO₃ were added and the Teflon bombs replaced on heating plates at 90 °C for 2 days, as previously described for soil samples. The samples were then evaporated at 50 °C. Ultra-high purity water was used for dilutions. Solutions were stored at 4 °C in polyethylene tubes before analysis. Metal concentrations were measured by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry ICP-OES (IRIS Intrepid II XXDL) or inductively coupled plasma-mass spectrometry ICP-MS (X Series II, Thermo Electron). Measurement accuracy was verified using reference material. Lobster tissue (TORT-2) was used as a reference material for earthworm mineralization. The concentrations found were within 95–102% of the certified values for all measured elements.

3.2.2.6 Statistical analysis

Following analysis of variance (ANOVA) using the R® 2.14.1 package software, Tukey's test was used to test the difference in earthworm abundance, relative to the gradient of metal(loid) concentrations. The proportion of adults and of *A. longa* in the earthworm communities along the pollution gradient was analyzed using linear regressions. Homogeneity of variance was tested using Levene's test. If the dependent variables were not homogeneous even after logarithmic transformation, non-parametric Kruskal–Wallis and Mann–Whitney tests were used instead of ANOVA. Results were expressed as means ± SD (standard error). Statistical differences were accepted when the probability of the result assuming the null hypothesis (p) was less than 0.05.

3.2.3 Results

3.2.3.1 Chemical analysis of soil samples

The highest metal(loid) concentrations (29600 mg Pb.kg⁻¹, 314 mg Cd.kg⁻¹, 160 mg Cu.kg⁻¹, 527 mg Zn.kg⁻¹, 114 mg As.kg⁻¹ and 959 mg Sb.kg⁻¹) in soils were found at the sampling points closest to the factory (distance of 10 m), while the lowest concentrations (480 mg Pb.kg⁻¹, 1.8 mg Cd.kg⁻¹, 14.8 mg Cu.kg⁻¹, 51 mg Zn.kg⁻¹, 12.5 mg As.kg⁻¹ and 11.5 mg Sb.kg⁻¹) were found furthest from the factory (140 m). For each metal(loid), the relationship between log soil concentration and the distance from the factory approximates to a straight line (Figure 2), indicating an exponential decline in metal(loid) concentration with distance from the factory.

Soil pH, organic C and total N measured in soils are shown in Table 1. The pH of topsoils ranged from 7.9 to 8.3 and no relationship was found between the soil pH and the distance from the factory. On the other hand, analysis of the relationship between organic C and N soil content with the distance from the factory by linear regression, indicated a negative correlation ($R^2=0.81$ and $R^2=0.65$, $p<0.01$). In addition, a positive correlation was found between these two parameters and total Pb soil content with a logarithmic regression ($R^2=0.87$ for organic C and $R^2=0.64$ for total soil content, $p<0.01$).

The exchangeable (EDTA extracted) metal(loid) fractions were always higher in earthworm surface casts than in the corresponding bulk soil (Table 2).

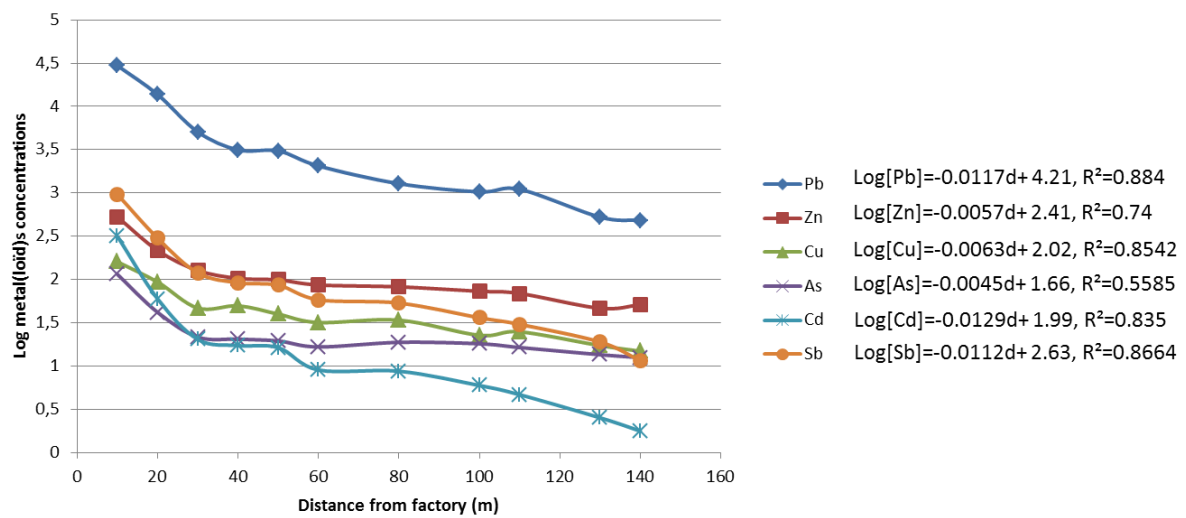


Figure 2: Scatter diagram of the relationship between the log concentration of lead, zinc, copper, cadmium, arsenic and antimony in soils and the distance from the STCM. Soil metals levels were log transformed to normalize the data.

Table 1: Mean values and standard deviations (n=5) of soil characteristics depending on the distance from the factory.

Distance from the factory (m)	C organique (g kg ⁻¹)	N total (g kg ⁻¹)	C/N	pH
10	37.9 ± 8.0	2.9 ± 0.4	12.80	7.9
20	29.5 ± 10.8	2.4 ± 0.8	12.08	8.2
30	24.0 ± 6.3	1.8 ± 0.1	12.08	8.3
40	25.0 ± 12.8	2.5 ± 0.8	12.28	8.2
50	25.4 ± 3.9	2.1 ± 0.3	12.28	8.3
60	22.5 ± 3.3	1.9 ± 0.3	11.58	8.2
80	21.3 ± 4.5	1.8 ± 0.3	11.65	8.3
100	22.0 ± 3.4	1.8 ± 0.2	11.96	8.2
110	22.5 ± 3.3	1.9 ± 0.2	11.96	8.2
130	16.3 ± 1.0	1.4 ± 0.0	11.63	8.3
140	15.2 ± 0.8	1.3 ± 0.0	11.34	8.3

3.2.3.2 Earthworms communities along the contamination gradient

No earthworm species were found in any of the samples between 0 and 20 m from the factory. The first earthworms were found 30 m from the factory wall where the soil Pb concentration was approximately 5060 mg.kg⁻¹. Then there was a gradual increase in earthworm abundance with distance from the factory (Figure 3), with a maximum of about 240 individuals m⁻² at 140 m from the factory, where the Pb concentration in soil was 480 mg.kg⁻¹. An exponential relationship was observed between earthworm abundance and the distance from the factory. Analysis of the relationship between the cube root of total earthworm number and log Pb concentration by linear regression indicated a negative correlation ($R^2=0.69$, $p<0.01$).

However, the effect of metal pollution was not the same for all earthworm species. Indeed, only anecic earthworms were found between 30 and 60 m from the factory (Figure 4). In particular, the main species present in this area was *Aporrectodea longa*. From 30 to 50 m of the factory, 80% of the collected worms were *A. longa* (Figure 5). Then, a gradual and linear decrease ($R^2=0.97$, $p<0.01$) in the percentage of *A. longa* was

observed with the distance from the factory. Strikingly this species was almost absent at 140 m. Endogeic species were collected from 60 m from the factory but in very small quantities: a strong increase in their abundance was observed from 110 meters of the factory (where soil concentration is < 1000 mg Pb.kg⁻¹).

Only adult earthworms were found 30 to 50 m from the factory. Juvenile earthworms were first observed at a distance of 60 m from the factory courtyard (corresponding to soil contamination about 2050 mg.kg⁻¹). A gradual and linear increase ($R^2=0.92$, $p<0.01$) in the percentage of juveniles was observed with a maximum of 90% at 130 m from the factory (Figure 6).

3.2.3.3 Metal(loïd) concentration in *A. longa* earthworms

Metal(loïd) concentrations were measured in *A. longa* worms, the only species present all along the transects. The results are shown in Table 3. A clear correlation was found by linear regression between Pb, Cd, Sb and As concentrations in soils and their concentrations in earthworms bodies ($R^2=0.97$, $R^2=0.84$, $R^2=0.9$, $R^2=0.68$ respectively, $p<0.01$). However, there was no clear relationship between Zn and Cu concentrations in soil and their concentration in earthworm bodies ($R^2=0.01$, $R^2=0.19$ respectively).

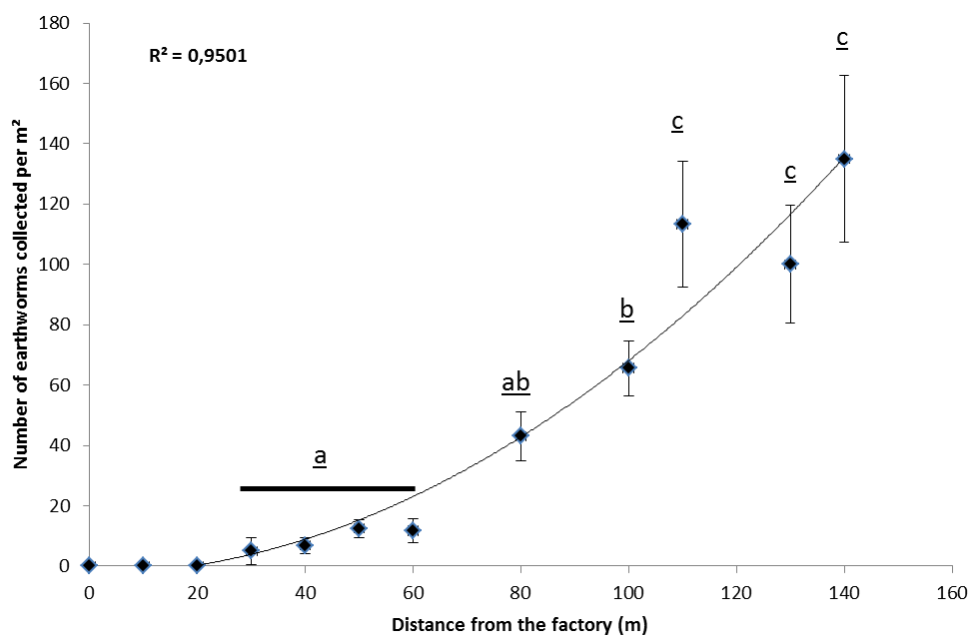


Figure 3: Graphic of the relationship between the numbers of earthworms collected per m² and the distance from the STCM. (errors bars indicate the SE of total number from each replicate). Values sharing the same letter are not significantly different ($p < 0.05$ Tukey's HSD test)

Table 2: Pb concentrations (ppm) extractable by EDTA in soils and surface casts depending on the distance from the factory (m)

Distance from the factory (m)	[Pb] extractable in soils (mg.kg ⁻¹)	[Pb] extractable in casts (mg.kg ⁻¹)
0	24907.4 ± 56.7	
10	15084.8 ± 97.1	
20	9509.2 ± 32.9	
40	3374.3 ± 16.0	4876.9 ± 23.5
50	3591.9 ± 21.4	3968.6 ± 19.6
60	2221.6 ± 15.8	3295.1 ± 15.2
80	1848.1 ± 17.6	2823.1 ± 16.8
95	1522.3 ± 14.7	1941.1 ± 17.2
110	1227.6 ± 9.9	1558.1 ± 15.2
140	496.3 ± 10.5	651.6 ± 7.4

3.2.4 Discussion

3.2.4.1 Earthworm abundance

Earthworm abundance was examined mainly in relation to the gradient of Pb contamination along the linear transects starting at the factory courtyard. Cecchi et al. (2008) showed previously that high Pb concentrations in the topsoils of this area are directly linked to smelter activities. The background level of Pb is reached at 60 cm of depth (around 40 mg kg⁻¹). In this study at the plot scale, a linear relationship between Pb concentration and the other metal(loid) concentrations in the soil was observed (Cd: R²=0.89, Zn: R²= 0.96, Cu : R²= 0.94, As : R²=0.98 and Sb : R²=0.99, n=15, p<0.01) confirming that all the metal(loid)s in the topsoils at the site are directly linked to battery recycling activities from the secondary lead smelter and thus contribute to the impacts of this contamination.

Earthworm abundance clearly increased with the distance from the smelter: from five individuals per m² at 30 m to 135 individuals per m² at 140 m. These dramatic changes in earthworm density are assumed to be direct and indirect effects of the metal(loid) pollution in the soil (direct toxicity, nutrients and organic matters availability, pH conditions....) As reported by van Gestel et al. (2009), it is extremely difficult to establish a simple cause and effect relationship in field experiments, especially in the case of a plot scale study with strong pollution impacts. Abiotic factors such as climatic conditions (temperatures, drought, humidity, etc.)

may have an impact on earthworm communities at a larger scale and thus mask toxicity effects on population ecology. However, this present study was carried out at a relatively small scale (linear transects of 140 m). Thus, abiotic conditions (soil and climate) should have been almost exactly the same. Furthermore, a relationship was observed between earthworm density and the soil Pb concentration (R²=0.69, p<0.01). Metals were reported to have similar effects on earthworm abundance at a larger scale in the Avonmouth area (England Spurgeon & Hopkin (1996)), and in Finland (Lukkari et al. (2004)). However to our knowledge this is the first report of such a marked effect at such a relatively small scale. This enabled us to partly disentangle the effects of the pollution from those of other possible abiotic parameters and to gain insight into the threshold values of the effects of this multi-contaminant pollution (especially enriched in Pb) on earthworms: no earthworms above 5060 mg Pb.kg⁻¹ and maximum abundance above 500 mg Pb.kg⁻¹.

3.2.4.2 Species diversity in relation to metalloid concentrations

Different species (*Aporrectodea longa*, *Lumbricus terrestris*, *Aporrectodea giardi*, *Aporrectodea caliginosa*, *Allobophora chlorotica*) were collected in the fallow adjoining the factory. But the high metal(loid) concentrations had a stronger effect on some earthworm species than others. Indeed, endogeic species such as *A. caliginosa* and *A. chlorotica* were

completely absent up to 60 m (1665 mg Pb.kg⁻¹ of soil) from the smelter and from 60 to 100 m (1040 mg Pb.kg⁻¹ of soil), their proportion did not exceed 10%. Their proportion only increased from 36.5% to 57.5% more than 110 m from the factory (920 mg Pb.kg⁻¹ of soil). The increased sensitivity of endogeic earthworms to metal pollution observed here, agrees with previous results from Spurgeon and Hopkin (1996). In contrast, at 30 to 100 m from the factory, a high proportion of anecic species (between 90 and 100%), especially *L. terrestris* and *A. longa*, was recorded. *A. longa* was the major species present (between 40 and 80%) at these distances from the smelter where Pb concentrations in the soil ranged from

3500 to 1040 mg.kg⁻¹ suggesting that this species is tolerant or at least less sensitive to metal(loid)s. These results highlight that there can be inter-species variation in sensitivity/tolerance to metal(loid) contamination. Variation in sensitivity/tolerance to a pollutant may be the result of behavioral and ecological differences between species which modify their exposure and responses (*Van Gestel, 1992*), or physiological differences in detoxification and elimination processes (*Dallinger, 2000*). The known differences between anecic and endogeic species suggest that behavioral and life cycle parameters are key to explaining their sensitivity/tolerance to metal(loid)s.

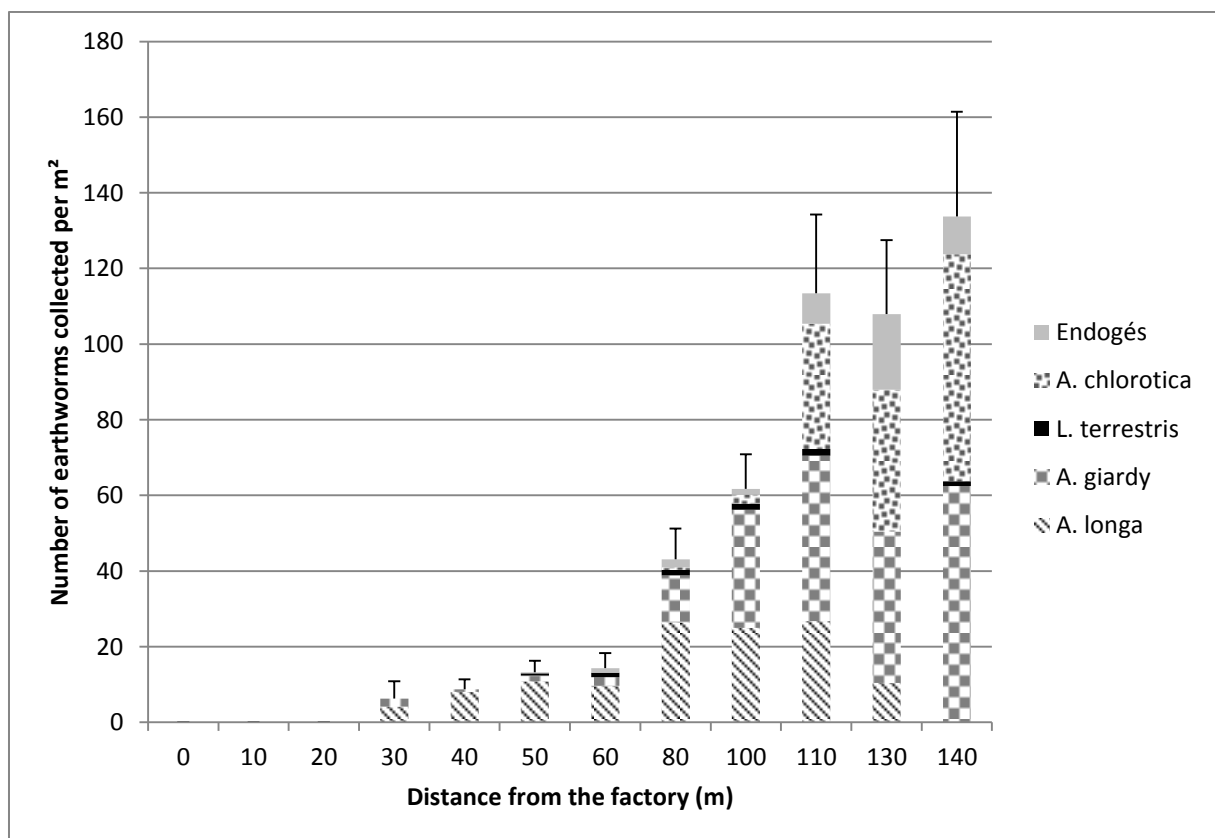


Figure 4: Number of worms collected from five quadrats taken along the grassland next to the STCM (errors bars indicate the SE of total number from each replicate).

Anecic earthworms feed on litter (Haimi et al., 1992) and live deep in the soil in permanent burrow systems (Bastardie et al., 2005; Bohlen and Edwards, 1995). Since Pb is not very mobile and mainly found in topsoil (Covelo et al., 2007), anecic species could be less exposed to pollutants compared to endogeic species which only feed on SOM to which metal(loid)s bond strongly (Leveque et al., 2013, Quenea et al., 2009). Several studies showed that metal(loid)s influence SOM turnover due to decreased microbial soil activity (Dumat et al., 2006). In addition, the study of EDTA-extractable Pb concentrations gives information on metal bioavailability which is strongly linked to organic matter in topsoil. Indeed, as shown by comparing the results of soil EDTA extraction and cast EDTA extraction (provided in Table 2), exchangeable fractions are always higher in casts than in bulk soils. This highlights the role of earthworms in metal(loid) compartmentalization and speciation changes which has consequences on bioavailability, as previously suggested by Jusselme et al. (2013), Kelsey et al. (2011), and Leveque et al. (2013). This observation suggests that anecic earthworms play a role in metal(loid) bioavailability in soils changing abiotic parameters such as metal(loid) solubility or acidic pH conditions.

The high proportion of *A. longa* in the anecic population may be explained by physiological differences: *A. longa* is reported to have higher calcium gland secretion activity than other species (Spurgeon et al., 2004). Calcium is known to be involved in the sequestration and elimination of various metals through the chlorogogenous tissue (Spurgeon et al.,

2004). In this tissue, lead is detoxified by binding to phosphate ligands in chloragocyte granules in direct exchange with calcium (Morgan et al., 1989). Therefore, it is probable that differences in calcium metabolism account for variations in metal sensitivity/tolerance between earthworm species (Spurgeon and Hopkin, 1999). The tolerance of *A. longa* to high concentrations of a complex mixture of metal(loid)s could also be explained by increased detoxification of Cd by cadmium-binding metallothioneins (Morgan et al., 1989; Swain et al., 2004). Finally, a gradual decrease in the proportion of *A. longa* was observed with the increasing abundance of other earthworm species (Figure 4). This result may be explained by strong competition between species for food resources or breeding (Kammenga et al., 2003). Thus overall *A. longa* appear to be more tolerant to metal(loid) toxicity and, as this species was reported to have better colonization abilities in earthworm-free sites compared to *L. terrestris* or *A. caliginosa* (Ligthart and Peek, 1997), *A. longa* could naturally colonized highly impacted areas with lower earthworm density and higher organic matter contents. Indeed, higher SOM contents were observed in the more polluted area certainly as a result of disrupted microbiology activity and consequences on SOM turnover (Quenea et al., 2009). With the exception of Zn and Cu, a significant linear correlation was found between metal(loid) concentrations in *A. longa* and those in the soil. These findings are consistent with previous studies (Leveque et al., 2013 ; Nannoni et al., 2011) and highlight the fact that earthworms are relevant bio-indicators of Pb, Cd, As and Sb pollution in the soil .

Table 3: Mean values and standard errors (n=3) of metal(loid)s concentrations in *A. longa* bodies in relation with the distance from the factory

Distance (m)	Pb (mg.kg ⁻¹)	Cd (mg.kg ⁻¹)	Cu (mg.kg ⁻¹)	Zn (mg.kg ⁻¹)	As (mg.kg ⁻¹)	Sb (mg.kg ⁻¹)
40	2063.6 ± 482.0	221.0 ± 42.2	5.9 ± 1.2	350.1 ± 52.7	28.9 ± 4.2	24.2 ± 3.9
50	2010.2 ± 255.4	241.3 ± 24.2	8.2 ± 0.3	423.7 ± 67.9	25.7 ± 3.3	18.7 ± 2.7
60	1267.4 ± 361.5	172.4 ± 26.1	6.0 ± 1.1	407.9 ± 28.9	15.9 ± 1.8	14.2 ± 4.5
80	871.4 ± 166.9	157.1 ± 30.4	7.7 ± 0.9	362.1 ± 23.7	15.8 ± 2.2	15.2 ± 2.9
100	566.9 ± 114.4	137.9 ± 32.9	8.1 ± 0.6	316.4 ± 25.0	8.8 ± 1.3	11.9 ± 1.3
110	351.2 ± 54.1	58.8 ± 8.7	7.3 ± 1.1	415.7 ± 31.3	7.5 ± 0.9	10.7 ± 1.8

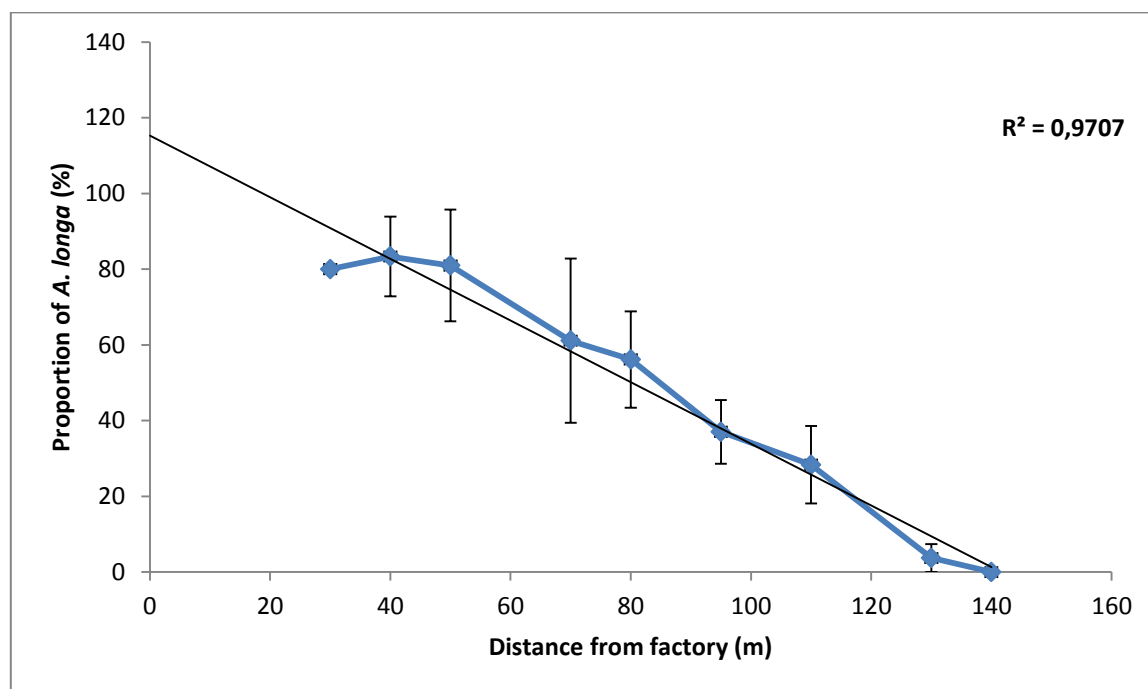


Figure 5: Graphic of the relationship between the percentages of *A. longa* collected from five quadrats and the distance from the STCM (errors bars indicate the SE from each replicate).

Zn and Cu are essential elements and thus they have important biological functions for earthworms (respiratory control and tissue growth, development and

regeneration processes) and their accumulation and elimination processes are different from pollutants like lead (Morgan & Morgan, 1989).

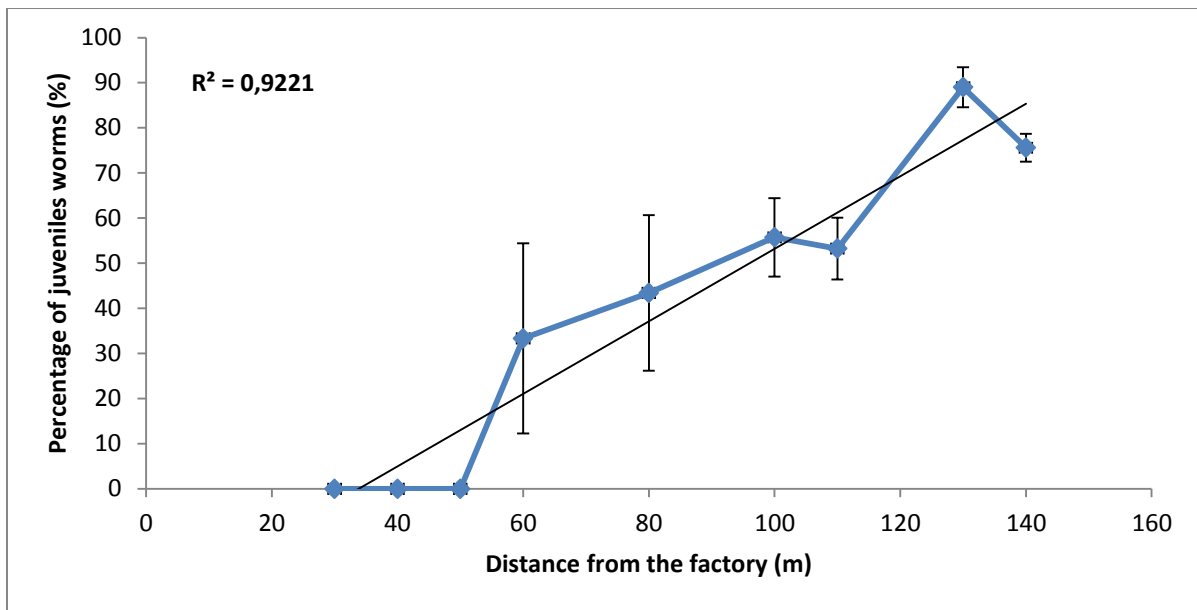


Figure 6: Graphic of the relationship between the percentages of juvenile worms collected from five quadrats and the distance from the ST (errors bars indicate the SE from each replicate).

3.2.4.3 The adult to juvenile ratio

A gradual decrease in the percentage of juveniles was observed with none at 50 m from the factory and a maximum of 90% at 130 m (Figure 6), suggesting that soil pollution has differential impacts on juvenile and adult earthworms. Adult earthworms have been shown to have relatively low sensitivity to metal(loid)s. Figures in the literature for fourteen day LC_{50} values for adult *E. fetida* are: from 4400 to 5940 mg Pb.kg⁻¹ (Davies et al., 2003 ; Neuhaser et al., 1985 ; Spurgeon et al., 1994), 1840 mg Cd.kg⁻¹ (Neuhaser et al., 1985), 1100 mg Zn.kg⁻¹ (Spurgeon et al., 1996). Leveque et al. (2013) reported a mortality of less than 5% for adult earthworms exposed for 14 days to a strongly polluted soil (37900 mg Pb.kg⁻¹) from a lead recycling facility.

Metal(loid) bioavailability and toxicity are lower in aged and field contaminated soils than in freshly amended or spiked soils (Schreck et al., 2011). But, Žaltauskaitė and Sodienė (2014) reported that the exposure time increases earthworm mortality rates particularly for juveniles. They showed that a three-week exposure to 2500 mg Pb.kg⁻¹ involved the death of 46.7% of the juveniles and this number increased to 66.7 percent in the fifth week of exposure. Chronic exposure to earthworms in a contaminated field may have more detrimental consequences than short-term exposure. In addition, mortality rates following metal exposure depend on earthworm age. The LC_{50} for juvenile earthworms is significantly lower compared to that for adults (Žaltauskaitė and Sodienė, 2014). Those results demonstrate that juvenile earthworms are

more sensitive to metal toxicity and are in agreement with the results of Van Gestel et al. (1991) on *E. andrei* and those of Spurgeon et al. (2004) on *L. rubellus*. Spurgeon and Hopkin, (1994) highlighted that mortality mainly occurs in the first five weeks of the exposure, indicating the high sensitivity of juveniles in the first stages of their development (Žaltauskaitė and Sodienė, 2014). Many researchers also reported the impact of metal contamination on earthworm reproduction with a decrease in cocoon production (Nahmani et al., 2007b; Reinecke et al., 2001 ; Spurgeon & Hopkin 1996 ; Žaltauskaitė and Sodienė, 2014). However, despite these studies using controlled experiments and concluding that juvenile earthworms are reduced in the case of pollution, the few available field studies did not mention this phenomenon (Lukkari et al., 2004; Spurgeon et al., 1996; Van gestel et al., 2009). In our present field study, the effect of metals contamination on earthworm age distribution was very clear. Thus, the presence of earthworms in the most contaminated area suggests that earthworm population is maintained primarily by migration of adults rather than recruitment.

3.2.5 Conclusions and perspectives

This field experiment conducted at the plot scale allowed the influence of a cocktail of metal(loid)s, mainly enriched in Pb, on earthworm community to be investigated in relation to soil physico-chemical changes. Firstly, our findings highlight that strong pollution can significantly modify

the terrestrial ecosystem and reduce biodiversity in the earthworm community. However, less sensitive earthworm species may re-colonize and inhabit areas with moderate to low pollution levels. Metal(loid) accumulation in earthworm tissues is directly linked to the total metal(loid) concentrations in soils. Anecic earthworms appear to play a major role in metal(loid) behavior, in relation to SOM interactions. These phenomena need to be further investigated and further studies are in progress in industrial and urban areas. At the global scale, emissions of this type of persistent pollution cocktail affect the majority of urban areas. Enhancing our knowledge of the mechanisms involved can open the way for innovative approaches for improving soil quality and ecosystem services associated with the environment and human health.

Acknowledgements

STCM (Metal Chemical Treatments Society) and Ademe are acknowledged for their financial support and technical help. This work has received support from INSU, national French research project EC₂CO through the Biotuba Project.

References:

- Austruy, A., Wanat, N., Moussard, C., Vernay, P., Joussein, E., Ledoigt, G., Hitmi, A., 2013. Physiological impacts of soil pollution and arsenic uptake in three plant species: *Agrostis capillaris*, *Solanum nigrum* and *Vicia faba*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 90, 28–34. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.12.008
- Bastardie, F., Capowiez, Y., Cluzeau, D., 2005. 3D characterisation of earthworm burrow systems in natural soil cores collected from a 12-year-old pasture. *Appl. Soil Ecol.* 30, 34–46. doi:10.1016/j.apsoil.2005.01.001
- Bohlen, P.J., Edwards, C.A., 1995. Earthworm effects on N dynamics and soil respiration in microcosms receiving organic and inorganic nutrients. *Soil Biol. Biochem.* 27, 341–348. doi:10.1016/0038-0717(94)00184-3
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P., 2000. Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur. J. Soil Biol.* 36, 177–198. doi:10.1016/S1164-5563(00)01062-1
- Capowiez, Y., Sammartino, S., Michel, E., 2011. Using X-ray tomography to quantify earthworm bioturbation non-destructively in repacked soil cores. *Geoderma* 162, 124–131. doi:10.1016/j.geoderma.2011.01.011
- Cecchi, M., Dumat, C., Alric, A., Felix-Faure, B., Pradere, P., Guisresse, M., 2008. Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Antarct. Soils Soil Form. Process. Chang. Environ.* 144, 287–298. doi:10.1016/j.geoderma.2007.11.023
- Chenot, E., Schwartz, C., Dumat, C., Douay, F., 2013. "Vegetable Gardens: unknown lands? EDP Sciences / ADEME. ISBN : 978-2-7598-0723-9. 176 pages
- Covelo, E.F., Vega, F.A., Andrade, M.L., 2007. Heavy metal sorption and desorption capacity of soils containing endogenous contaminants. *J. Hazard. Mater.* 143, 419–430. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.09.047
- Dallinger, R., 2000. Metal tolerance and metabolism in terrestrial invertebrates: molecular and biochemical aspects. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 126, Supplement 1, 36. doi:10.1016/S1095-6433(00)80070-7
- Davies, N.A., Hodson, M.E., Black, S., 2003. The influence of time on lead toxicity and bioaccumulation determined by the OECD earthworm toxicity test. *Environ. Pollut.* 121, 55–61. doi:10.1016/S0269-7491(02)00207-5
- Doshi, R., Braidia, W., Christodoulatos, C., Wazne, M., O'Connor, G., 2008. Nano-aluminum: Transport through sand columns and environmental effects on plants and soil communities. *Spec. Sect. 8th Int. Conf. Prot. Restor. Environ.* 106, 296–303. doi:10.1016/j.envres.2007.04.006
- Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S., Benedetti, M.F., 2006. Study of the trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soils. *Environ. Pollut.* 142, 521–529. doi:10.1016/j.envpol.2005.10.027

- Dumat, C., Larbaigt, J., Leveque, T., Foucault, Y., Xiong, T., Alletto, L., Barbaste, M., Sejalon, N., Gaillard, I., 2013. Environmental and sanitary risk assessment and management in associative gardens: vegetable quality in relation with practices and context. International Conference Environmental Geochemistry and Health, 2013, Toulouse
- Foucault, Y., Durand, M.-J., Tack, K., Schreck, E., Geret, F., Leveque, T., Pradere, P., Goix, S., Dumat, C., 2013. Use of ecotoxicity test and ecoscores to improve the management of polluted soils: case of a secondary lead smelter plant. *J. Hazard. Mater.* 246–247, 291–299. doi:10.1016/j.jhazmat.2012.12.042
- Haimi, J., Huhta, V., Boucelham, M., 1992. Growth increase of birch seedlings under the influence of earthworms—a laboratory study. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1525–1528. doi:10.1016/0038-0717(92)90144-M
- Hankard, P.K., Svendsen, C., Wright, J., Wienberg, C., Fishwick, S.K., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., 2004. Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis. *Sci. Total Environ.* 330, 9–20. doi:10.1016/j.scitotenv.2003.08.023
- Jusselme, M.D., Miambi, E., Mora, P., Diouf, M., Rouland-Lefèvre, C., 2013. Increased lead availability and enzyme activities in root-adhering soil of *Lantana camara* during phytoextraction in the presence of earthworms. *Sci. Total Environ.* 445–446, 101–109. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.12.054
- Kammenga, J.E., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Weeks, J.M., 2003. Explaining density-dependent regulation in earthworm populations using life-history analysis. *Oikos* 100,89–95
- Kelsey, J.W., Slizovskiy, I.B., Petriello, M.C., Butler, K.L., 2011. Influence of plant–earthworm interactions on SOM chemistry and p,p'-DDE bioaccumulation. *Chemosphere* 83, 897–902. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.02.056
- Kříbek, B., Majer, V., Knésl, I., Nyambe, I., Mihaljevic, M., Ettler, V., Sracek, O., 2014. Concentrations of arsenic, copper, cobalt, lead and zinc in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) growing on uncontaminated and contaminated soils of the Zambian Copperbelt). *J. Afr. Earth Sci.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jafrearsci.2014.02.009>
- Lee, K.E., others, 1985. *Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use.* Academic Press Inc
- Leveque, T., Capowiez, Y., Schreck, E., Mazzia, C., Auffan, M., Foucault, Y., Austruy, A., Dumat, C., 2013. Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species (*Eiseina hortensis* and *Lumbricus terrestris*). *Environ. Pollut.* 179, 232–241. doi:10.1016/j.envpol.2013.03.066
- Leveque, T., Capowiez, Y., Schreck, E., Xiong, T., Foucault, Y., Dumat, C., 2014. Earthworm bioturbation influences the phytoavailability of metals released by particles in cultivated soils. *Environ. Pollut.* 191, 199–206. doi:10.1016/j.envpol.2014.04.005

- Ligthart, T.N., Peek, G.J.C.W., 1997. Evolution of earthworm burrow systems after inoculation of lumbricid earthworms in a pasture in the Netherlands. 5th Int. Symp. Earthworm Ecol. 29, 453–462. doi:10.1016/S0038-0717(96)00041-7
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Väisänen, A., Haimi, J., 2004. Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. Ecotoxicol. Environ. Saf. 59, 340–348. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.09.011
- Morgan, A.J., Morgan, J.E., Winters, C., 1989. Subcellular cadmium sequestration by the chloragocytes of earthworms living in highly contaminated soil. Responses Mar. Org. Pollut. 28, 221. doi:10.1016/0141-1136(89)90231-6
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007a. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. Environ. Pollut. 145, 402–424. doi:10.1016/j.envpol.2006.04.009
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007b. Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. Environ. Pollut. 149, 44–58. doi:10.1016/j.envpol.2006.12.018
- Nannoni, F., Protano, G., Riccobono, F., 2011. Uptake and bioaccumulation of heavy elements by two earthworm species from a smelter contaminated area in northern Kosovo. Soil Biol. Biochem. 43, 2359–2367. doi:10.1016/j.soilbio.2011.08.002
- Neuhauser, E.F., Loehr, R.C., Miligan, D.L., Malecki, M.R., 1985. Toxicity of metals to the earthworm *Eisenia fetida*. Biol. Fertil. Soils 1, 149–152
- Pascaud, G., Leveque, T., Soubrand, M., Boussen, S., Joussein, E., Dumat, C., 2014. Environmental and health risk assessment of Pb, Zn, As and Sb in soccer field soils and sediments from mine tailings: solid speciation and bioaccessibility. Environ. Sci. Pollut. Res. 21, 4254–4264. doi:10.1007/s11356-013-2297-2
- Quenea, K., Lamy, I., Winterton, P., Bermond, A., Dumat, C., 2009. Interactions between metals and soil organic matter in various particle size fractions of soil contaminated with waste water. Geoderma 149, 217–223. doi:10.1016/j.geoderma.2008.11.037
- Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., Maboeta, M.S., 2001. Cocoon production and viability as endpoints in toxicity testing of heavy metals with three earthworm species. Pedobiologia 45, 61–68. doi:10.1078/0031-4056-00068
- Schreck, E., Foucault, Y., Geret, F., Pradere, P., Dumat, C., 2011. Influence of soil ageing on bioavailability and ecotoxicity of lead carried by process waste metallic ultrafine particles. Chemosphere 85, 1555–1562. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.07.059
- Schreck, E., Foucault, Y., Sarret, G., Sobanska, S., Cécillon, L., Castrec-Rouelle, M., Uzu, G., Dumat, C., 2012. Metal and metalloid foliar uptake by various plant species exposed to atmospheric industrial fallout: Mechanisms involved for lead. Sci. Total Environ. 427–428, 253–262. doi:10.1016/j.scitotenv.2012.03.051
- Shahid, M., Xiong, T., Castrec-Rouelle, M., Leveque, T., Dumat, C., 2013. Water extraction kinetics of metals, arsenic and dissolved organic carbon from industrial contaminated poplar leaves. J. Env. Sci. Doi 10, 60197–1.

- Sizmur, T., Hodson, M.E., 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? – A review. *Environ. Pollut.* 157, 1981–1989. doi:10.1016/j.envpol.2009.02.029
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., Jones, D.T., 1994. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia fetida* (Savigny): Assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. *Environ. Pollut.* 84, 123–130. doi:10.1016/0269-7491(94)90094-9
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1996. The effects of metal contamination on earthworm populations around a smelting works: quantifying species effects. *Appl. Soil Ecol.* 4, 147–160. doi:10.1016/0929-1393(96)00109-6
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1999. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Appl. Soil Ecol.* 11, 227–243. doi:10.1016/S0929-1393(98)00150-4
- Spurgeon, D., Svendsen, C., Kille, P., Morgan, A., Weeks, J., 2004. Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecol. Physiol. Physiochemical Factors Earthworm Ecotoxicol. Third Int. Workshop Earthworm Ecotoxicol.* 57, 54–64. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.08.003
- Swain, S.C., Keusekotten, K., Baumeister, R., Stürzenbaum, S.R., 2004. *C. elegans* Metallothioneins: New Insights into the Phenotypic Effects of Cadmium Toxicosis. *J. Mol. Biol.* 341, 951–959. doi:10.1016/j.jmb.2004.06.050
- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Sauvain, J.J., Pradère, P., Dumat, C., 2011. Characterization of lead-recycling facility emissions at various workplaces: Major insights for sanitary risks assessment. *J. Hazard. Mater.* 186, 1018–1027. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.086
- van Gestel, C.A.M., van Dis, W.A., Dirven-van Breemen, E.M., Sparenburg, P.M., Baerselman, R., 1991. Influence of cadmium, copper, and pentachlorophenol on growth and sexual development of *Eisenia Andrei* (Oligochaeta; Annelida). *Biol. Fertil. Soils* 12, 117–121
- van Gestel, C.A.M., 1992. Validation of earthworm toxicity tests by comparison with field studies: A review of benomyl, carbendazim, carbofuran, and carbaryl. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 23, 221–236. doi:10.1016/0147-6513(92)90060-G
- van Gestel, C.A.M., Koolhaas, J.E., Hamers, T., van Hoppe, M., van Roover, M., Korsman, C., Reinecke, S.A., 2009. Effects of metal pollution on earthworm communities in a contaminated floodplain area: Linking biomarker, community and functional responses. *Environ. Pollut.* 157, 895–903. doi:10.1016/j.envpol.2008.11.002
- Wen, B., Liu, Y., Hu, X., Shan, X., 2006. Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. *Chemosphere* 63, 1179–1186. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.09.002
- Yip, T.C.M., Tsang, D.C.W., Ng, K.T.W., Lo, I.M.C., 2009. Kinetic interactions of EDDS with soils. 1. Metal re-sorption and competition under EDDS deficiency. *Environ. Sci. Technol.*, 43 (2009), pp. 831–836.

- Žaltauskaitė, J., Sodienė, I., 2014. Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 103, 9–16. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.01.036
- Zhang, T., Wei, H., Yang, X.-H., Xia, B., Liu, J.-M., Su, C.-Y., Qiu, R.-L., 2014. Influence of the selective EDTA derivative phenyldiaminetetraacetic acid on the speciation and extraction of heavy metals from a contaminated soil. *Chemosphere* 109, 1–6. doi:10.1016/j.chemosphere.2014.02.039

3.3 Communauté de vers de terre et cartographie, outils intéressants pour la gestion des sites et sols pollués.

Suite aux expérimentations réalisées sur le site de STCM de Bazoches les Gallerandes. Une réflexion a été menée pour mettre en valeur les résultats et afin de les utiliser au mieux au sein de l'entreprise et de simplifier la communication entre celle-ci et les organismes de surveillance (DREAL...). Il a donc été décidé de cartographier les données obtenues au cours de l'étude précédente (section 3.2) à l'aide d'un système d'information géographique (SIG) (QGis software).

La Figure III.3.1 présente une photographie satellite du site d'étude et la localisation GPS des points d'échantillonnage. Comme décrit dans l'étude précédente, il a été réalisé 5 transects grossièrement parallèles entre eux et perpendiculaires au mur de l'usine, avec des points d'échantillonnages environ tous les 10m jusqu'à 140m de l'usine.

A l'aide des données récoltées dans la section 3.2, une carte des concentrations en Pb dans les sols a été dessinée (Figure III.3.2) en extrapolant les concentrations retrouvées dans chaque point d'échantillonnage. Les gammes de concentrations sont représentées par une palette de couleur allant du bordeaux pour les zones les plus concentrées ($>10000 \text{ mg Pb.kg}^{-1}$) jusqu'au bleu pour les zones moins contaminées. Sur cette carte, il a été associé le nombre de vers de terre collectés dans chaque point d'échantillonnage ainsi que le pourcentage d'*Aporrectodea. longa* trouvés. La densité des vers de terre est représentée par des cercles de diamètre plus ou moins élevé selon l'abondance dans les points d'échantillonnage. Les pourcentages d'*A. longa* (espèce qui a été précédemment considéré comme plus tolérante aux ETM) récoltés sont représentés par un code couleur allant du rouge pour les plus haut pourcentages jusqu'au vert pour les plus faibles. Ainsi il est clairement visible, le gradient de concentration en Pb dans les sols, qui diminue avec la distance à l'usine, en relation avec la densité de vers de terre. De plus, plusieurs informations peuvent être visualisées simultanément, avec ici une plus grande proportion d'*A. longa* dans les zones fortement concentrées en Pb et une diminution voire disparition dans les zones moins contaminées. Il est aussi possible d'observer grâce à cet outil un gradient de concentration latéral avec des concentrations en Pb plus élevées et une densité de ver de terre plus faible à l'est qu'à l'ouest.



Figure III.3.1: Photographie satellite du site d'étude (STCM de Bazoches les Gallerandes) avec le positionnement GPS du plan d'échantillonnage.

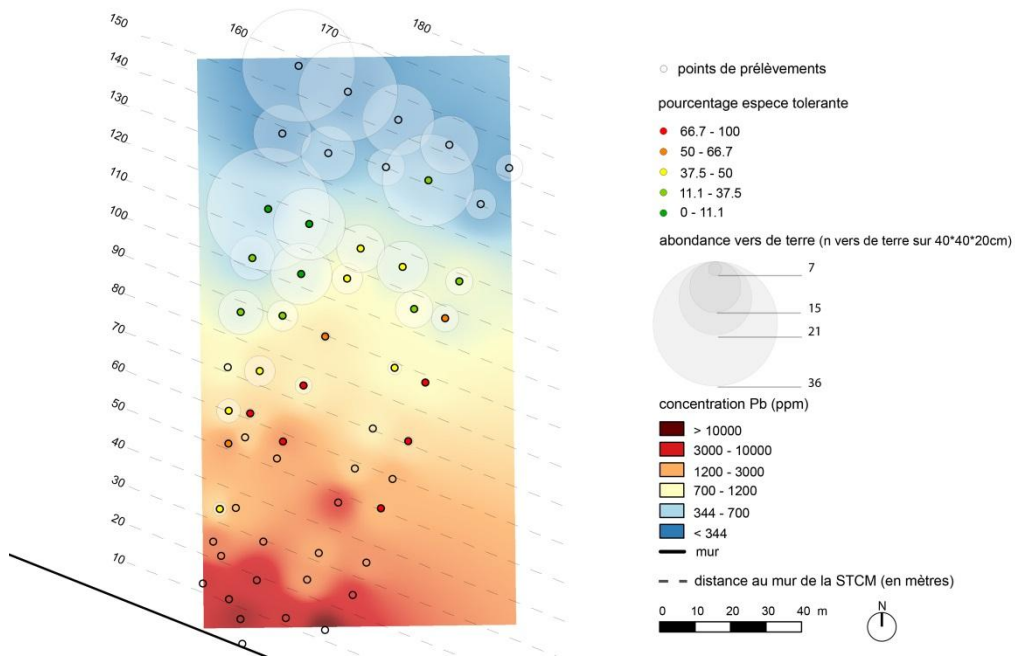


Figure III.3.2: Cartographie des concentrations en Pb dans le sol associées avec l'abondance de vers de terre et le pourcentage d'*A. longa* trouvés sur la parcelle attenante à l'usine de recyclage de batteries au Pb.

Cette observation est due aux vents dominants qui soufflent du sud-ouest et transportent ainsi les PM riches en ETM vers le nord-est de l'usine.

La carte suivante (Figure III.3.3) montre les concentrations en Pb dans les sols et le ratio vers juvéniles/vers adultes dans les points d'échantillonnage représenté par des digrammes circulaires. Il est possible d'observer l'absence de vers juvéniles dans les zones proches de l'usine et l'augmentation de leur proportion dans les zones moins contaminées. Ceci indique la plus forte sensibilité aux ETM des vers juvéniles.

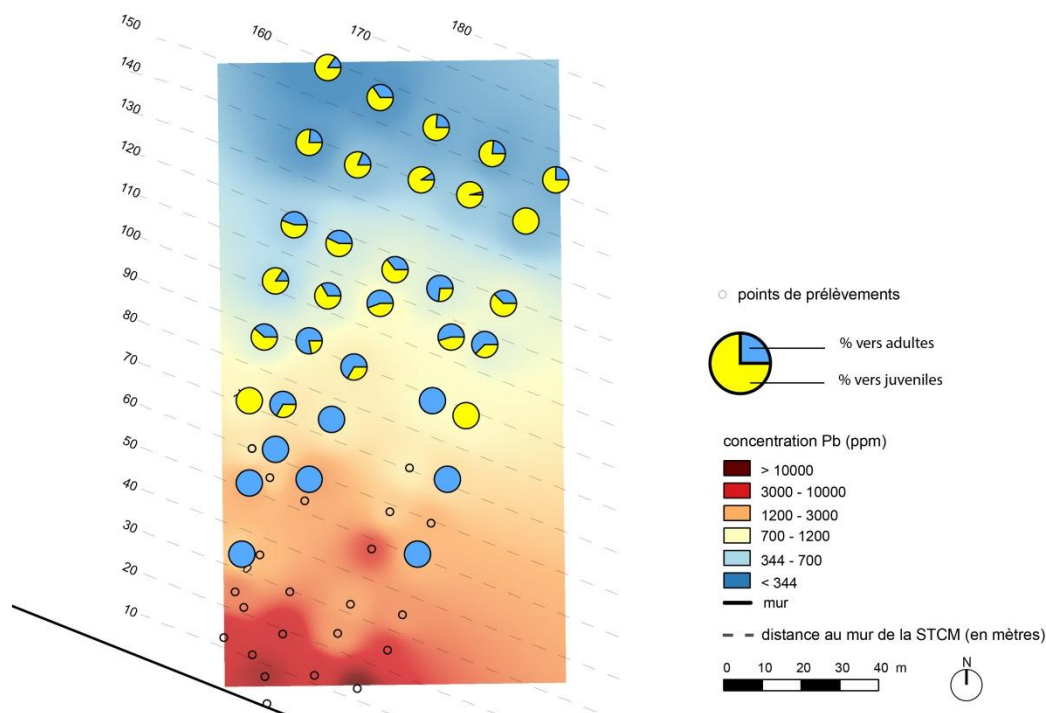


Figure III.3.3 : Cartographie des concentrations en Pb dans le sol associées au ratio vers juvéniles/vers adultes sur la parcelle attenante à l'usine de recyclage de batteries au Pb.

Les cartes suivantes (Figure III.3.4) montrent les concentrations en Pb et les teneurs en carbone organique dans le sol associées aux abondances de vers de terre prélevés dans chaque point d'échantillonnage. Les concentrations en Pb et la teneur en carbone organique sur deux cartes différentes sont représentées par la même paillette de couleur. Ainsi, il est clairement mis en évidence la relation entre ces deux paramètres. En effet, les fortes concentrations en Pb dans les sols induisent indirectement une accumulation de matière organique en surface. Ceci est dû à l'impact des ETM sur les organismes du sol. Les microorganismes du sol décomposent la matière organique, et les fortes concentrations en ETM dans les zones proches de l'usine interfèrent avec leur viabilité. Les vers de terre jouent aussi un rôle : par

leur activité de bioturbation, ils vont répartir la matière organique sur le profil de sol (0-1m de profondeur). De plus, ils participent à la dégradation, à la transformation et à la minéralisation de la matière organique améliorant ainsi son recyclage (Boyer et al., 2010) et sa décomposition par les microorganismes (Jusselme et al., 2013). Les éléments ainsi minéralisés sont facilement disponibles pour les plantes. Ainsi les zones fortement contaminées, dépourvues d'une forte biodiversité des organismes du sol, ne profitent pas des avantages procurés par ses derniers et la matière organique s'accumule en surface.

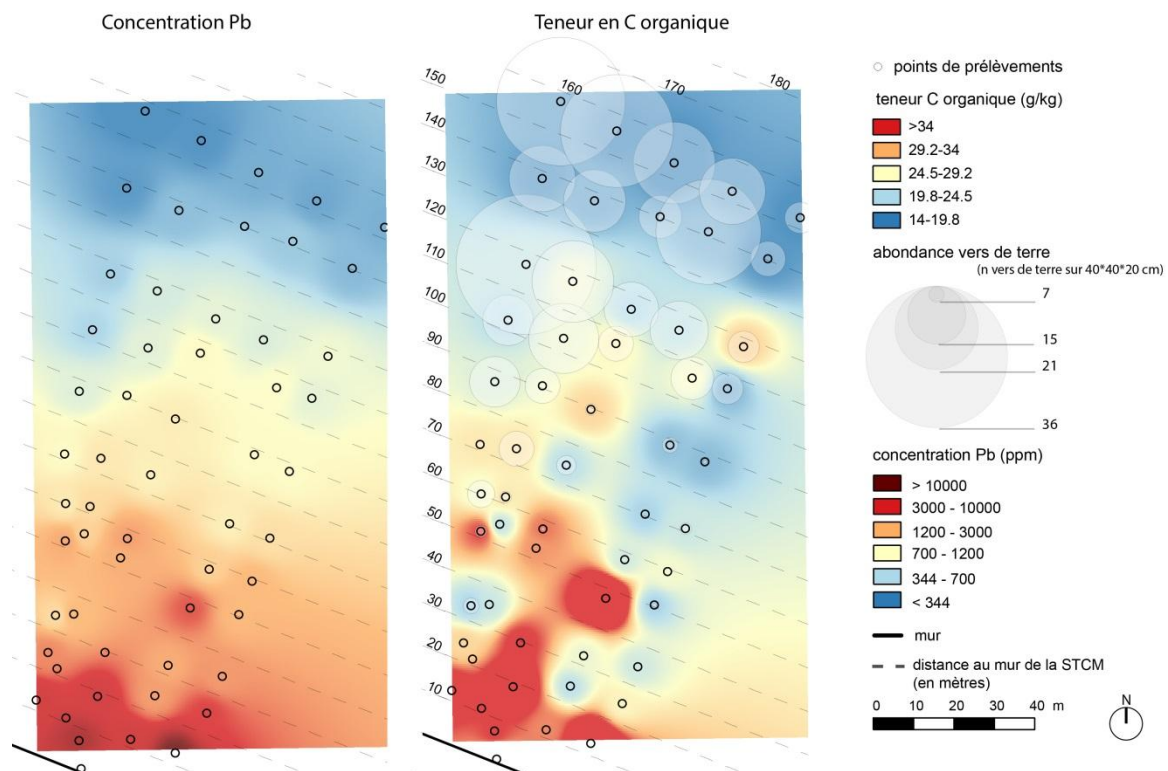


Figure III.3.4 : Cartographies des concentrations en Pb et des teneurs en Carbone organique dans le sol associées à l'abondance des vers de terre prélevés sur la parcelle attenante à l'usine de recyclage de batteries au Pb.

Sur ces cartographies, il est possible d'identifier des zones plus fortement contaminées en dehors du gradient de concentration (exemple à 40 m sur le transect 4). Ces points de contamination ne peuvent être dus aux retombées atmosphériques ou diffuses, mais sûrement à des événements accidentels tels que des écoulements de liquides fortement concentrés en ETM. Ceci pour démontrer que la cartographie peut être un très bon outil pour modéliser l'historique d'un site industriel.

En conclusion, il a pu être observé que les communautés de vers de terre sont de très bons indicateurs de la qualité des sols et que leur analyse permet une bonne évaluation du risque associé à la pollution en ETM sur les écosystèmes.

Enfin, pour les besoins du manuscrit, les cartes ont été exportées en format JPEG. Mais il est possible de créer un programme ne nécessitant pas de connaissance en SIG de la part de l'utilisateur. Ce programme réunit toutes les données cartographiées et l'utilisateur peut faire apparaître les différentes couches désirées sur la photographie satellite. Par exemple, dans le cas de cette étude, la couche d'extrapolation des concentrations en un autre ETM (Cd ou Sb...) avec les données de densité de vers de terre. Ce type de présentation constituerait alors un premier pas vers une approche intégrée et raisonnée des sites et sols pollués.

En perspectives, d'autres données comme la bioaccessibilité humaine des ETM ou leurs concentrations dans les organismes du sol pourraient être cartographiées également et ainsi, sur les cartes des calculs de risques pour la santé humaine ou les écosystèmes pourraient être appliqués. En résumé, comme ces travaux le montre, la cartographie peut être un outil précieux pour les gestionnaires d'entreprise à risques et faciliter la gestion des sites et sols pollués ainsi que la communication avec les autorités régulatrices.

Chapitre 4

L'influence de la bioturbation des vers de terre sur les transferts des ETM

Avant-propos

Les études écotoxicologiques précédentes ont non seulement généré des données améliorant les connaissances sur la toxicité des ETM, mais ont aussi permis d'établir les conditions expérimentales requises pour l'étude suivante. En effet, afin de correctement évaluer l'impact du ver de terre sur la phytodisponibilité des ETM, il est nécessaire de reproduire des conditions induisant le moins d'effets toxiques possibles afin de peu impacter son comportement. Si l'activité du ver de terre est affectée, son influence sur la disponibilité des ETM le sera aussi. Ainsi les résultats des études précédentes ont été utilisés pour définir les concentrations appliquées à l'étude suivante.

Les études concernant l'influence des vers de terre sur la phytodisponibilité des ETM sont encore rares et les mécanismes impliqués peu connus. Améliorer les connaissances concernant la phytodisponibilité des ETM permettrait une meilleure évaluation des risques pour la santé humaine. De plus, ces résultats pourraient être utilisés dans les protocoles de phyto-remédiation des sites et sols pollués.

Des tests d'extractions chimiques tels que les extractions au CaCl_2 ou à l'EDTA sont disponibles pour évaluer l'absorption des ETM par les plantes. Mais plusieurs auteurs ont montré que ces extractions chimiques ne peuvent évaluer de façon réaliste la biodisponibilité (Sizmur et al., 2009). C'est pourquoi dans l'étude qui suit, nous avons réalisé des expérimentations en mésocosmes, regroupant plusieurs espèces de vers de terre, une plante potagère la laitue et du sol contaminé par les retombées atmosphériques d'une usine de recyclage de batteries au Pb. La figure IV.1.1 représente le design expérimental utilisé pour cette étude.

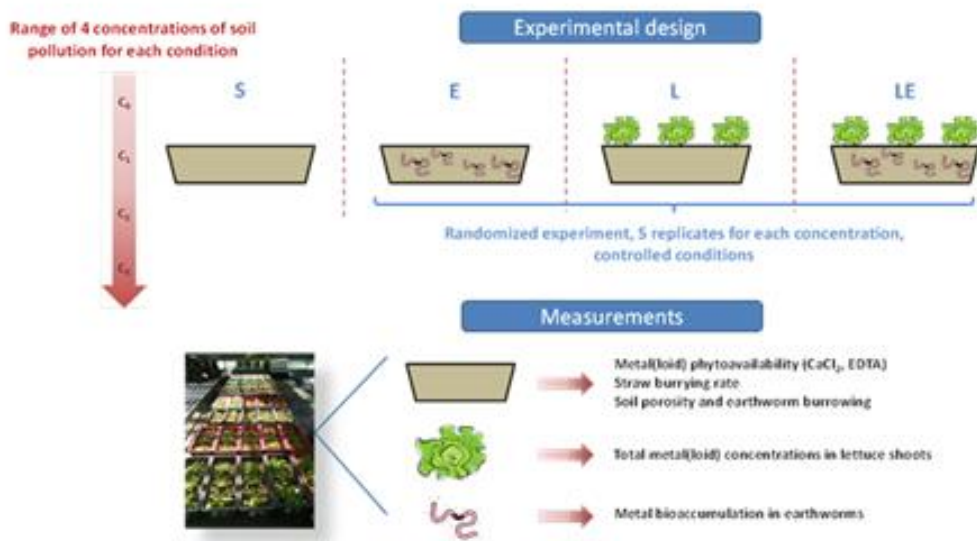


Figure IV.1.1 : Desing experimental de l'étude en mésocosmes

► Le travail réalisé a été valorisé par une publication acceptée dans la revue *Environmental Pollution*. Lévêque et al. 2014. "Earthworm bioturbation influences the phytoavailability of metals released by particles in cultivated soils". *Environmental Pollution* (DOI: 10.1016/j.envpol.2014.04.005). Cette publication est présentée ci-dessous.

4.1. Earthworms bioturbation influences the phytoavailability of metals released by particles in cultivated soils

Thibaut Leveque^{1,2,3}, Yvan Capowiez⁴, Eva Schreck⁵, Tiantian Xiong^{1,2}, Yann Foucault^{1,2,6}, Camille Dumat^{1,2*}

¹Université de Toulouse, INP-ENSAT, Av. Agrobiopôle, 31326 Castanet-Tolosan, France.

²UMR 5245 CNRS-INP-UPS, EcoLab (Laboratoire d'écologie fonctionnelle), Avenue de l'Agrobiopôle, BP 32607, 31326 Castanet-Tolosan, France.

³ADEME (French Agency for Environment and Energy Management), 20 avenue du Grésillé, BP 90406, 49004 Angers Cedex 01, France.

⁴INRA, UR 1115, Plantes et Systèmes Horticoles, Site Agroparc, 84914 Avignon cedex 09.

⁵Géosciences Environnement Toulouse (GET), Observatoire Midi Pyrénées, Université de Toulouse, CNRS, IRD, 14 avenue E. Belin, F-31400 Toulouse, France.

⁶STCM, 30 Avenue Fondeyre, 31200 Toulouse, France.

Key words: metals, phytoavailability, earthworm bioturbation, soil characteristics.

Capsule: Earthworm activities can increase metal phytoavailability and subsequent human exposure to metals in consumed vegetables.

Abstract

The influence of earthworm activity on soil-to-plant metal transfer was studied by carrying mesocosms experiments with or without lettuce and/or earthworms in soil with a gradient of metal concentrations due to particles fallouts. Soil characteristics, metal concentrations in lettuce and earthworms were measured and soil porosity in the mesocosms was determined. Earthworms increased the soil pH, macroporosity and soil organic matter content due to the burying of wheat straw provided as food. Earthworm activities increased the metals concentrations in lettuce leaves. Pb and Cd concentrations in lettuce leaves can increase up to 46% with earthworm activities. These results and the low correlation between estimated by CaCl₂ and EDTA and measured pollutant phytoavailability suggest that earthworm bioturbation was the main cause of the increase. Bioturbation could affect the proximity of pollutants to the roots and soil organic matter.

4.1.1 Introduction

Today, soil pollution by persistent metals concerns large areas at the global scale, particularly in industrial and mining environments (Newhook et al., 2003; Schreck et al., 2011). Although the sustainability of industrial processes has been progressively improved unfortunately numerous cases of past contamination exist (Uzu et al., 2010; Shahid et al., 2013a) and metals are still released into the environment (Nair et al., 2010). In particular, the different stages of lead-recycling processes (crushing, fusion, reduction and refining) emit atmospheric particles (PM) enriched in metal(loid)s: Pb, Cd, As, Cu, Zn, Sb and Sn (Cecchi et al., 2008).

Urban areas have expanded worldwide (Szolnoki et al., 2013), and due to numerous anthropogenic activities, the amount of metals released in soils has generally increased (Wong et al., 2006), with Pb and Zn being the most commonly observed pollutants (Szolnoki et al., 2013). Originally located on the outskirts of cities, numerous industrial or mining sites, often abandoned, are now in urban areas and are therefore likely to cause environmental and health risks to surrounding populations (Van Hees et al., 2008; Foucault et al., 2013b; Szolnoki et al., 2013). These sites are sources of fine particles enriched with pollutants leading to contamination of soils (Lee et al., 2008; Stampoulis et al., 2009; Schreck et al., 2011) and plants (Uzu et al., 2009; Schreck et al., 2013).

Recently, pollutant bioavailability in soils has become a crucial scientific question (Foucault et al., 2013a), with ecotoxicity (Hedde et al., 2012; Leveque et

al., 2013) and human health risk assessments (Pelfrène et al., 2012; Uzu et al., 2011). Soil to plant transfer has been widely studied and it is nowadays well-documented. It is well-known that soil to plant transfer of metals strongly depends on pollutant compartmentalization and speciation that are directly in relation to soil edaphic properties such as soil organic matters (SOM) or pH (Shahid et al., 2013b). According to Chenot et al. (2013) and Dumat et al. (2013), various environmental or human factors can strongly modify soil pH, texture and soil organic matters (SOM: content and type) in urban areas. Actually, even if these soils are polluted with metal(loid)s, they still provide a habitat for plants and soil organisms. Earthworms, the dominant macrofauna in soils, can also modify the soil characteristics through their bioturbation activities such as burrow creation, production of casts and thus the mixing of litter and soil (Nahmani et al., 2007). Moreover, earthworms preferentially ingest SOM (Lee et al., 1985) and several interactions (indirect and feedback effects) have been reported between metals, soil living organisms and SOM (Dumat et al., 2006; Quenea et al., 2009). In consequence, earthworms can also modify the mobility of metals (Sizmur and Hodson, 2009) and their bioavailability (Wen et al., 2006; Capowiez et al., 2011).

Further studies are therefore needed in the case of PM polluted soils, to investigate the influence of earthworm activities on metals uptake by vegetables, the mechanisms involved (Sizmur and Hodson, 2009) and later their implication in terms of metals phytoavailability and

consequences for human health after plant consumption. Food is the main source of human exposure to pollutants and vegetables are a major component in the diet of the world's population (Mansour et al., 2009). Thus, determining how metals are taken up by plants, accumulate and eventually enter the human food chain is becoming a key issue for assessing the health risks associated with the consumption of polluted vegetables (Polichetti et al., 2009; Shahid et al., 2013b). The present study had two scientific aims: (i) In the context of health risk assessments, does earthworm activity in soil modify metal concentrations in the edible parts of vegetables? (ii) What are the biogeochemicals and physical mechanisms involved in the soil-plant-earthworm-metal systems? In order to answer these questions, lettuces were cultivated on historically polluted soils with a range of increasing concentrations of metals (Pb, Cd, Zn and Cu) carried by process particles (Uzu et al., 2009; Schreck et al., 2011), for six-weeks in mesocosms experiment with or without earthworms. Total, exchangeable (EDTA) and phytoavailable (CaCl_2) metal concentrations in soils were studied in relation to soil pH, organic matter and porosity. Thus, this article provides new insights to improve the understanding of the role of earthworm activities on metals phytoavailability in polluted soils and health risks incurred by vegetables consumers.

4.1.2 Materials and methods

4.1.2.1 Soil preparation

The polluted soil used in this study was collected from a lead recycling

factory, the chemical metal treatment company (Société de Traitements Chimiques des Métaux, STCM), located in the urban area of Toulouse, southwest France (43_3801200 N, 01_2503400 E), which currently recycles batteries. For several decades, atmospheric fallout of metal-enriched particles from the industrial activities at the STCM site have resulted in high concentrations of Pb and other metals such as Cd, Cu and Zn in nearby top-soils (Uzu et al., 2009; Schreck et al., 2011). Thus, the sampled soil is contaminated with a complex mixture of metals: Pb, Zn, Cu and Cd at concentrations of 39,800, 294, 286 and 18.36 mg kg^{-1} of dry weight, respectively. This historically polluted soil was sampled from the 0-25 cm top-soil layer, air-dried at room temperature for a week, disaggregated and, finally, sieved to retain aggregates smaller than 2 mm. This highly contaminated soil was used to establish a pollution concentration gradient to which earthworms were exposed in mesocosms. To prepare the soil, a specific amount of the highly contaminated soil (pH = 6, OM content = 5.2%, 12% clay, 47% silt and 41% sand) was mixed with non-contaminated soil (pH = 5.7, OM content = 4.5%, 13% clay, 48% silt and 38% sand) to obtain a range of contamination with 30, 780, 2800 and 3750 mg kg^{-1} of dry weight for Pb, as described by Leveque et al. (2013). The properties of each soil were determined by INRA Arras. Metal concentrations in the soils used for the mesocosm experiments are reported in Table 1. These metal concentrations were chosen to minimize ecotoxicological effects and optimize earthworm bioturbation activities, as assessed by earthworm cast production in a previous experiment (Leveque et al., 2013).

Table 1: Mean values and standard deviations (n=5) of metals concentrations in soils (mg.kg⁻¹)

	Pb	Cd	Cu	Zn
C ₀	19.2 ± 2.5	0.3 ± 0.02	21.6 ± 1.4	75.7 ± 0.6
C ₁	800.5 ± 36.8	1.4 ± 0.04	26.8 ± 0.9	121.8 ± 7.8
C ₂	2822.8 ± 127.2	5.1 ± 0.07	40.2 ± 0.8	181.1 ± 12.1
C ₃	3730.7 ± 583.5	7.2 ± 0.26	46.3 ± 7.2	266.1 ± 27.1

4.1.2.2 Earthworms

Two earthworm species (*Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa*) were chosen from two different ecological types (anecic and endogeic respectively) and thus are expected to have different behaviours. *L. terrestris* is an anecic species which dominates earthworm biomass in various temperate ecosystems and strongly affects organic matter transformation and soil development (Maleri et al., 2008). *A. caliginosa* is a common endogeic species well known for its strong bioturbation activities (Dittbrenner et al., 2011). Adult *L. terrestris* earthworms were purchased from a local supplier (Decathlon, France). Adult *A. caliginosa* earthworms were found at an uncontaminated fallow site near Valence (France). Prior to the start of the experiment, the earthworms were allowed to acclimatize for one week in the experimental conditions.

4.1.2.3 Experimental set-up

Rectangular plastic pots (50 × 20 × 15 cm) containing 1 mm diameter holes to allow water drainage were filled with 6 kg of soil sieved to 2 mm. Four different

experimental series were carried out simultaneously. The four experimental series were: (i) control soil without earthworms and plants (denoted S); (ii) soil with earthworms but no plants (denoted E); (iii) soil with lettuce but no earthworms (denoted L) and (iv) soil with lettuce and earthworms (denoted LE). For each experimental condition, four concentrations denoted C0, C1, C2 and C3 were studied with five true replicates per series.

Lettuce (*Lactuca sativa capitata*) was purchased at the 2-leaf stage from a local supplier (Botanic, France). Three lettuces were planted per pot in the experimental series L and LE. At the beginning of the experiment, the soil moisture was measured and adjusted to 19% (corresponding to 65% of its water holding capacity, as previously measured in situ by filter paper press method). All the pots were weighed and, every two days the weight lost was replaced with deionized water. The E and LE experimental series were inoculated with 2 *L. terrestris* and 9 *A. caliginosa* per pot. All individuals were adult worms, with a mean fresh individual weight of 0.66 ± 0.1

g (n=360) and 4.3 ± 0.7 g (n = 80) respectively for *A. caliginosa* and *L. terrestris*, (the errors are standard deviations). The experiment was carried out for six weeks at an average temperature of $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

The earthworms (especially *L. terrestris*) were fed seven grams of dry wheat straw cut into small pieces and spread on the soil surface.

At the end of the experiment, i) the lettuce was sampled and washed prior to acidic digestion, ii) some mesocosms were chosen to assess internal macroporosity (see below), iii) straw was recovered, air-dried and weighed, iv) in all mesocosms, living earthworms were recovered, counted, weighed again and then placed on filter paper for five days to empty their gut before acidic digestion, v) soils from each mesocosm were then mixed and sampled for chemical extractions.

The intensity of straw burial by the earthworms was calculated as the ratio of the mass of straw that had disappeared from the surface at the end of the experiment (i.e. that was buried, in g of dry weight) to the initial mass of the straw (in g of dry weight). This intensity was used to evaluate the effect of metal contamination on earthworm foraging and burial behavior.

4.1.2.4 Phytoavailability measurements.

4.1.2.4.1 Total metal content in lettuce shoots

After harvest, lettuce shoot tissues were weighed (fresh biomasses) and then washed twice with deionized water (Uzu et al., 2010). Plant tissues were oven-dried at

40°C for 72 h. After mineralization of plant samples in aqua regia (1:3 mixture of HNO_3 and HCl) with a Digiprep_ instrument (from SCP Science producer) at 80°C for 4 h, the Pb, Cd, Cu and Zn concentrations were measured by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry ICP-OES (IRIS Intrepid II XXDL) or inductively coupled plasma-mass spectrometry ICP-MS (X Series II, Thermo Electron). Ten blanks were submitted to the same treatment (mineralization and assay) for method control. Each sample was analysed in triplicate. The detection limits of Pb, Zn, Cu and Cd were 0.3, 2.2, 1.3 and $0.2 \mu\text{g.l}^{-1}$, respectively, whereas the limits of quantification were approximately 0.4, 3, 2 and $0.3 \mu\text{g.l}^{-1}$ respectively. The accuracy of measurements was checked using reference materials: Virginia tobacco leaves, CTA-VTL-2, ICHTJ and TM-26.3 certified reference material from the National Water Research Institute, Canada. The concentrations found were within 95-102% of the certified values for all measured elements.

4.1.2.4.2 CaCl_2 and EDTA extractions

CaCl_2 extractions were performed on soil samples from experimental series (S) and (E). Neutral salt extraction on polluted soils is the current standard method used to determine metal phytoavailability (Menzies et al., 2007). According to Houba et al. (1996) and Schreck et al. (2011), 10 ml of CaCl_2 10^{-2} M were mixed with 1.0 g of soil in a 20ml centrifuge tube placed on an end-over-end shaker at 5 rpm for 2 h at 20°C . After extraction, samples were centrifuged at 10,000 g for 30 min.

Table 2: Mean values and standard deviations of CaCl₂ and EDTA metals extractable fractions (expressed in mg.kg⁻¹ of soil) of both control soil (S) and soil with earthworms (E) experimental series

		S			E		
		C ₁	C ₂	C ₃	C ₁	C ₂	C ₃
CaCl ₂	Pb	0.5 ± 0.1	2.4 ± 0.9	6.2 ± 1.28	0.84 ± 0.28	3.2 ± 1.24	4.4 ± 1.24
	Cd	0.08 ± 0.02	0.2 ± 0.07	0.7 ± 0.11	0.07 ± 0.03	0.2 ± 0.07	0.5 ± 0.13
	Zn	0.17 ± 0.03	0.31 ± 0.14	1.4 ± 0.21	0.36 ± 0.14	0.35 ± 0.14	0.9 ± 0.28
EDTA	Pb	439 ± 8	1596 ± 24	2264 ± 67	393 ± 17	1521 ± 126	2033 ± 877
	Cd	0.58 ± 0.01	2.2 ± 0.07	3.2 ± 0.08	0.5 ± 0.05	1.8 ± 0.2	2.4 ± 0.14
	Zn	2.1 ± 0.16	6.3 ± 0.26	9.9 ± 0.64	1.9 ± 0.12	5.8 ± 0.2	8.6 ± 0.5
	Cu	3.7 ± 0.09	7.7 ± 0.02	10.1 ± 0.28	4.21 ± 0.25	7.35 ± 0.81	9.62 ± 0.4

In the case of CaCl₂ extraction Cu was not determined.

The supernatant was then filtered at 0.22 mm, acidified to 2% with distilled HNO₃ (15 M, suprapur 99.9%), and then stored at 4 °C before analysis. A Standard Reference Material certified for element content: SRM 2710 Montana Soil I (Highly Elevated Trace Element Concentrations) from National Institute of Standards and Technology was used as soil reference, due to its similar physico-chemical characteristics with the soil of the study, as previously described by Schreck et al. (2011). The metal concentrations were within 96-103% of the reference and the detection and quantification limits were the same as those described above in 2.4.1 section.

EDTA extractions were performed on soil samples from experimental series (S) and (E). This chemical extraction method, based on the properties of a strong chelation agent, was first described by Wear and Evans (1968). Compared with

CaCl₂ extraction, this second chemical extraction procedure can extract metals which are more strongly linked by the soil components. 1 g of soil sample was mixed with 10 ml of EDTA 0.05 M in a centrifuge tube. The tubes were agitated for 2 h using an end-over-end shaker at 5 rpm at 20 °C, as previously described for CaCl₂ extractions. After extraction, samples were centrifuged at 10,000 g for 30 min. The supernatant was then filtered at 0.22 mm, acidified to 2% with distilled HNO₃ (15 M, suprapur 99.9%), and then stored at 4°C before analysis. As previously reported, standard soils and blanks were analysed according to the same method. Metal concentrations were then determined on diluted samples to limit matrix effects and were within 98-102% of the reference. Detection and quantification limits were the same as those described in Section 2.4.1.

4.1.2.5 Assessment of earthworm induced macroporosity

To verify that earthworms were active inside the mesocosms during the experiment even at the higher metal concentration, four mesocosms (one for each metal concentration) containing earthworms were chosen randomly. These mesocosms were then scanned using a medical X-ray tomograph (BrightSpeed Exel 4, General Electric) at the INRA Nancy center to obtain a set of images 1.25 mm thick every 1.25 mm. The settings at which the X-ray beam was operated were 130 mA and 50 kV. The grey level histograms of the images were all bimodal, with one large peak (grey values) corresponding to the soil matrix and one narrow peak (black values) corresponding to voids and thus to macropores created by earthworms (Capowiez et al., 2011). We then used a segmentation procedure proposed by Pierret et al. (2002): in brief, macropores are traced starting from the darkest voxels by studying local variation in mean grey level when the current voxel is included in the current macropore. Macropores that were too small (less than 500 voxels, i.e. about 33 mm³) were discarded. For the sake of 3D rendering, we defined a point of observation and computed the distance between this point and each voxel of the macropores and translated distance into a gradient color map (here yellow for the minimum and blue for the maximum) in order to visualize the resulting earthworm burrow in 3D.

4.1.2.6 Statistical analyses

Results were expressed as means \pm SD (standard deviation). All tests were carried out using the R_ 2.14.1 package software. Statistical differences were accepted when the probability of the result assuming the null hypothesis (p) was less than 0.05. A Shapiro-Wilk W-test for normality was performed to determine if the data came from a population with normal distribution. Then, one-way ANOVA followed by Tukey's HSD tests were performed to determine significant differences between metal uptake in lettuce and straw burial rates in the different soil concentrations and different experimental series. Student's t-tests for paired data sets were performed to establish significant differences in lettuce biomass between treatments with and without earthworms.

4.1.3 Results

4.1.3.1 Earthworms survival and biomass

At the end of the six week pot experiments, 60.5 and 57.5% of *A. caliginosa* and *L. terrestris* earthworms, respectively, were found alive. No significant differences in earthworm mortality were observed between treatments (different soil concentrations or presence of lettuce) (Table 2).

The biomass of both *A. caliginosa* and *L. terrestris* showed a decreasing trend during the experiment (Fig. 1). This decrease was only statistically significant ($p < 0.05$) for *A. caliginosa*. The absence of a clear dose-response relationship between metal concentration in soil and earthworms and body weight suggests that the metal contamination was not the primary cause for this decrease in body weight.

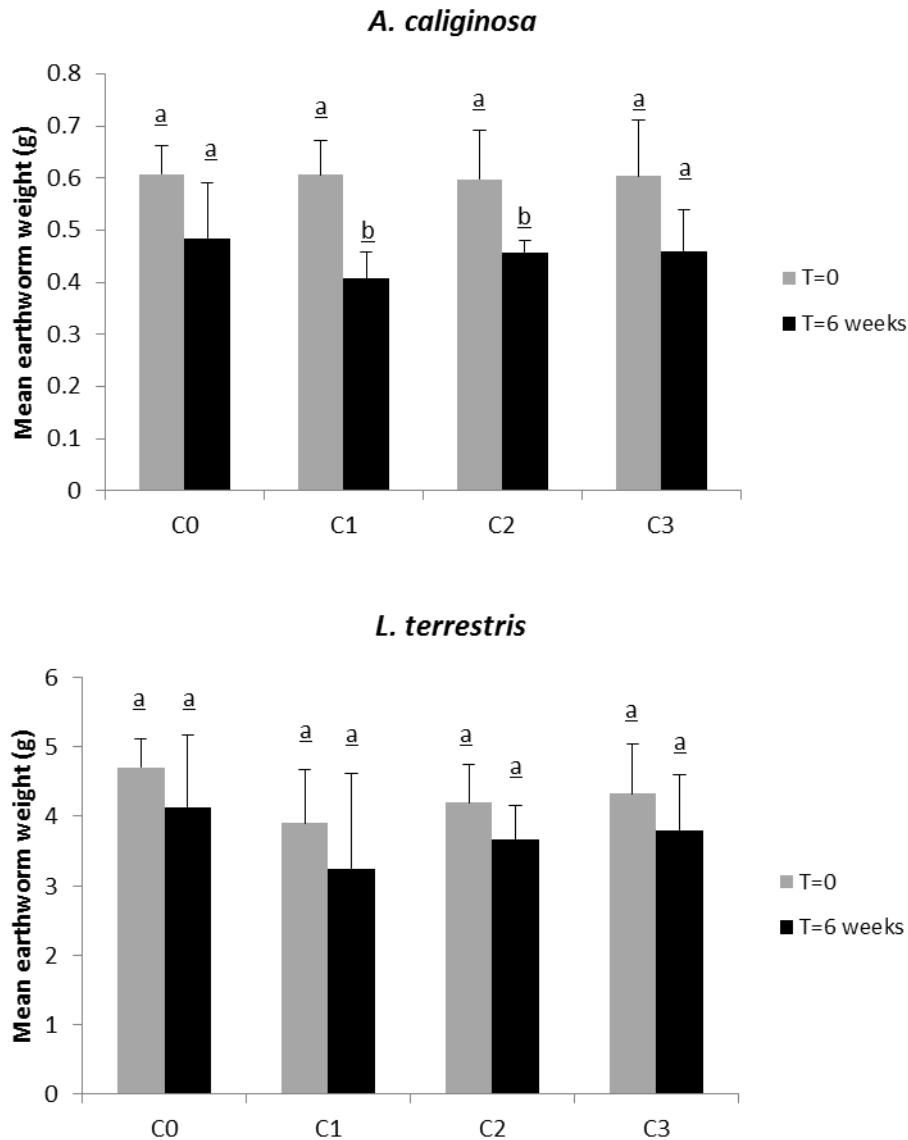


Figure 1

Earthworm fresh biomass at the beginning and at the end of the experiments: 6 weeks incubation in mesocosms and exposition to increasing metals concentrations in soil. Bars sharing the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey's HSD test).

4.1.3.2 Effect of earthworm activity on lettuce growth and metal phytoavailability

No significant difference was observed in lettuce dry weight between the (L) and (LE) experimental series, except at the highest metal concentration (C3)

(Fig.2). Indeed, for the C3 soil concentration, a significant increase in lettuce growth was observed for the (LE) compared to (L) experimental series. In the (L) experimental series, the mean weight of lettuce shoots did not change with increasing metal concentration in soil. However, in the (LE) experimental series, lettuce growth increased with increasing

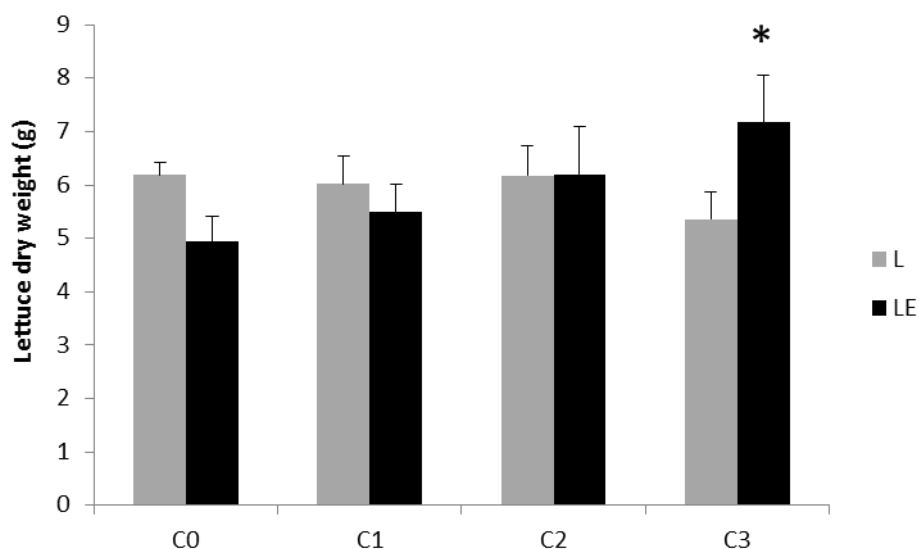


Figure 2

Effect of earthworm's activity on lettuce shoot biomass after 6 weeks of growth. (L): Soil + lettuce and (LE): Soil + lettuce + earthworms. (denotes significant differences ($p < 0.05$) between experimental series and without earthworms).*

soil metal concentrations (significant difference for C3).

The total Pb concentration in lettuce shoots was significantly higher in the (LE) (22.3 and 22.8 mg.kg^{-1}) compared to (L) (10.3 and 14.5 mg.kg^{-1}) experimental series, respectively for C2 and C3 soil concentrations (Fig. 3). This trend was not observed for C1. The Pb concentration in lettuce leaves in C0 was below detection. For C3, the Cu, Cd and Zn concentrations in lettuce shoots were significantly higher in the (LE) compared to (L) experimental series (Fig. 3). As observed with Pb, no significant difference in Cd, Cu and Zn concentration was observed in lettuce shoots between (L) and (LE) conditions, for the lowest soil concentrations. Pollutant extractable fractions (expressed in mg.kg^{-1} of soil) are shown in Table 3. In contrast to the pollutants in lettuce leaves, for the two different chemical extractions performed

on the polluted soils, no significant difference was observed with or without earthworm bioturbation for all metals studied.

4.1.3.3 Behavior and impact of earthworms in polluted soils

A significant decrease in straw burial intensity by the earthworms was observed with increasing soil metal concentration, in the absence of lettuce (E) (Fig. 4). However, there was no significant difference in straw burial intensity at any of the studied metal concentrations in the presence of lettuce (LE). In addition, the straw burial intensity was significantly higher in the (E) experimental series than in (LE) experiments.

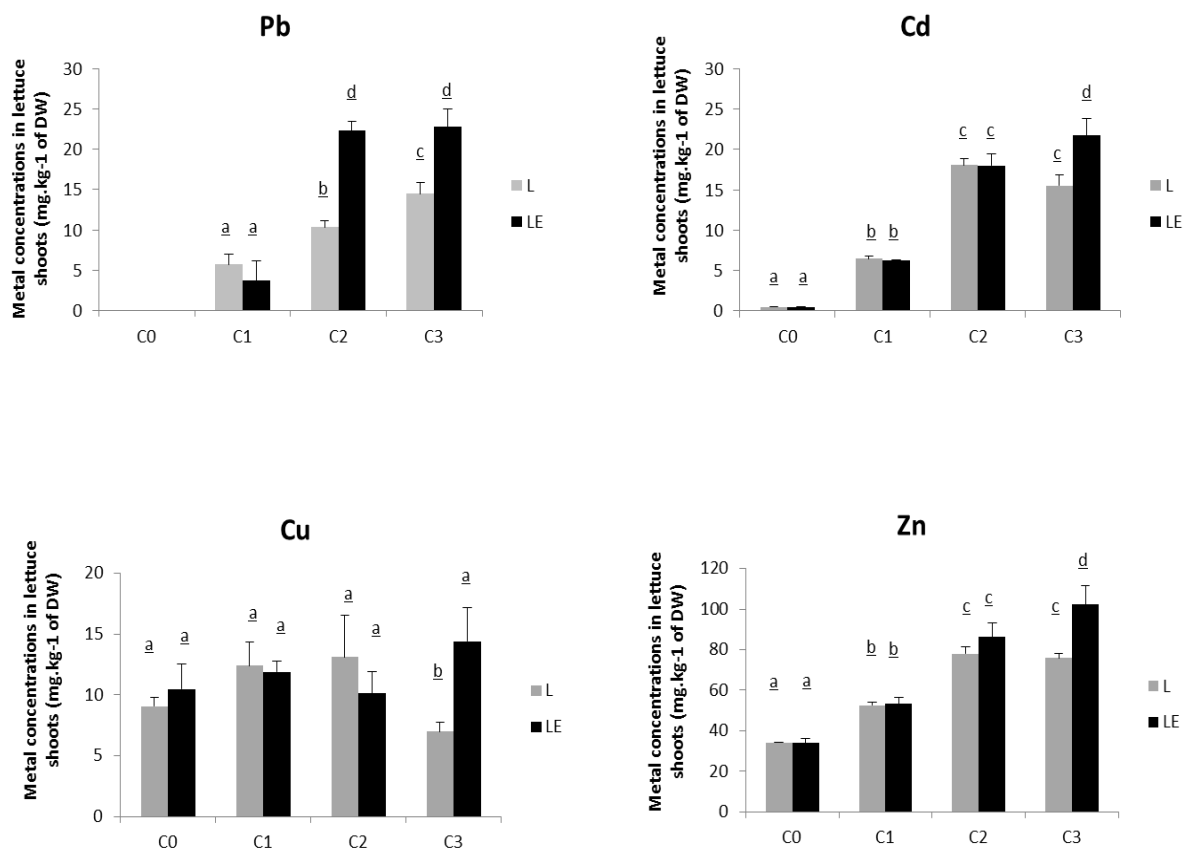


Figure 3

Effect of earthworm's activity on metals concentration in lettuce shoot. Results are expressed as a mean \pm standard deviation. (L): soil + lettuce and (LE) : soil + lettuce + earthworms. Bars sharing the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey's HSD test).

No significant differences were observed for organic carbon and total nitrogen content in the solid soil phase. However, soil pH significantly increased in the experimental series where earthworms were present (Table 3).

Visual assessment of the 3D burrow systems made by earthworms inside the mesocosms (Fig. 5) indicated that bioturbation strongly modified the soil structure. This resulted in the production of burrows with an average volume of

335cm³. The burrow volume was highest in the control mesocosm (462 cm³) and lowest in the C2 mesocosm (222 cm³). Both species were active since many different burrows with two different mean diameters were observed. Indeed *A. caliginosa* made narrower burrows than *L. terrestris* (Dittbrenner et al., 2011). From the observations performed on the five scanned mesocosms, it was evident that the soils were highly bioturbated even at the higher soil metal concentrations (C3).

Table 3: Mean values and standard deviations ($n=5$) of the soils characteristics in for the different experimental series (S): Control soil, (E): Soil + earthworms, (L): Soil + lettuce and (LE): Soil + lettuce + earthworms. C0 to C3 are the different soils concentrations used (cf Table 1).

	Organic C (g.kg-1 of DW)			Total N (g.kg-1 of DW)			C/N			pH		
(S) C ₀	18.2	±	0.6	1.8	±	0.08	10	±	0.14	6,0	±	1.1
(S) C ₁	14.2	±	1.7	1.4	±	0.11	10.1	±	0.35	6,0	±	1.3
(S) C ₂	17.1	±	0.3	1.7	±	0.06	10.2	±	0.21	5.9	±	0.1
(S) C ₃	19.4	±	2.3	1.9	±	0.25	10.3	±	0.14	5.9	±	0.1
(E) C ₀	16.1	±	0.8	1.5	±	0.16	10.5	±	0.57	7.8	±	0.4
(E) C ₁	15.8	±	0.1	1.5	±	0.01	10.4	±	0.14	7.3	±	0.3
(E) C ₂	17.2	±	0.5	1.6	±	0.01	10.7	±	0.21	7.6	±	0.3
(E) C ₃	17.8	±	1.6	1.6	±	0.08	11.2	±	0.42	6.9	±	1.2
(L) C ₀	17.7	±	0.6	1.7	±	0.04	10.3	±	0.14	7.8	±	0.4
(L) C ₁	15.5	±	1.6	1.5	±	0.1	10.4	±	0.28	7.1	±	1.1
(L) C ₂	17.2	±	0.8	1.6	±	0.06	10.6	±	0.14	6.8	±	1.2
(L) C ₃	16.4	±	0.4	1.6	±	0.03	10.5	±	0.07	6,0	±	0,0
(LE) C ₀	18.7	±	1.1	1.8	±	0.09	10.7	±	0,00	7.3	±	0.9
(LE) C ₁	18.1	±	1.1	1.7	±	0.11	10.7	±	0,00	8,0	±	0.1
(LE) C ₂	17.6	±	2.3	1.6	±	0.17	10.9	±	0.28	5.8	±	0.1
(LE) C ₃	18.3	±	2.3	1.7	±	0.26	10.9	±	0.35	7.8	±	0.1

4.1.4 Discussion

4.1.4.1 Impact of metals on earthworms

Before assessing the influence of earthworms on the fate of metals in soil, it is first necessary to verify that their activity

is not significantly affected in the studied polluted soils. According to [Vorenhout et al. \(2000\)](#), earthworm activities are sensitive to metal toxicity. Thus there is a trade-off between the effect of earthworms on the fate of pollutants and their toxic effects on earthworms ([Eijsackers, 2001](#); [Ruiz et al., 2009, 2011](#)).

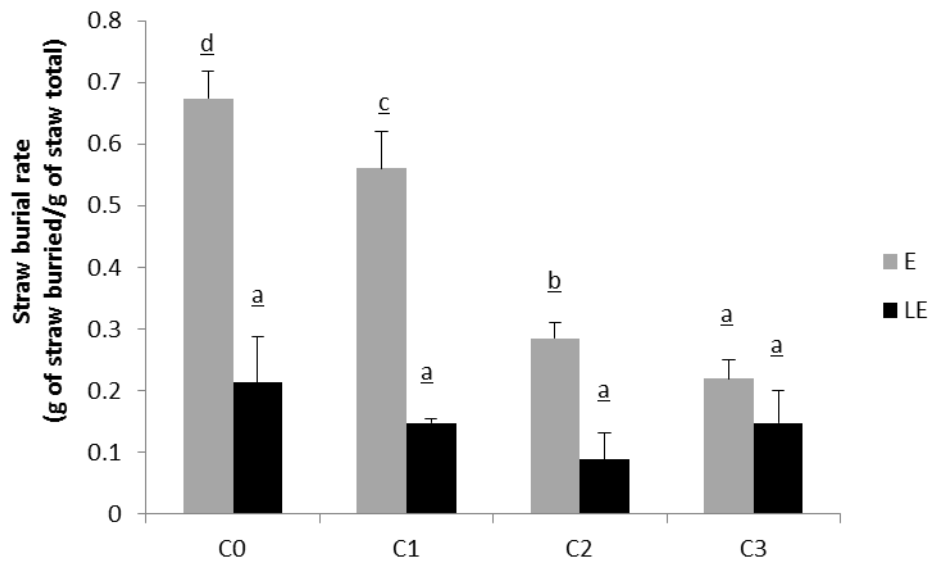


Figure 4

Rates of straw burial by earthworms in function of the presence of lettuce and the soil concentration in metals. (E): Soil + earthworms and (LE): Soil + earthworms + lettuce. Bars sharing the same letter are not significantly different ($p < 0.05$, Tukey's HSD test).

As previously reported by [Leveque et al. \(2013\)](#) using the same soil in a short-term experiment (two weeks in microcosms), the metal concentrations in this experiment do not cause earthworm mortality or biomass loss. Indeed, the concentrations were carefully selected to avoid any impact on earthworm viability. Under our experimental conditions, we observed that earthworm foraging activities were not too seriously affected with no obvious differences in terms of burrow creation, however burial of straw fragments did decrease significantly with increasing metal concentration in the experiment without lettuce. Thus, *L. terrestris* surface activities may have decreased. Our study suggests that the intensity of straw burial could be used as an indicator of toxicity ([Bieri, 1992](#)). This behavioural indicator is likely to be ecologically relevant since organic matter burial is an important ecosystem service provided by earthworms in soils ([Jouquet et al., 2006](#)). Moreover, it

is well known that burrowing activities influence SOM repartition and microorganism activities ([Jégou et al., 2000](#)) and this may in turn modify metal bioavailability ([Ruiz et al., 2009](#)).

4.1.4.2 Influence of earthworm activity on metal phytoavailability in relation with soil properties and metal compartmentalization

Earthworm activity appeared to increase metal uptake by the lettuce plants for the higher concentration (C3), both for pollutants (Pb and Cd) and essential elements (Cu and Zn), except for Pb where the increase took place for both the C2 and C3 concentrations.

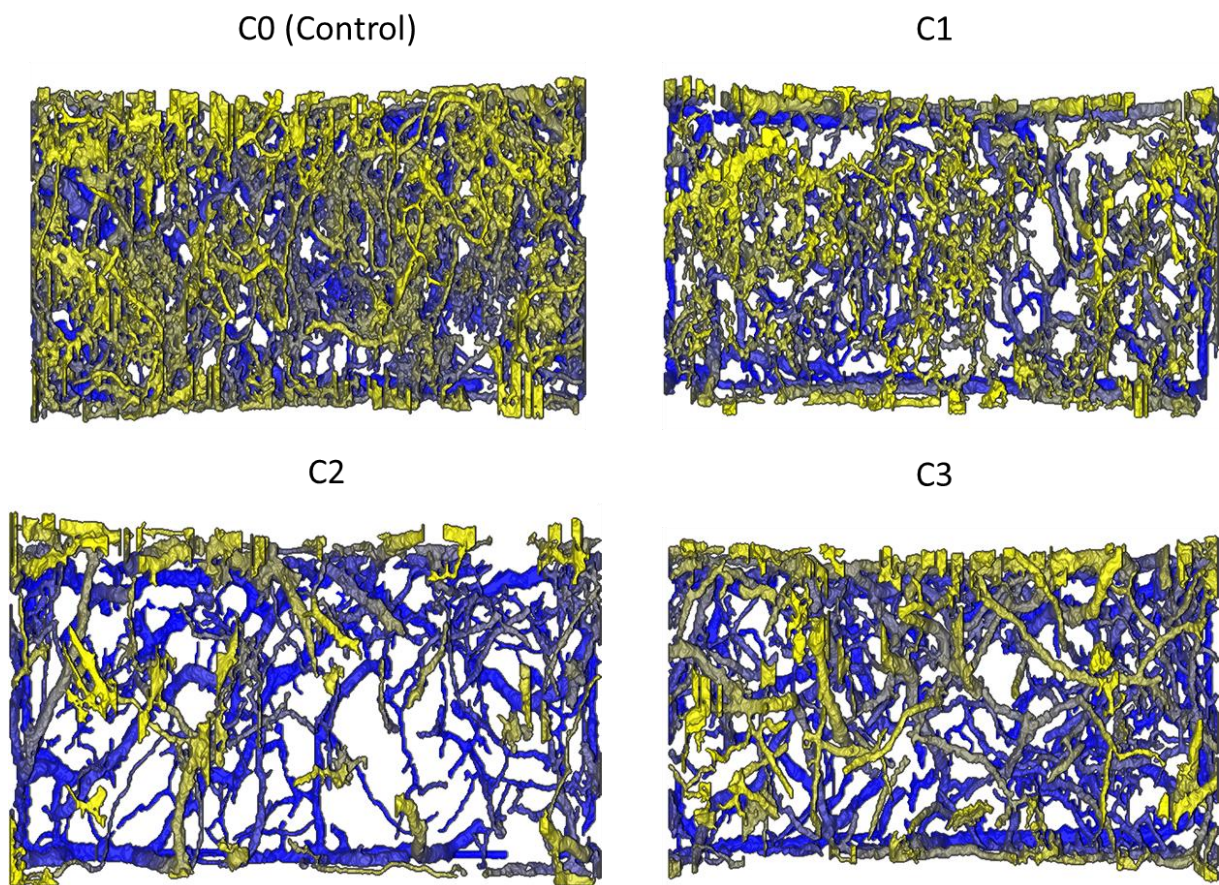


Figure 5

X-ray tomography 3D reconstructions of the macroporosity in some mesocosms at the end of the incubation period (6 weeks). C0, C1, C2 and C3 refer to a series of soil containing different metal concentrations in ascending order. Colors are given for the 3D rendering: yellow in the foreground and blue in the background.

In addition, we showed that earthworm activity influenced some of the soil physical and chemical properties (increase in pH and macroporosity). Polluted soils, even at the highest metals concentrations (C3), were found to be strongly bioturbated. Both wide vertical burrows produced by anecic earthworms and narrower horizontal burrows produced by endogeic earthworms were observed. According to [Sizmur and Hodson \(2009\)](#), these burrows are preferential pathways for

plant roots, and may allow roots to colonize the soil more rapidly and deeply, which could potentially facilitate inorganic element uptake by plant roots as a consequence. Furthermore, anecic earthworms, such as *L. terrestris*, produce permanent vertical burrows and casts at the soil surface ([Farenhorst et al., 2000](#)). They usually line their burrows with cast material which increases metal leaching and favours contact with plants roots ([Sizmur and Hodson, 2009](#)). Earthworm

casting activity may also bring metals in casts from deeper soil up closer to plant roots. One hypothesis is that these processes increase the pool of pollutants available for plants.

Our results showed that earthworms mixed leaf litter with the polluted soil even at the highest metal concentration (C3). By doing this, they formed and stabilized aggregates and generated soil macroporosity, as previously reported by Nahmani et al. (2007). Dempsey et al. (2011) reported that earthworm activity (i.e. bioturbation) induced biogeochemical changes in soil resulting from earthworm consumption and processing of detrital C substrates. Earthworms influence SOM sequestration within soil aggregates which are completely reorganized after their passage through earthworm guts, i.e. they are partially digested (Hong et al., 2011). As previously highlighted by Görres et al. (2001), the physical structure of the soil is widely altered by earthworm activities. These changes affect microbial processes directly or indirectly (Hassink et al., 1993), and thus can modify metal bioavailability. Microbial biomass increases in earthworm casts and is stimulated by earthworm activities, such as the burial of organic material (Wen et al., 2006; Jusselme et al., 2013). Earthworms also decompose organic matter in various substrates available for microbial communities.

In this present study no significant changes to the total organic carbon content of the soil were observed. However, the earthworms buried straw and litter. As reported by Görres et al. (2001), even if the total organic carbon content did not change with earthworm activities during these relatively short-term experiments; the

nature of the soil organic matter certainly evolved. Indeed, Guggenberger et al. (1996) reported that higher concentrations of carbohydrates and lignin and lower proportions of Csubstituted aromatic C and COOH (humic substances) are generally observed in whole casts compared to the unfractionated surrounding soil.

In our experiments, earthworms significantly increased soil pH (Table 3). Several authors previously reported that pH was higher in surface mineral soils with earthworms compared to control pots without earthworms (Haimi and Huhta, 1990; Tiunov and Scheu, 1999; Rätty, 2004; Dempsey et al., 2011). This increase in pH can both reduce metal solubility (formation of solid metal oxides and carbonates) and increase the dissolved organic matter in the soil solution with possible formation of metal complexes (Viventsova Ruth et al., 2005; Quenea et al., 2009). Earthworm activities can increase the fraction of metal linked to organic matter (Jongmans et al., 2003) and as reported by Hernandez-Soriano and Jimenez-Lopez (2012), metal mobility, especially for Cd, Cu and Zn, can be increased when large amounts of dissolved organic matter is present.

Chemical (CaCl₂ and EDTA) soil extraction failed to demonstrate that the solubility of the metals was modified under the influence of earthworm activities (Table 3). This could be partly explained by the pH increase and suggests that the observed influence of bioturbation on metal phytoavailability was mainly linked to the increase in macroporosity, which modified in turn the transport of pollutants together with organic matter in the vicinity of the roots.

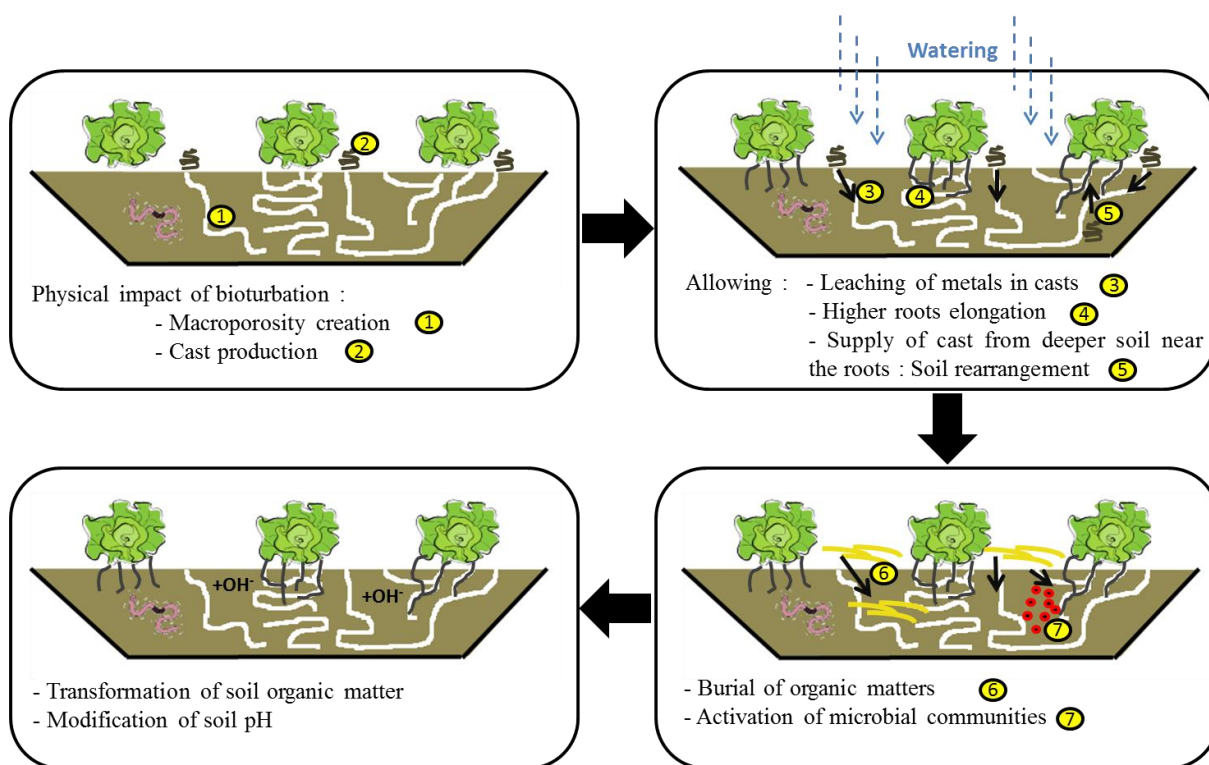


Figure 6

Proposed mechanisms to explain the increase of metals phytoavailability in relation with earthworms' activities.

Previous studies by [Sizmur and Hodson \(2009\)](#) and [Feng et al. \(2005\)](#) working on metal uptake by wheat also underlined that chemical extractions cannot realistically assess metal bioavailability. By changing soil micro and macrostructure, earthworms could modify the fraction of pollutants available for plants and enhance microbial processes, without a direct correlation with metal increases in the soil solution.

Finally, on the basis of the set of results acquired in the present study, the most relevant mechanisms are summarized in [Fig. 6](#); the physical impact of bioturbation appears to be the principle mechanism involved in the increase of metal phytoavailability.

4.1.5 Conclusions and perspectives

The aim of this study was to investigate the influence of earthworm activity on the phytoavailability of metals from process particles and highlight the mechanisms involved in polluted soil/plant- earthworm systems. We found that the presence of earthworms resulted in significant increases in metals in plant shoots. In addition, the earthworm activities, which created soil macroporosity and produced casts near the plant roots, potentially influenced metal bioaccessibility. The standard chemical extraction methods currently used to simulate metal phytoavailability correlated poorly with the measured concentrations in plant shoots and the pH was significantly increased by earthworm activities. We therefore concluded that the observed increase in metal phytoavailability was mainly due to the increase in soil

macroporosity and metal bioaccessibility for roots. This phenomenon could have health consequences in terms of human

exposure when vegetables grown in polluted soils are consumed.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the INSU-EC2CO program, the French Agency of the Environment and Energy (ADEME) as well as the Chemical Metal Treatments Company (STCM) for their technical help and their financial support. This work was supported by the National Research Agency under reference ANR-12-0011-VBDU and from ADEME, France.

References

- Bieri M., 1992. Guidelines for the Daniel funnel test - a laboratory test to measure side effects of pesticides on the earthworm *Lumbricus terrestris* L. IOBC WPRS Bull XV/3: 139-144 24
- Capowiez, Y., Sammartino, S., Michel, E., 2011. Using X-ray tomography to quantify earthworm bioturbation non-destructively in repacked soil cores. *Geoderma* 162, 124–131.
- Cecchi, M., Dumat, C., Alric, A., Felix-Faure, B., Pradere, P., Guisresse, M., 2008. Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Geoderma* 144, 287–298.
- Chenot, E., Schwartz, C., Dumat, C., Douay, F., 2013. "Vegetable Gardens: unknown lands? EDP Sciences / ADEME. ISBN : 978-2-7598-0723-9. 176 pages.
- Dempsey, M.A., Fisk, M.C., Fahey, T.J., 2011. Earthworms increase the ratio of bacteria to fungi in northern hardwood forest soils, primarily by eliminating the organic horizon. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2135–2141.
- Dittbrenner, N., Moser, I., Triebkorn, R., Capowiez, Y., 2011. Assessment of short and long-term effects of imidacloprid on the burrowing behaviour of two earthworm species (*Aporrectodea caliginosa* and *Lumbricus terrestris*) by using 2D and 3D post-exposure techniques. *Chemosphere* 84, 1349–1355.
- Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S., Benedetti, M.F., 2006. Study of the trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soils. *Environmental Pollution* 142, 521–529.
- Dumat, C., Larbaigt, J., Leveque, T., Foucault, Y., Xiong, T., Alletto, L., Barbaste, M., Sejalon, N., Gaillard, I., 2013. Environmental and sanitary risk assessment and management in associative gardens: vegetable quality in relation with practices and context. International Conference Environmental Geochemistry and Health, 2013, Toulouse.

- Eijsackers, H., 2001. A future for soil ecology? Connecting the system levels: moving from genomes to ecosystems: Opening Lecture to the XIII ICSZ –Biodiversity of soil organisms and ecosystem functioning”. *European Journal of Soil Biology* 37, 213–220.
- Farenhorst, A., Topp, E., Bowman, B., Tomlin, A., 2000. Earthworm burrowing and feeding activity and the potential for atrazine transport by preferential flow. *Soil Biology and Biochemistry* 32, 479–488.
- Feng, M.-H., Shan, X.-Q., Zhang, S.-Z., Wen, B., 2005. Comparison of a rhizosphere-based method with other one-step extraction methods for assessing the bioavailability of soil metals to wheat. *Chemosphere* 59, 939–949.
- Foucault, Y., Durand, M.-J., Tack, K., Schreck, E., Geret, F., Leveque, T., Pradere, P., Goix, S., Dumat, C., 2013a. Use of ecotoxicity test and ecoscores to improve the management of polluted soils: case of a secondary lead smelter plant. *Journal of Hazardous Materials* 246–247, 291–299.
- Foucault, Y., Lévêque, T., Xiong, T., Schreck, E., Austruy, A., Shahid, M., Dumat, C. 2013b. Green manure plants for remediation of soils polluted by metals and metalloids: Ecotoxicity and human bioavailability assessment. *Chemosphere*.
- Görres, J.H., Savin, M.C., Amador, J.A., 2001. Soil micropore structure and carbon mineralization in burrows and casts of an anecic earthworm (*Lumbricus terrestris*). *Soil Biology and Biochemistry* 33, 1881–1887.
- Guggenberger, G., Thomas, R.J., Zech, W., 1996. Soil organic matter within earthworm casts of an anecic-endogeic tropical pasture community, Colombia. *Applied Soil Ecology* 3, 263–274.
- Haimi, J., Huhta, V., 1990. Effect of earthworms on decomposition processes in raw humus forest soil: A microcosm study. *Biology and Fertility of Soils* 10, 178–183.
- Hassink, J., Bouwman, L.A., Zwart, K.B., Brussaard, L., 1993. Relationships between habitable pore space, soil biota and mineralization rates in grassland soils. *Soil Biology and Biochemistry* 25, 47–55.
- Hedde, M., Van Oort, F., Lamy, I., 2012. Functional traits of soil invertebrates as indicators for exposure to soil disturbance. *Environmental Pollution* 164, 59–65.
- Hernandez-Soriano, M.C., Jimenez-Lopez, J.C., 2012. Effects of soil water content and organic matter addition on the speciation and bioavailability of heavy metals. *Science of The Total Environment* 423, 55–61.
- Hobbelen, P.H.F., Koolhaas, J.E., Van Gestel, C.A.M., 2006. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Aporrectodea caliginosa* in relation to total and available metal concentrations in field soils. *Environmental Pollution* 144, 639–646.
- Hong, H.N., Rumpel, C., Henry des Tureaux, T., Bardoux, G., Billou, D., Tran Duc, T., Jouquet, P., 2011. How do earthworms influence organic matter quantity and quality in tropical soils? *Soil Biology and Biochemistry* 43, 223–230.
- Houba, V.J.G., Lexmond, T.M., Novozamsky, I., Van der Lee, J.J., 1996. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Science of The Total Environment* 178, 21–28.

- Jégou, D., Cluzeau, D., Hallaire, V., Balesdent, J., Tréhen, P., 2000. Burrowing activity of the earthworms *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea giardi* and consequences on C transfers in soil. *European Journal of Soil Biology* 36, 27–34.
- Jongmans, A., Pulleman, M., Balabane, M., Van Oort, F., Marinissen, J.C., 2003. Soil structure and characteristics of organic matter in two orchards differing in earthworm activity. *Applied Soil Ecology* 24, 219–232.
- Jouquet, P., Dauber, J., Lagerlöf, J., Lavelle, P., Lepage, M., 2006. Soil invertebrates as ecosystem engineers: Intended and accidental effects on soil and feedback loops. *Applied Soil Ecology* 32, 153–164.
- Jusselme, M.D., Miambi, E., Mora, P., Diouf, M., Rouland-Lefèvre, C., 2013. Increased lead availability and enzyme activities in root-adhering soil of *Lantana camara* during phytoextraction in the presence of earthworms. *Science of The Total Environment* 445–446, 101–109.
- Lee, K.E., others, 1985. *Earthworms: their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press Inc.
- Lee, W., An, Y., Yoon, H. 2008. Toxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrials plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum awstivum*): plant uptake for water insoluble nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(9), 1915–1921.
- Leveque, T., Capowiez, Y., Schreck, E., Mazzia, C., Auffan, M., Foucault, Y., Austruy, A., Dumat, C., 2013. Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species (*Eiseina hortensis* and *Lumbricus terrestris*). *Environmental Pollution* 179, 232–241.
- Li, L.-Z., Zhou, D.-M., Peijnenburg, W.J.G.M., Wang, P., Van Gestel, C.A.M., Jin, S.-Y., Wang, Q.-Y., 2010. Uptake pathways and toxicity of Cd and Zn in the earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry* 42, 1045–1050.
- Maleri, R.A., Reinecke, A.J., Reinecke, S.A., 2008. Metal uptake of two ecophysiologicaly different earthworms (*Eisenia fetida* and *Aporrectodea caliginosa*) exposed to ultramafic soils. *Applied Soil Ecology* 38, 42–50.
- Mansour, S.A., Belal, M.H., Abou-Arab, A.A.K., Ashour, H.M., Gad, M.F., 2009. Evaluation of some pollutant levels in conventionally and organically farmed potato tubers and their risks to human health. *Food and Chemical Toxicology* 47, 615–624.
- Menzies, N.W., Donn, M.J., Kopittke, P.M., 2007. Evaluation of extractants for estimation of the phytoavailable trace metals in soils. *Environmental Pollution* 145, 121–130.
- Morgan, J.E., Morgan, A.J., 1993. Seasonal changes in the tissue-metal (Cd, Zn and Pb) concentrations in two ecophysiologicaly dissimilar earthworm species: pollution-monitoring implications. *Environmental Pollution* 82, 1–7.
- Morgan, J.E., Morgan, A.J., 1998. The distribution and intracellular compartmentation of metals in the endogeic earthworm *Aporrectodea caliginosa* sampled from an unpolluted and a metal-contaminated site. *Environmental Pollution* 99, 167–175.
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S., 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution* 145, 402–424.
- Nair, R., Varghese, S.H., Nair, B.G., Maekawa, T., Yoshida, Y., Kumar, D.S., 2010. Nanoparticulate material delivery to plants. *Plant Science* 179, 154–163.

- Nannoni, F., Protano, G., Riccobono, F., 2011. Uptake and bioaccumulation of heavy elements by two earthworm species from a smelter contaminated area in northern Kosovo. *Soil Biology and Biochemistry* 43, 2359–2367.
- Newhook, R., Hirtle, H., Byrne, K., Meek, M.E., 2003. Releases from copper smelters and refineries and zinc plants in Canada: human health exposure and risk characterization. *Science of The Total Environment* 301, 23–41.
- Pelfrêne, A., Waterlot, C., Mazzuca, M., Nisse, C., Cuny, D., Richard, A., Denys, S., Heyman, C., Roussel, H., Bidar, G., Douay, F., 2012. Bioaccessibility of trace elements as affected by soil parameters in smelter-contaminated agricultural soils: A statistical modeling approach. *Environmental Pollution* 160, 130–138.
- Pierret, A., Capowiez, Y., Belzunces, L., Moran, C., 2002. 3D reconstruction and quantification of macropores using X-ray computed tomography and image analysis. *Geoderma* 106, 247–271.
- Polichetti, G., Cocco, S., Spinali, A., Trimarco, V., Nunziata, A., 2009. Effects of particulate matter (PM10, PM2.5 and PM1) on the cardiovascular system. *Toxicology* 261, 1–8.
- Quenea, K., Lamy, I., Winterton, P., Bermond, A., Dumat, C., 2009. Interactions between metals and soil organic matter in various particle size fractions of soil contaminated with waste water. *Geoderma* 149, 217–223.
- Räty, M., 2004. Growth of *Lumbricus terrestris* and *Aporrectodea caliginosa* in an acid forest soil, and their effects on enchytraeid populations and soil properties. *Pedobiologia* 48, 321–328.
- Ruiz, E., Alonso-Azcárate, J., Rodríguez, L., 2011. *Lumbricus terrestris* L. activity increases the availability of metals and their accumulation in maize and barley. *Environmental Pollution* 159, 722–728.
- Ruiz, E., Rodríguez, L., Alonso-Azcárate, J., 2009. Effects of earthworms on metal uptake of heavy metals from polluted mine soils by different crop plants. *Chemosphere* 75, 1035–1041.
- Schreck, E., Foucault, Y., Geret, F., Pradere, P., Dumat, C., 2011. Influence of soil ageing on bioavailability and ecotoxicity of lead carried by process waste metallic ultrafine particles. *Chemosphere* 85, 1555–1562.
- Schreck, E., Laplanche, C., Le Guédard, M., Bessoule, J.-J., Austruy, A., Xiong, T., Foucault, Y., Dumat, C., 2013. Influence of fine process particles enriched with metals and metalloids on *Lactuca sativa* L. leaf fatty acid composition following air and/or soil-plant field exposure. *Environmental Pollution* 179, 242–249.
- Shahid, M., Xiong, T., Castrec-Rouelle, M., Leveque, T., Dumat, C., 2013a. Water extraction kinetics of metals, arsenic and dissolved organic carbon from industrial contaminated poplar leaves. *J Environ Sci.* doi 10, 60197–1.
- Shahid, M., Xiong, T., Masood, N., Leveque, T., Quenea, K., Austruy, A., Foucault, Y., Dumat, C., 2013b. Influence of plant species and phosphorus amendments on metal speciation and bioavailability in a smelter impacted soil: a case study of food-chain contamination. *Journal of Soils and Sediments*.
- Sizmur, T., Hodson, M.E., 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? – A review. *Environmental Pollution* 157, 1981–1989.

- Sizmur, T., Palumbo-Roe, B., Watts, M.J., Hodson, M.E., 2011. Impact of the earthworm *Lumbricus terrestris* (L.) on As, Cu, Pb and Zn mobility and speciation in contaminated soils. *Environmental Pollution* 159, 742–748.
- Stampoulis, D., Sinha, S.K., White, J.C. (2009). Assay-dependent phytotoxicity of nanoparticles to plants. *Environmental Science & Technology*, 43(24), 9473-9479.
- Szolnoki, Z., Farsang, A., Puskás, I., 2013. Cumulative impacts of human activities on urban garden soils: Origin and accumulation of metals. *Environmental Pollution* 177, 106–115.
- Tiunov, A.V., Scheu, S., 1999. Microbial respiration, biomass, biovolume and nutrient status in burrow walls of *Lumbricus terrestris*, L.(Lumbricidae). *Soil Biology and Biochemistry* 31, 2039–2048.
- Uzu, G., Sobanska, S., Aliouane, Y., Pradere, P., Dumat, C., 2009. Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. *Environmental Pollution* 157, 1178–1185.
- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Munoz, M., Dumat, C., 2010. Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts. *environmental science & technology* 44, 1036–1042.
- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Sauvain, J.J., Pradère, P., Dumat, C., 2011. Characterization of lead-recycling facility emissions at various workplaces: Major insights for sanitary risks assessment. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1018–1027.
- Van Hees, P.A.W., Elgh-Dalgren, K., Engwall, M., Von Kronhelm, T., 2008. Re-cycling of remediated soil in Sweden: An environmental advantage? *Resources, Conservation and Recycling* 52, 1349–1361.
- Viventsova Ruth, E., Kumpiene, J., Gunneriusson, L., Holmgren, A., 2005. Changes in soil organic matter composition and quantity with distance to a nickel smelter — a case study on the Kola Peninsula, NW Russia. *Geoderma* 127, 216–226.
- Vorenhout, M., Van Straalen, N.M., Eijsackers, H.J.P., 2000. Assessment of the purifying function of ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2161–2163.
- Wear, J.I. and C.E. Evans. 1968. Relationship of zinc uptake by corn and sorghum to soil zinc measured by three extractants. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*32:543-546.
- Wen, B., Liu, Y., Hu, X., Shan, X., 2006. Effect of earthworms (*Eisenia fetida*) on the fractionation and bioavailability of rare earth elements in nine Chinese soils. *Chemosphere* 63, 1179–1186.
- Wong, C.S.C., Li, X., Thornton, I., 2006. Urban environmental geochemistry of trace metals. *Environmental Pollution* 142, 1–16.

4.2. Influence de la bioturbation des vers de terre sur la phytodisponibilité des ETM : RHIZOtest®.

Avant-propos

Il a été vu précédemment que la bioturbation des vers de terre pouvait influencer la phytodisponibilité des ETM. Ainsi l'impact physique du ver de terre sur le sol, tel que la création de macroporosité, le déplacement des ETM le long du profil, le dépôt de turricules proche des racines et à l'embouchure des galeries etc., est susceptible de jouer un rôle important dans le processus de phytodisponibilité des ETM. Les extractions chimiques au CaCl_2 et à l'EDTA, supposées évaluer la disponibilité pour les plantes des ETM, se sont révélées peu pertinentes pour mettre en évidence des différences de phytodisponibilité. Ceci suggère que les changements de compartimentation et spéciation des ETM induits par la bioturbation des vers de terre étaient relativement faibles et moins impactant sur la phytodisponibilité que l'influence des vers sur la structure du sol. Afin de confirmer cette hypothèse, il a été décidé de tester la phytodisponibilité de différents types de sols sur la laitue (*Lactuca sativa capitata*) à l'aide du RHYZOtest® (décrit dans la section 2.3.2). Le sol étudié était le même que pour la section 4.1 et 3 conditions expérimentales ont été testées: le sol non bioturbé (sol sans contact avec le ver de terre), le sol bioturbé (sol hébergeant les vers de terre) et les turricules (déjections des vers de terre récupérés dans le sol bioturbé). Ce protocole expérimental permet d'évaluer l'influence du ver de terre sur la phytodisponibilité des ETM tout en excluant l'impact physique des vers de terre sur le sol. De plus cette étude nous informera sur la capacité du RHYZOtest® à évaluer la phytodisponibilité des ETM.

4.2.1 Matériel et méthodes

4.2.1.1 Echantillonnage des sols et préparation

Les sols ont été préparés exactement de la même façon que pour l'étude précédente (description section 4.1.2.1). Un gradient de quatre concentrations (C0, C1, C2 et C3) en ETM a ainsi été réalisé, C0 étant le sol non contaminé. Les sols ont ensuite été humidifiés entre 15 et 20 %, ce qui correspond à 65% de sa capacité de rétention, afin d'héberger les vers de terre dans de bonnes conditions..

4.2.1.2 Ver de terre

L'espèce de ver de terre choisie pour cette expérience a été *Lumbricus terrestris* précédemment décrit dans la section 2.2.1.2.1. Ce choix a été fait pour se rapprocher des conditions expérimentales de nos précédentes études (section 3.1 et 4.1). De plus, ce ver de terre a une importante production de turricules qui sont facilement récupérables dans une boîte de Pétri.

4.2.1.3 Protocole expérimental

Des petites boîtes en plastique (boîte de Pétri) ont été remplies avec 150 mg de sol tamisé à 2mm. L'objectif de ce protocole a été de créer 3 conditions expérimentales différentes, un sol non bioturbé noté SNB, un sol bioturbé noté SB et des turricules notés T. Le sol bioturbé SB est le sol dans lequel ont séjourné les vers mais dans lequel ne subsiste qu'une infime partie des turricules dans la mesure où ils ont été prélevés pour créer la condition T. Afin de satisfaire cet objectif, 1 *L. terrestris* a été inoculé par boîte de pétri comme montré sur la figure IV.2.1.

Ainsi, 12 boîtes de pétri contenant des vers de terre (3 répliques × 4 concentrations de sols) et 12 boîtes contenant uniquement les différentes concentrations de sols ont été placées dans une enceinte thermo-staée à 20 °C pendant 25 jours. Les turricules de *L. terrestris* ont été prélevés tous les 3 jours. De plus, au cours de cette récupération les sols sont pesés puis réhydratés en fonction de la masse perdue. Les SB sont régulièrement re-tamisés à 2 mm

pour garantir une bonne aération du sol et les rendre moins compactes et faciliter la nutrition des vers.

Parallèlement des microcultures de laitues (*Lactuca sativa capitata*) ont été réalisées. Le protocole utilisé est celui du RHYZOtest® (section 2.3.2) mis au point par Niebes et al., (1993). Ce protocole présente l'avantage de ne nécessiter qu'une faible quantité de sol (10g) pour cultiver les végétaux.

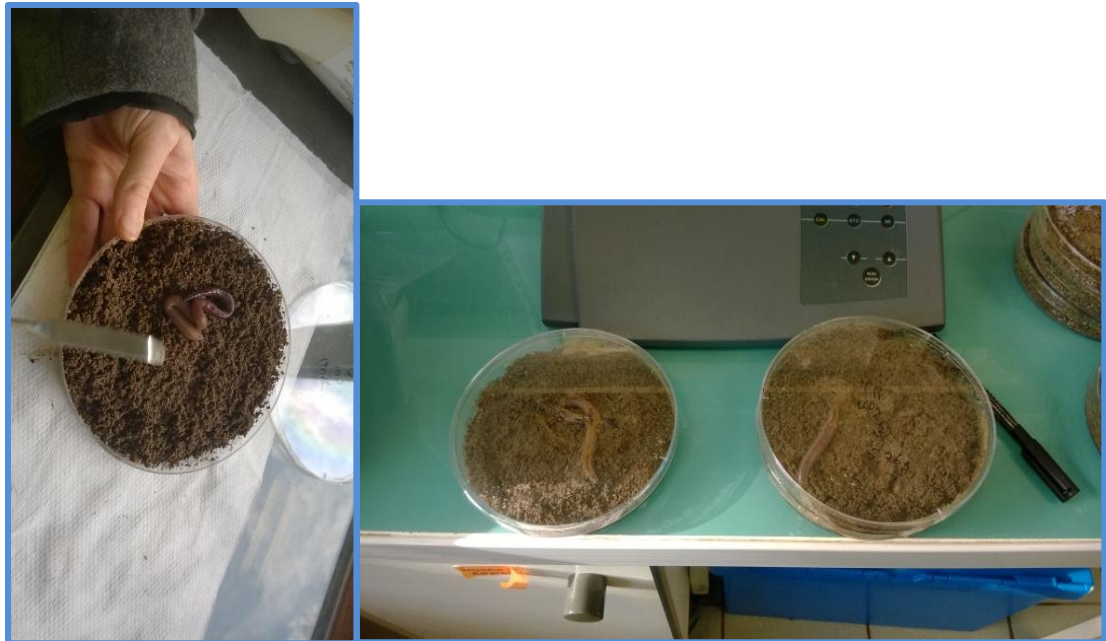


Figure IV.2.1 : Photographie des microcosmes abritant les vers de terre pour la condition SNB

La phase de germination dure 6 à 8 jours jusqu'à ce que les cotylédons apparaissent et commencent à adopter une teinte verte. En suite débute la phase de pré-culture, étape permettant d'atteindre une biomasse adéquate et un système racinaire relativement dense. Cette phase se déroule pendant 12 jours en phytotron avec une photopériode de 8 heures de nuit et 16 heures de jour pour des températures de 20 °C la nuit et 22°C le jour à une intensité lumineuse de 400 photons $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Les jeunes plantules issues de la germination sont déposées sur un dispositif de microcultures, c'est-à-dire un cylindre en PVC entourée à sa base par une maille de 30 μm en polyamide servant de support aux plantules. Trois plantules sont introduites dans chaque cylindre afin de conserver celle étant en meilleur état pour la phase d'exposition. Les dispositifs de microcultures sont déposés dans une plateforme flottante, elle-même introduite dans un bac contenant 6l de solution nutritive (Figure IV.2.2).

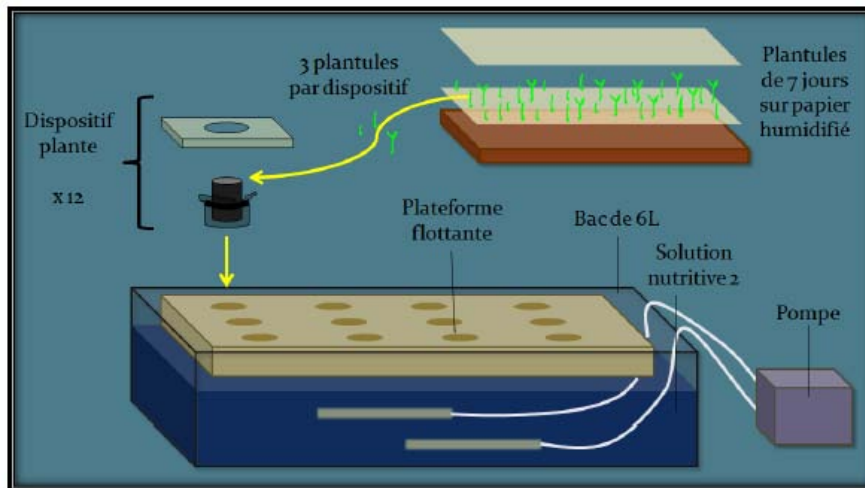


Figure IV.2.2. Représentation schématique du dispositif expérimental du Rhizotest (Lagier, 2014) au stade de mise en culture en hydroponie des plantules âgées de 7 jours.

La solution nutritive est renouvelée au 4^{ème} et 7^{ème} jour de la phase de pré-culture. Par ailleurs, à l'occasion des changements de solution, chaque dispositif de microculture est déplacé au sein de la plateforme flottante afin d'éviter un effet placette et aussi de garantir l'homogénéité des apports en solution pour chaque plantule. Les bacs sont aussi déplacés spatialement dans le phytotron pour éviter les problèmes d'hétérogénéité dus aux possibles variations d'intensité lumineuse et de température dans la pièce.

Des plantes témoins sont récoltées à la fin de la pré-culture afin de vérifier les concentrations en ETM avant la phase d'exposition.

Pour la phase d'exposition, 9,1g de sol tamisé à 2mm provenant des 3 différentes conditions expérimentales, SNB, SB et T sont déposés sur une plaque comme décrit sur la figure IV.2.3. Sont ainsi prévus 3 réplicas de microcultures pour chaque réplica de sol (3 réplicas de sol × 3 réplicas de microcultures = 9 réplicas totaux). Le cylindre accueillant la plantule est posé sur cette plaque et le tout sur un récipient contenant la solution nutritive et un papier filtre permettant d'alimenter les racines et le sol en solution nutritive par capillarité.

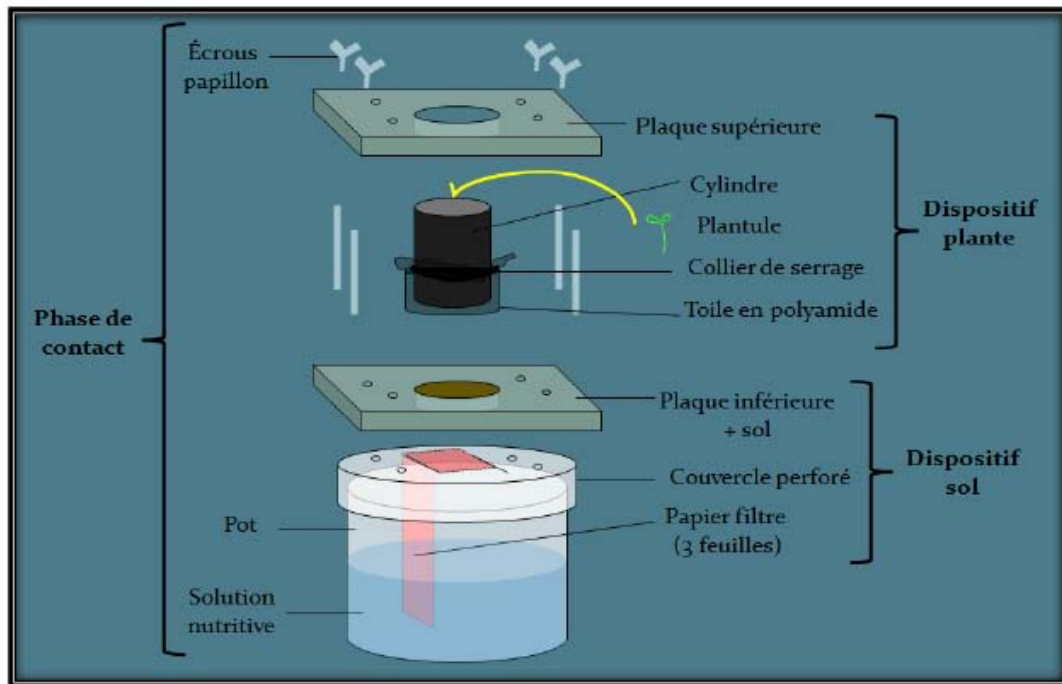


Figure IV.2.3. Représentation schématique du dispositif expérimental du Rhizotest à la phase de contact avec le sol (Lagier, 2014)

En résumé, un triplica de jeunes pousses de laitues est cultivé en hydroponie sur un triplica de 3 conditions différentes de sols, SNB (sol non bioturbé témoin), SB (sol hébergeant les vers de terre) et T (les turricules récupérés de SB). La figure IV.2.4 ci-dessous présente l'expérimentation en phase d'exposition en phytotron.

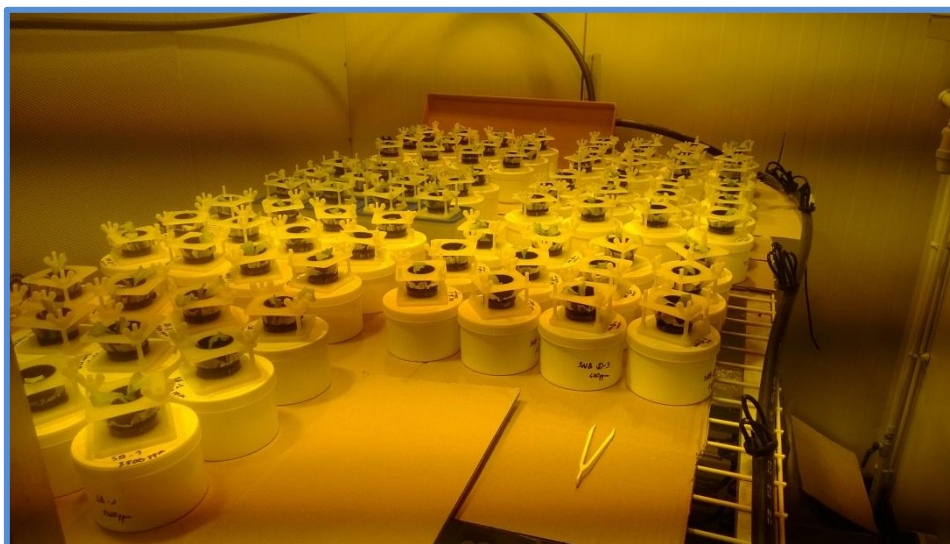


Figure IV.2.4 : Photographie de l'expérimentation Rhizo-test en phase d'exposition en phytotron.

4.2.2 Résultats et discussion

4.2.2.1 Concentrations en ETM dans les sols

Les concentrations en ETM dans les sols pour les différentes conditions, obtenues après minéralisation à l'eau régale puis détection en ICP-OES, sont présentées dans le tableau IV.2.1 suivant.

Tableau IV.2.1 : Concentrations \pm écart-types en ETM des sols (mg.kg^{-1}) pour chaque concentration d'exposition (C0, C1, C2 et C3) et chaque condition (SNB, SB et T).

	Sol	Pb	Cu	Cd	Zn
C0	SNB	20,4 \pm 0,3	13,1 \pm 0,0	0,11 \pm 0,02	72,5 \pm 1,2
	SB	(b) 33,6 \pm 9,0	13,2 \pm 0,1	(b) 0,15 \pm 0,03	(b) 105,6 \pm 2,1
	T	(b) 31,3 \pm 4,6	13,6 \pm 0,1	(b) 0,15 \pm 0,01	(b) 101,3 \pm 1,9
C1	SNB	755,9 \pm 18,4	18,4 \pm 0,4	1,39 \pm 0,03	94,4 \pm 1,2
	SB	818,3 \pm 38,5	18,1 \pm 0,2	1,40 \pm 0,04	(b) 144,8 \pm 6,3
	T	786,5 \pm 32,1	18,1 \pm 0,3	1,42 \pm 0,06	(b) 139,4 \pm 5,6
C2	SNB	2886,6 \pm 66,1	30,8 \pm 0,5	(b) 5,15 \pm 0,07	126,8 \pm 1,8
	SB	2902,2 \pm 108,5	30,9 \pm 0,5	4,99 \pm 0,09	(b) 187,6 \pm 4,8
	T	2963,0 \pm 83,3	30,4 \pm 0,5	4,99 \pm 0,13	(b) 176,5 \pm 4,5
C3	SNB	4383,2 \pm 72,2	39,1 \pm 0,7	7,50 \pm 0,11	147,7 \pm 2,5
	SB	4325,7 \pm 62,96	39,5 \pm 0,8	7,69 \pm 0,20	(b) 202,5 \pm 4,2
	T	4290,1 \pm 95,1	39,9 \pm 0,9	(b) 7,40 \pm 0,11	(b) 189,2 \pm 6,2

- (b) indique les différences significatives entre les séries expérimentales (SNB, SB et T)

Les concentrations en ETM dans les sols sont relativement proches de celle utilisées dans l'étude précédente (section 4.1 tableau 1) en utilisant le même protocole de dilution des sols. Il est observé principalement pour le Zn, une augmentation de sa concentration dans les sols pour les conditions SB et T par rapport à SNB, ce qui veut dire que les sols ayant hébergé les vers de terre et les turricules sont plus concentrés en Zn.

4.2.2.2 Survie des vers de terre et biomasse

Au cours de la période de bioturbation, aucune mortalité chez les vers de terre n'a été observée ni dans le sol non contaminé C0, ni dans les sols pollués C1 à C3. Cette observation

est en accord avec nos précédentes études (section 3.1 et 4.1) et montre que les conditions expérimentales étaient satisfaisantes pour leur survie.

La biomasse des vers de terre est significativement impactée ($p < 0.05$) par les concentrations en ETM dans les sols. En effet, il est observé une diminution de la biomasse initiale pour C2 et une diminution du gain de biomasse pour C3 par rapport au témoin C0 (Figure IV.2.5). Dans l'étude précédente (section 4.1 ; Lévêque et al., 2014), en mésocosmes, la biomasse de *L. terrestris* n'était pas impactée par les mêmes concentrations en ETM. En revanche dans l'étude en microcosmes de la section 3.1 (Lévêque et al., 2013), la biomasse était impactée à partir de 4000 mg Pb.kg⁻¹. Une hypothèse pour expliquer ces différences serait qu'en

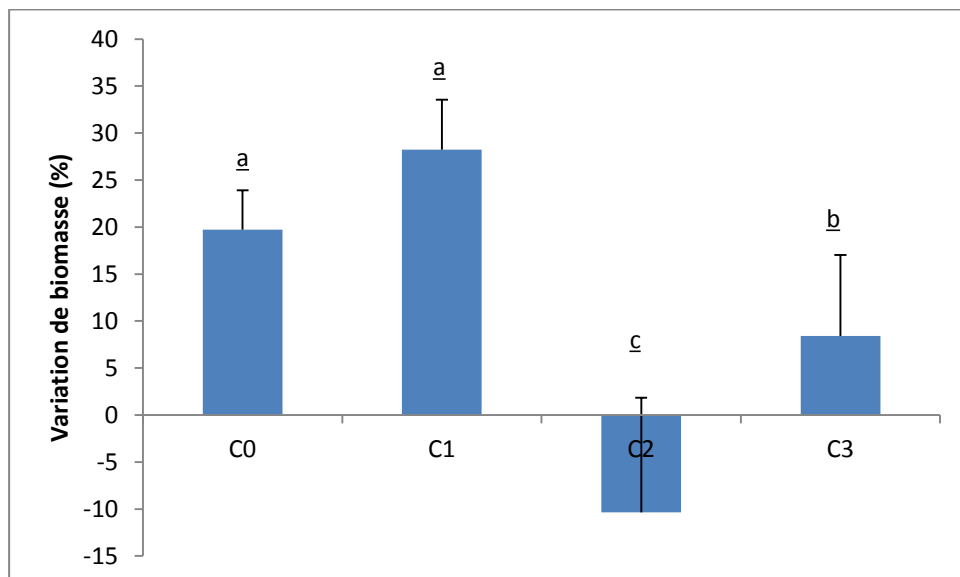


Figure IV.2.5 : Variation de biomasse en % de la masse initiale après 25 jours d'exposition des vers de terre en microcosmes à différentes concentrations de sols en ETM (C0, C1, C2, C3). Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0.05$, Tukey's HSD test)

mésocosmes, ce ver anécique a assez de place pour creuser des galeries permanentes dans le sols et ainsi limiter les échanges tégumentaires avec ce dernier. De plus, ses galeries lui permettent de se déplacer sans ingérer de sol contaminé et d'être ainsi moins exposé. Une autre hypothèse serait une résistance individuelle des vers de terre. En effet, dans les 2 expérimentations en microcosmes, aucune mortalité n'a été observée à ces concentrations, tandis que dans les mésocosmes une disparition/mortalité de 40% des vers a été observée après 6 semaines d'expérience. Ceci pourrait signifier que les vers ayant survécu sont plus tolérants et ainsi moins impactés par les ETM. La production de turricules dans la présente

expérience est restée importante pour toutes les concentrations de sols ce qui suggère une activité de bioturbation des vers de terre.

4.2.2.3 Evolution de la biomasse des laitues

Aucune mortalité des plantes n'a été observée durant la phase d'exposition, ce qui atteste du caractère sub-létal des concentrations des sols en ETM pour la laitue.

La masse sèche moyenne des feuilles de laitues diminue lorsque la concentration d'exposition augmente (Figure IV.2.6) ce qui n'avait pas été observé dans la section 4.1 (Lévêque et al., 2014). Les résultats ont montré également une augmentation de la masse sèche pour les laitues cultivées sur SB comparé à celle cultivées sur SNB. Les turrucules (T) présentent des résultats intermédiaires. Néanmoins la grande variabilité de masse des échantillons ne permet pas de mettre en évidence de différence significative au risque de 5%.

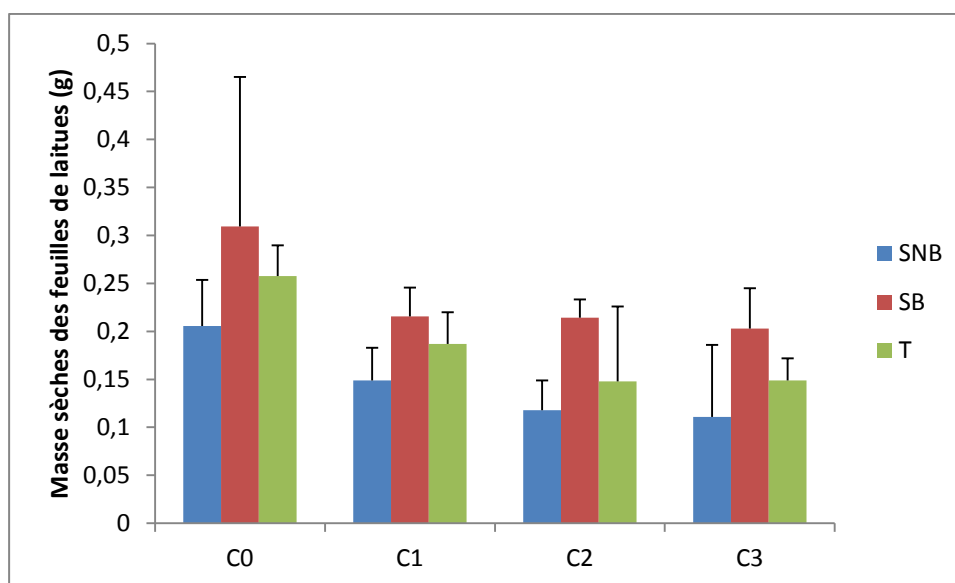


Figure IV.2.6 : Masses sèches des feuilles de laitues \pm écarts-types ($n=9$) (g) en fonction de la concentration (d'exposition (C0, C1, C2, C3) et des conditions expérimentales (SNB, SB et T.)

Cette tendance de l'effet des vers de terre sur la croissance des végétaux a été observée dans la section 4.1 (Lévêque et al., 2014), seulement à la concentration C3. Les résultats rapportés par différents chercheurs sur l'influence des vers sur la croissance végétale ne sont pas univoques (Scheu et al., 2003). Certaines études ont mis en évidence une augmentation de la croissance des végétaux avec les vers de terre (Jusselme et al., 2013), d'autres une diminution (Ruiz et al., 2010), et d'autres ne montrent pas d'effet (Eisenhauer et al., 2008).

Notre étude met en évidence une tendance vers l'augmentation de la croissance sous l'influence des vers de terre, mais ne permet pas d'en expliquer les mécanismes.

4.2.2.4 Concentration des ETM dans les feuilles de laitues

Les concentrations en ETM dans les feuilles de laitues après minéralisation (protocole section 4.1.4.2.1) et détection par ICP-MS sont présentées dans la figure IV.2.7 ci-dessous.

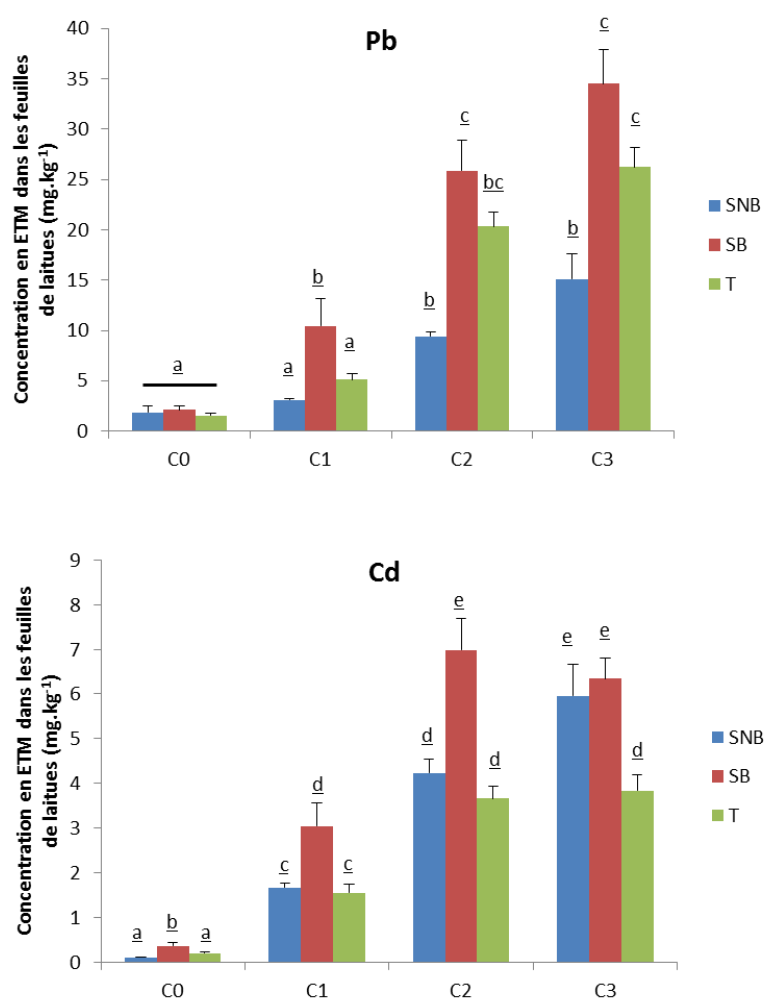


Figure IV.2.7 : Concentrations moyennes en ETM + erreurs standard (n=3) dans les feuilles de laitues en fonction de la concentration (C0, C1, C2, C3) et des conditions (SNB, SB, T). Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0.05$, Tukey's HSD test)

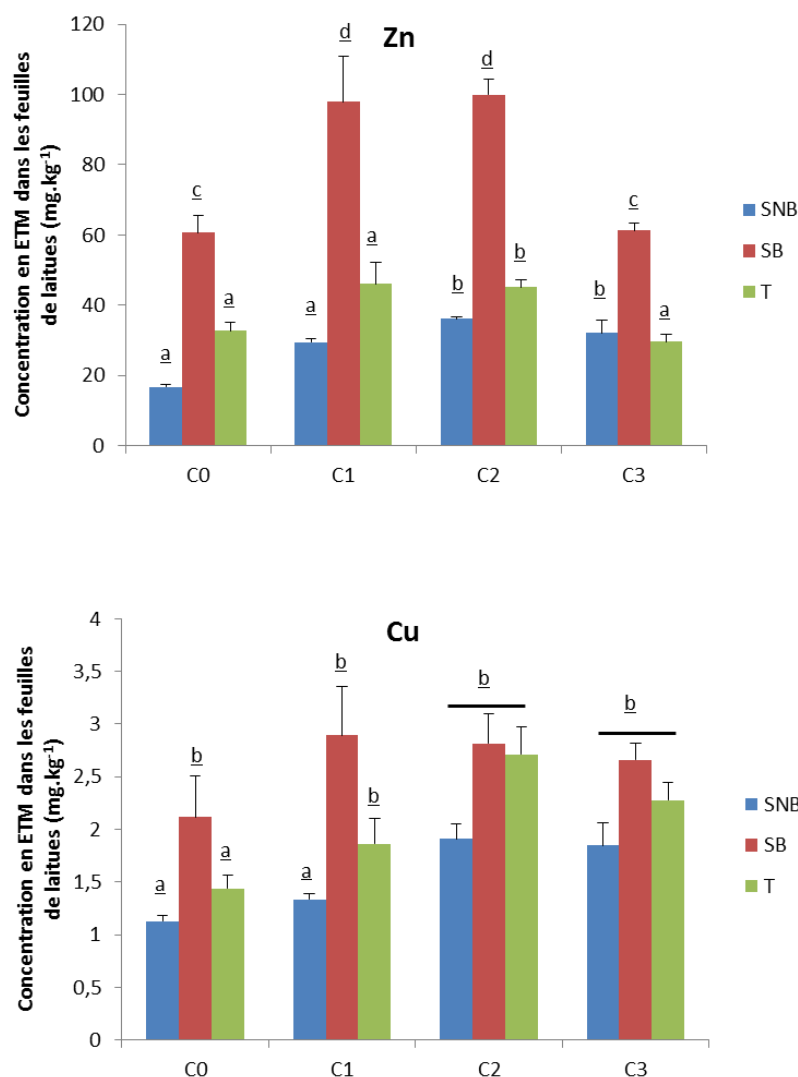


Fig IV.2.7. (Suite)

Certains ETM affichent des tendances comparables : les concentrations en Pb et Cd dans les feuilles augmentent quand leurs concentrations dans les sols augmentent. Ceci est confirmé par une analyse de régression avec des $R^2_{SNB} = 0,72$, $R^2_{SB} = 0,73$, $R^2_T = 0,88$ pour le Pb et $R^2_{SNB} = 0,83$, $R^2_{SB} = 0,62$, $R^2_T = 0,75$ pour le Cd ($p < 0,01$). Les concentrations en Cu et Zn dans les feuilles augmentent de C1 à C3 avant de diminuer à C4, mais cette augmentation n'est pas significative pour le Cu. L'analyse de régression indique que les concentrations en Cu et Zn dans les feuilles ne sont pas corrélées aux concentrations dans les sols ($R^2 < 0,39$, $p < 0,05$ pour toutes les conditions). Ces résultats sont concordants avec ceux de la section 4.1 (Lévêque et al., 2014), excepté pour le Zn qui présentait une corrélation positive entre les concentrations dans les feuilles et les sols. Le Zn et le Cu sont des éléments essentiels, nécessaires à la plante pour son cycle de développement, contrairement au plomb.

Ils sont utilisés comme activateurs ou composants de nombreuses enzymes. De ce fait, les plantes ont la capacité de réguler leurs concentrations.

Les valeurs de concentrations des ETM dans les feuilles de laitues sont significativement augmentées sous l'influence de la bioturbation du ver de terre. En effet, il est observé une augmentation significative des concentrations dans les laitues cultivées sur SB comparé à celle cultivé sur SNB, excepté pour le Cu aux concentrations C2 et C3 et pour le Cd à C4. Les laitues cultivées sur les turricules (T) présentent des résultats intermédiaires entre SNB et SB. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans la section 4.1 (Lévêque et al., 2014), mais relativement plus marqués, surtout pour les éléments essentiels, le Zn et le Cu aux concentrations plus faibles C0 et C1. Dans la section 4.1, les extractions chimiques (CaCl₂ et EDTA) n'ont pas mis en évidence de différence de compartimentation des ETM sous l'influence de la bioturbation des vers de terre. L'impact physique de la bioturbation des vers de terre avait donc été considéré comme prépondérant dans l'augmentation de la phytodisponibilité des ETM. Dans la présente étude, une fine couche de sol (6mm) ne prend pas en considération l'impact physique du ver de terre sur le sol. Il paraît donc évident que d'autres mécanismes sont également mis en œuvre.

Bien que les extractions chimiques ne l'ont pas mis en évidence, *L. terrestris* pourrait augmenter la mobilité des ETM. Les résultats issus de la littérature sont d'ailleurs contradictoires. Sizmur et al., (2011) ont décrit une augmentation de la fraction des ETM extractibles à l'eau dans les turricules des *L. terrestris* comparée aux sols sans vers. Mais, Ruiz et al., (2010), quant à eux, n'ont pas observé de modification dans cette fraction, ni dans les fractions échangeables après extraction séquentielles (BCR) dans les sols ayant subi la bioturbation de *L. terrestris*. Mais ces deux auteurs rapportent une augmentation des concentrations en Pb et en Zn extraites de la fraction oxydable des sols influencés par le ver de terre. Cette augmentation de la fraction d'ETM liée à la matière organique (fraction oxydable) peut être en partie responsable de l'augmentation de phytodisponibilité de ces ETM. En effet, il est connu que les ETM associés à la matière organique sont facilement assimilables par les plantes (complexe argilo-humique) car ces éléments organiques sont décomposés par les micro-organismes du sol. Cette décomposition induit un relargage des ETM dans la solution du sol (Cheng and Wong, 2002). De plus, une analyse de l'eau interstitielle des sols bioturbés (équivalents de notre SB) et des sols sans vers réalisée par Sizmur et al., (2011) a montré qu'il y avait des différences de spéciation du Pb, Cu et Zn dans ces solutions dues à la bioturbation des vers. Il a été observé une augmentation des ions libres Pb²⁺ et Zn²⁺ dans les eaux interstitielles des sols bioturbés comparée à celles de sols sans vers,

pour 2 des sols miniers étudiés. Cependant, un autre sol étudié a montré l'effet inverse avec une augmentation des ETM liés au carbone organique et une diminution des ions libres. Les 2 premiers sols avaient subi une diminution de leur pH sous l'action des vers alors que pour le dernier sol, une augmentation c'était produite. Dans la section 4.1 (Lévêque et al., 2014), il avait été mis en évidence une augmentation du pH des sols sous l'action des vers. Il peut donc être considéré une augmentation des ETM liés au carbone organique soluble dans les eaux interstitielles. Or, les ions libres et les ETM liés au carbone soluble sont facilement disponibles pour les plantes (Quenea et al., 2009).

Dans la présente étude, le fait que la phytodisponibilité soit plus élevée dans SB que dans les turricules (T) est un résultat original. En effet, dans la littérature, les auteurs qui ont décrit une augmentation de la mobilité des ETM sous l'action des vers de terre (Kizilkaya, 2004 ; Sizmur et al., 2011 ; Udovic et al., 2007) ont systématiquement observé un effet plus important dans les turricules que dans le sol bioturbé. Pour rappel, SB est le sol dans lequel ont séjourné les vers, mais dans lequel il ne reste qu'une petite partie des turricules, dans la mesure où ils ont été prélevés pour créer la condition T. Ceci suggère que le passage du sol à travers le système digestif du ver n'est pas la seule cause de l'augmentation de phytodisponibilité des ETM. En effet, *L. terrestris* tapisse ses galeries de mucus qui forme une paroi de quelques millimètres d'épaisseur enrichie en micro-organismes qui vont augmenter la lixiviation des ETM (Sizmur and Hodson, 2009) : drilosphère. L'activité microbienne peut faciliter la désorption des ETM comme le Pb et leur solubilisation dans le sol, via l'interaction avec des acides citrique, malique ou oxalique (Cecchi et al., 2008). Jusselme et al., (2013) rapporte que le ver de terre, dans sa zone d'impact d'influence appelée drilosphère, augmente le taux de microorganisme ainsi que la biomasse microbienne. Ceci peut être dû à l'apport de nutriments biodisponibles par le mucus du ver de terre. De plus, les téguments du ver constituent une interface d'échange importante avec le sol. Ainsi, le ver de terre élimine les ETM (surtout le Zn) sous forme d'ions libres par ses néphridies et à travers son tégument. Ce qui a pour conséquence d'augmenter le pool de polluants et nutriments disponibles. Dans la présente étude, *L. terrestris*, qui pèse et mesure en moyenne 4.5g et 9-10 cm a séjourné dans une boîte de pétri de 15cm de diamètre avec 150g de sol. Pendant 25 jours d'exposition dans un microcosme aussi exigu, le contact entre le ver de terre et le sol a été très important. Ce qui peut expliquer l'augmentation importante de phytodisponibilité dans SB et cette différence observée entre les turricules et le sol bioturbé, encore non reporté dans la littérature.

Les concentrations en Pb et Zn dans les feuilles de laitues déterminées par le RHYZOtest® sont très proches de celles obtenues dans la section 4.1 en mésocosmes. En revanche, elles sont sous évaluées pour le Cd et le Cu. Mais contrairement aux extractions chimiques étant susceptibles d'évaluer la phytodisponibilité, le RHYZOtest® est capable de détecter des changements induits par les organismes vivants du sol. Ce qui en fait un test pertinent pour les évaluations des transferts concernant les sols pollués aux ETM et donc des risques environnementaux.

4.2.3 Conclusions et perspectives

Cette étude avait pour but d'évaluer l'influence de la bioturbation des vers de terre sur la phytodisponibilité des ETM. Il a été observé que la présence de vers augmentait significativement l'assimilation des ETM dans les feuilles d'une plante potagère, la laitue. Ce phénomène est régi par des mécanismes nombreux et complexes qui sont difficilement discutables individuellement. Il est dû à un ensemble de facteurs interagissant les uns avec les autres. Le passage du sol dans le système digestif du ver de terre n'est pas la seule cause de l'augmentation de biodisponibilité des ETM. Le pH modifiant la mobilité et la spéciation des ETM, l'activité microbiologique, les changements de la structure du sol, l'activité de bioturbation du ver en général sont autant de paramètres responsables des modifications de phytodisponibilité des ETM sans que l'on puisse en pointer un du doigt.

Les résultats obtenus avec le RHYZOtest® ont été comparés avec ceux d'une expérimentation en mésocosmes. Cette comparaison a montré que ce test a la capacité de prendre en considération l'influence biotique (ici, vers de terre et micro-organismes) du sol. Ce qui en fait un test pertinent et peu coûteux pour les évaluations des transferts et donc des risques concernant les sols pollués en ETM.

Afin d'affiner la compréhension des mécanismes, cette étude sera accompagnée d'une caractérisation de la matière organique du sol et d'extractions chimiques (séquentielles BCR).

Par ailleurs, ces résultats, qui mettent en lumière la possible augmentation des transferts sol-plante de métaux sous l'action du vers de terre, suggèrent que le ver de terre peut participer à la refunctionalisation des sols. Par exemple, on peut imaginer de tester la phyto-extraction aidée par bioturbation dans le cadre de réhabilitation de friches industrielles.

Afin de confirmer cette théorie, une expérimentation (décrite ci-dessous), sur le site STCM de Bazoches les Gallerandes, est en cours.

Cette expérimentation implique une plante connue pour ses propriétés phyto-extractrices, la moutarde blanche (*Sinapis alba*), et deux espèces de vers de terre (*Lumbricus terrestris* et *Apporectodea caliginosa*).

Deux bacs de 1,5 m³ ont été remplis avec du sol récupéré à 80 m de l'usine (Figure IV.2.8). Le sol à cette distance de l'usine est contaminé à hauteur de 1680 mg de Pb par kg de sol.



Figure IV.2.8: Photographies des bacs de sols sur la parcelle polluée STCM Bazoches

Dans les deux bacs, une centaine de graines de moutardes ont été semées. Seul le bac N°1 a été inséminé avec des vers de terre afin de pouvoir comparer les concentrations en métal(loïde)s dans les plantes et dans le sol entre les deux différentes conditions, et ainsi étudier l'influence des vers de terre sur la phyto-extraction des ETM par la moutarde. Le bac N°1 a été inséminé avec 100 *L. terrestris* et 250 *A. caliginosa* (Figure IV.2.9).



Figure IV.2.9 : Insémination du bac N°1 avec *L. terrestris* et *A. caliginosa*.

Les résultats de cette expérimentation sont en cours d'acquisition.

Chapitre 5

Effets des métaux sur la santé humaine et évaluation des risques sanitaires

L'évaluation quantitative des risques sanitaires, concernant l'ingestion de sols ou végétaux contaminés en ETM, repose sur les concentrations totales dans une matrice polluée. Cette méthode ne prend pas en compte les différences de biodisponibilité des ETM dans les différentes matrices étudiées. De nombreuses études ont déjà montré que les concentrations biodisponibles d'un élément sont plus faibles que les concentrations totales contenues dans la matrice contaminée ingérée. Ainsi, négliger les différences de biodisponibilité d'un élément dans une matrice revient à surestimer les risques associés à l'ingestion de végétaux ou de sols contaminés. Il est donc nécessaire de prendre en considération la biodisponibilité afin d'améliorer les calculs de risques et d'évaluer de façon plus pertinente le niveau d'exposition des populations humaines. Afin d'estimer la biodisponibilité, la bioaccessibilité gastro-intestinale d'un élément (qui est la fraction d'un composé ingéré extraite de sa matrice par les fluides gastro-intestinaux) est mesurée.

5.1. Quels sont les différents paramètres influençant la bioaccessibilité des ETM ?

La première partie de ce chapitre se focalise sur l'étude de la bioaccessibilité des ETM dans les sols et végétaux contaminés. Les différents paramètres pouvant influencer la bioaccessibilité des ETM dans une matrice et sur différents sites contaminés seront étudiés. Ce chapitre débute par une rapide description des matériels et méthodes utilisés puis les résultats et leur discussion suivent. Il est divisé en sous-parties traitant les différents paramètres étudiés. Il a été décidé d'ajouter des parties matériel et méthodes afin de faciliter la lecture et d'insister sur les objectifs de chaque étude.

5.1.1 Les paramètres physico-chimiques du sol

Dans cette section, il est étudié l'influence des paramètres physico-chimiques du sol sur la bioaccessibilité gastro-intestinale des ETM.

5.1.1.1 Matériel et Méthodes

Deux sites, précédemment décrit dans la section 2.1, ont été choisis pour cette étude : La STCM de Toulouse et une parcelle attenante au site de fusion-réduction de la STCM de Bazoches les Gallerandes.

5.1.1.1.1 La STCM de Toulouse, échantillonnage

Pour cette étude, onze sols ont été prélevés. Sept dans l'enceinte de la STCM et quatre dans des jardins riverains à celle-ci. Le plan d'échantillonnage des sols collectés dans l'enceinte de la STCM est présenté par la figure ci-dessous (Fig V.1.1).

Les échantillons de sols ont été collectés entre 0 et 25 cm et mis à sécher à l'air libre pendant une semaine, puis quartés afin de disposer d'échantillons homogènes. Ils ont ensuite été broyés et tamisés à 2 mm et 250 μm . Ces sols ont ensuite été caractérisés, leur caractérisation impliquant des mesures de pH, CEC, teneur en matière organique et

carbonates, granulométrie et détermination des concentrations totales en Pb, Cd, Zn, Cu, As et Sb.

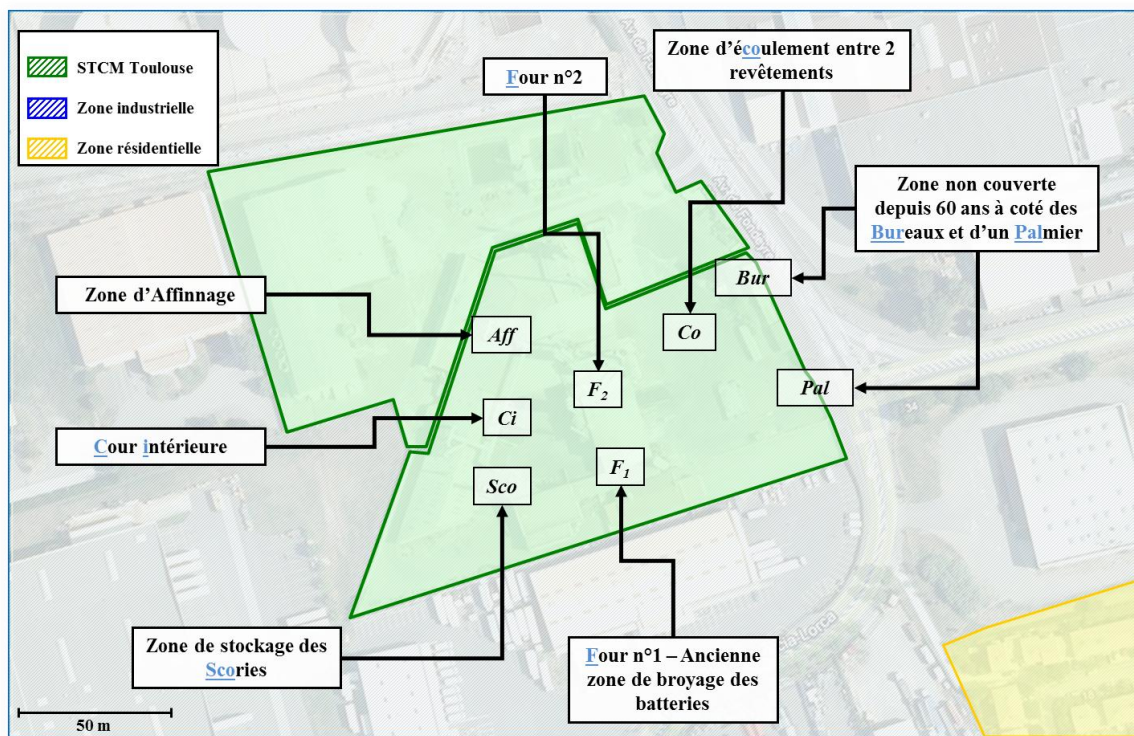


Figure Fig V.1.1 : Plan d'échantillonnage dans l'enceinte de la STCM Toulouse

5.1.1.1.2 La STCM de Bazoches les Gallerandes, échantillonnage

Le site d'étude et le plan d'échantillonnage sont respectivement décrits dans la section 2.1.1.3 et 2.2.2.1.

5.1.1.2 Résultats et discussion

5.1.1.2.1 Site d'étude STCM Toulouse

Les paramètres physico-chimiques et concentrations en Pb des sols prélevés dans l'enceinte de la STCM de Toulouse et dans les jardins riverains sont présentés dans le tableau V.1.1 suivant.

Table V.1.1 : Caractéristiques physico-chimiques et concentrations en ETM dans les sols de la STCM Toulouse

Refs	CEC (meq)	Argile (g/kg)	Sable grossier (g/kg)	Sable fin (g/kg)	Limon grossier (g/kg)	Limon fin (g/kg)	Mat. Org. (g/kg)	pH eau	CaO (mg/kg)	Pb (mg/kg)
PAL	89	129	373	152	137	177	31,4	7	1819	39800
AFF	37	36	546	195	108	106	9,6	8,7	2850	1425
BUR	60	91	442	194	124	135	14	6,7	1127	42400
F1	89	77	468	211	113	120	12,3	8,7	9371	37250
F2	26	27	852	29	48	43	0,9	9,2	3483	1020
CO	105	64	510	206	83	90	46,7	6,9	2673	35700
CI	33	33	777	86	41	59	3,4	7,5	1731	1445
SCO	33	15	810	73	44	56	1,3	8,9	4795	1065
MR	102	105	385	182	122	174	31,7	7,7	4226	311
MNR	110	76	386	193	140	160	45,1	6,9	2964	383,5
LR	197	231	303	189	161	46	68,8	7,7	6694	293,5
LNR	139	118	303	192	154	182	51,2	7,2	6513	262,5

Notes : Dénominations des sites se référer à la carte présentée dans le M&M

La figure V.1.2 présente les résultats de bioaccessibilité gastro-intestinale obtenus pour les sols de la STCM Toulouse étudiés. Les résultats ont montré une grande variation de la bioaccessibilité gastrique du Pb pour les échantillons testés (25 et 84%). Tandis que la bioaccessibilité gastro-intestinale varie entre 1.2% et 25.7% avec pour la plupart des sols testés des valeurs inférieures à 10%. La bioaccessibilité gastrique du Pb est significativement plus élevée comparée à la phase intestinale ($p < 0.01$). Ceci est lié à une solubilisation accrue des éléments cationiques tels que le Pb lors de la phase gastrique du test de bioaccessibilité BARGE pour laquelle le pH est fixé aux alentours de 1,2 (Oomen et al., 2006; Bosso et al., 2007). Tandis que lors de la phase intestinale, le pH neutre appliqué entraîne une précipitation du Pb (Denys et al., 2009). Le Pb ainsi précipité n'est pas disponible. Ainsi ces résultats indiquent que la phase gastrique du test BARGE conditionne la solubilisation du Pb

et permet d'obtenir la bioaccessibilité maximale de ce contaminant dans l'ensemble des sols. Par la suite, il sera donc mesuré seulement la phase gastrique du test de bioaccessibilité qui est la plus stable et qui donne la bioaccessibilité maximale pour l'ensemble des contaminants étudiés, comme préconisé par [Caboche \(2009\)](#).

Il a été observé que les sols ayant une forte concentration en Pb (F1, Bur, Co) ≈ 40000 mg.kg^{-1} présentent les valeurs de bioaccessibilité les plus basses. Les autres sols dont la concentration varie entre 293.5 et 1145 mg.kg^{-1} présente des valeurs de bioaccessibilité plus importante. Les résultats de l'analyse de variance ont permis de différencier la bioaccessibilité des sols à forte concentrations en Pb (>30000 mg.kg^{-1}) et celle des sols à plus faible concentration (<2000 mg.kg^{-1}). La valeur moyenne de bioaccessibilité des sols fortement concentré (n=4) en Pb est significativement plus faible comparé aux sols faiblement concentrés n=8) ($p<0.05$).

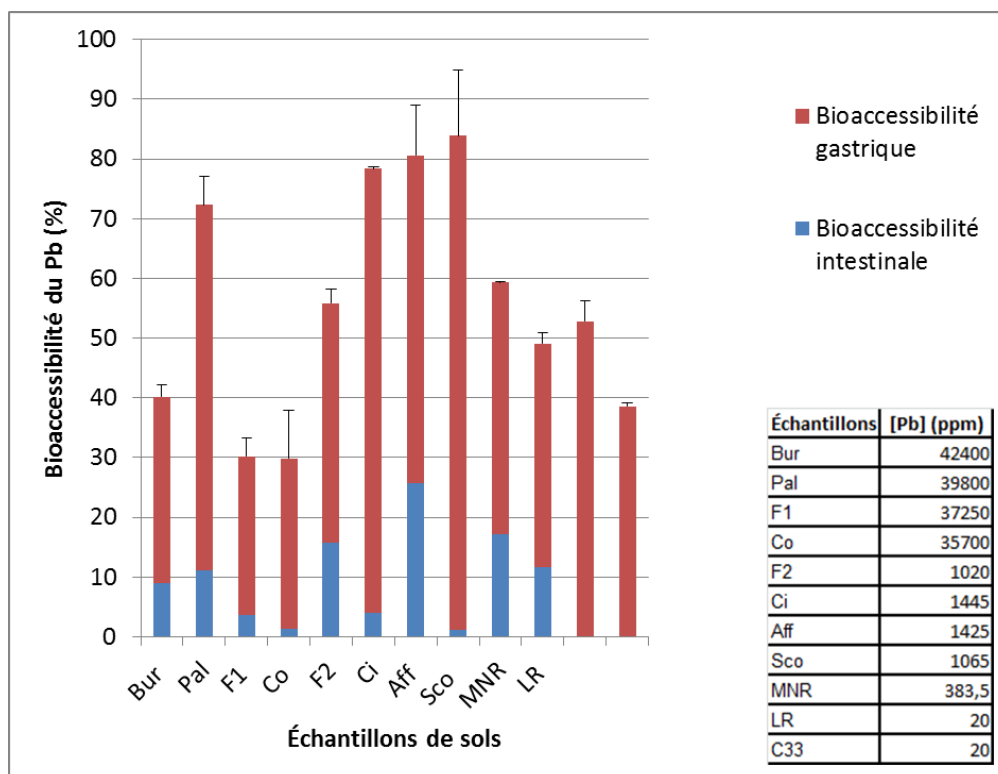


Figure V.1.2 : Valeurs moyennes de la bioaccessibilité du Pb dans les sols de la STCM Toulouse

De nombreux facteurs sont cités comme influençant la bioaccessibilité du Pb dans les sols : le pH, la texture du sol (surtout la teneur en argile), la teneur en matière organique, la CEC, taux de carbonates, la présence d'éléments pouvant adsorber le Pb dans les sols (Fe, P, Mn) etc... ([Ruby et al., 1999](#) ; [Rieuwerts et al., 2000](#)). De ce fait, une analyse de corrélation (Pearson) a été effectuée afin de mettre en évidence le potentiel impact des paramètres

physico-chimiques des sols de la STCM sur la bioaccessibilité du Pb. [Poggio et al. \(2009\)](#) ont démontré un lien entre certains paramètres physico-chimique du sol et le Pb bioaccessible par le biais d'une régression linéaire multiple. Ils ont montré que la bioaccessibilité du Pb est fonction de teneur en matière organique et du pourcentage d'argile dans les sols ($r^2=0.53$; $n=56$, $p<0.05$). Cependant, les auteurs précisent que le modèle développé n'est valable que pour les sols de l'étude et que pour valider et extrapoler ce modèle de prédiction il est nécessaire d'étudier d'autres sols provenant d'autres sites et présentant des caractéristiques différentes. Dans le cadre de notre étude, les résultats du tableau V.1.2 ont mis en évidence une absence de corrélation significative entre l'ensemble des paramètres physico-chimiques du sol et la bioaccessibilité du Pb pour les 11 sols analysés.

Table V.1.2 : Matrice de corrélation de Pearsons ($p<0.05$) entre la bioaccessibilité du Pb et les paramètres physico-chimiques du sol

Variables	Clay	Thin Silt	Rough Silt	Thin Sand	Rough Sand	pH	OM	CEC	CaCO ₃	Pb total
Bioaccess	0,143	0,17	0,402	0,276	-0,283	-0,305	0,466	0,417	0,184	-0,241

Ces résultats indiquent une relativement faible corrélation entre la bioaccessibilité du Pb et les paramètres physico-chimiques du sol. La teneur en matières organiques ou la CEC (qui est influencée fortement par la teneur en MO) sont les paramètres qui ressortent comme dans l'étude de [Poggio et al. \(2009\)](#). Le faible nombre d'échantillons analysés pourrait inciter à la prudence pour tirer des conclusions robustes. Cependant, [Wang et al., \(2003\)](#) ont également montré l'absence de forte corrélation entre le Pb bioaccessible et les caractéristiques physico-chimiques du sol (pH, texture, teneur en MO) pour 12 sols échantillonnés à proximité d'un réseau routier.

La disparité des résultats peut être aussi expliquée par l'historique de pollution de l'industrie. En effet pour exemple, le sol Pal fortement contaminé a montré une bioaccessibilité plus élevée que les autres sols dont la concentration en Pb est supérieure à 30000 mg.kg⁻¹. Ce sol Pal est une zone non couverte ou pousse un palmier. Le sol est donc pollué à cause du lessivage des feuilles de ce palmier par la pluie. Les ETM ainsi lixiviés peuvent avoir des spéciations différentes et ainsi une bioaccessibilité différente. Les origines de la pollution doivent jouer un rôle dans la bioaccessibilité du polluant. En effet le Pb dans les scories n'est pas sous la même forme chimique que le Pb dans les zones d'affinages ou à la sortie des fours. Ces différences de traitement du polluant peuvent être responsables de

modification de sa bioaccessibilité. Le lieu de prélèvement peut aussi jouer un rôle important. Si, il s'agit d'une zone d'écoulement ou un sol couvert ou non, les formes du Pb peuvent être différentes selon l'origine de la contamination (rejet dans l'eau, rejet atmosphériques ou diffus).

5.1.1.2.2 Site d'étude STCM Bazoches les Gallerandes

L'étude sur le site de Bazoches les Gallerandes a porté sur une analyse des caractéristiques du sol et la bioaccessibilité gastrique du Pb. Elle a été réalisée sur une parcelle attenante au site de fusion-réduction de la STCM. Comme décrit dans la section 2.2.2.1, les sols ont été échantillonnés tous les 10 m à partir du mur de l'usine jusqu'à 140 et répliqués sur 5 transects parallèles.

La figure V.1.3 montre la moyenne des teneurs totales en Pb dans les sols en fonction de la distance à l'usine. Il a été observé une concentration maximale en Pb de 29700 mg.kg^{-1} dans les sols échantillonnés à 10m de l'usine puis une diminution exponentielle ($R^2=0,93$, $p<0,1$) avec l'éloignement à l'usine, avec un minimum à 130 m et 140 m (525 et 480 mg.kg^{-1} respectivement). Les paramètres physico-chimiques des sols ont été analysés et décrits précédemment dans la section 3.2. Il a été observé que le sol est très alcalin sur toute la parcelle avec une faible variation entre 7,9 et 8,3. Ce pH élevé est dû à la dégradation de la roche mère calcaire (Cecchi et al., 2008).

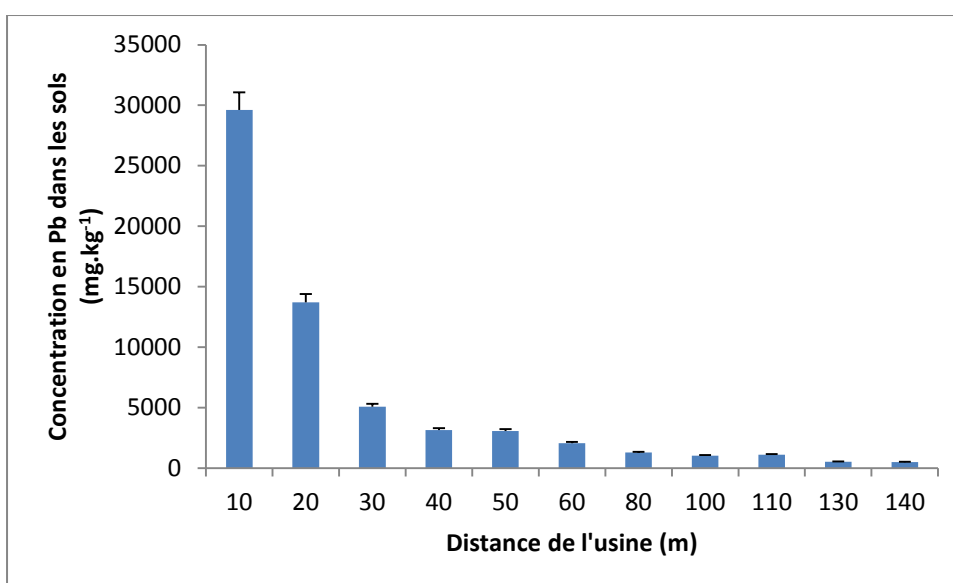


Figure V.1.3 : Valeurs moyennes des concentrations en Pb dans les sols (Parcelle attenante à la STCM Bazoches les Gallerandes)

A l'aide du test BARGE, la bioaccessibilité du Pb dans les sols a été mesurée le long des 5 transects étudiés. Les résultats sont présentés dans le graphique ci-dessous (Figure V.1.4).

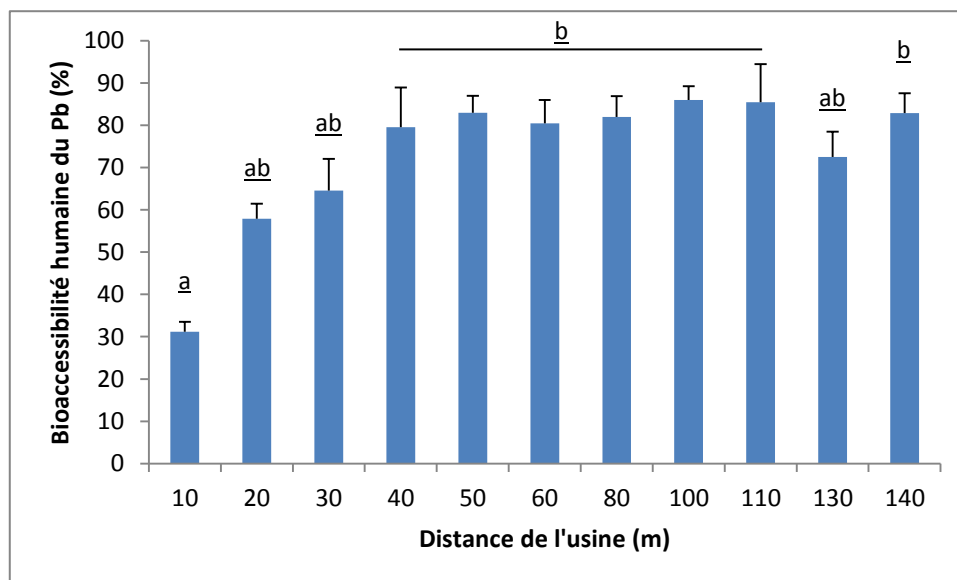


Figure V.1.4 : Valeurs moyennes de la bioaccessibilité du Pb dans les sols (Parcelle attenante à la STCM Bazoches les Gallerandes). Les barres partageant la même lettre ne sont pas significativement différente ($p < 0.05$, Tukey's HSD test)

Pour les sols prélevés à partir de 140m, les résultats ont révélé une bioaccessibilité du Pb élevée et peu variable (73 à 86%). Il a été vu précédemment que les sols étaient très alcalins. [Cecchi et al., \(2008\)](#) avec leur étude sur les sols environnants la STCM de Bazoches les Gallerandes ont reporté une teneur en carbonates élevée pouvant aller jusqu'à 93% dans les couches profondes du sol. Ces paramètres sont connus pour augmenter la bioaccessibilité du Pb dans les sols. En effet, [Denys et al., \(2007\)](#) ont montré que le Pb contenu dans les sols carbonatés est hautement bioaccessible. Ceci étant dû à des réactions d'échanges ioniques provoquant le remplacement du calcium et potassium par le Pb ([Bittel et Miller, 1974](#)). Des formes carbonatées du Pb type cerussite ($PbCO_3$) sont ainsi formées. Les conditions de pH très faibles entretenues lors de la phase gastrique du test de bioaccessibilité augmentent fortement la dissolution de ces formes de Pb et donc sa bioaccessibilité ([Denys et al., 2007](#) ; [Bannon et al., 2009](#)).

De plus, 3 groupes statistiques différents se sont révélés au cours de cette étude : 2 groupes comprenant les valeurs de bioaccessibilité du Pb dans les sols prélevés proche de l'usine (10 à 30m), équivalant à des concentrations en Pb de 29600 à 5060 $mg.kg^{-1}$ et un autre

pour ceux plus éloignés de l'usine (40 à 140m) équivalant à des concentrations en Pb de 3140 à 480 mg.kg⁻¹. La bioaccessibilité du Pb dans les sols prélevés de 0 à 30m est significativement plus faible (31 à 65%) que dans ceux prélevés de 40 à 140m de l'usine (73 à 86%). Cette diminution de bioaccessibilité du Pb pour les sols fortement concentrés en Pb a déjà été observée lors de l'analyse des sols de la STCM Toulouse (voir section précédente).

5.1.2 La concentration totale en Pb dans le sol

Dans la littérature, aucune étude n'a mis en évidence de lien entre la concentration totale en Pb dans les sols et sa bioaccessibilité. De plus, très peu de publications sur le sujet portent sur des sols très fortement contaminés (> 40 000 mg.kg⁻¹). [Denys et al., \(2007\)](#) ont testé le sol d'un site minier ayant une concentration en Pb de 77007 mg.kg⁻¹ et mesuré une bioaccessibilité de 50±7 %. Ce sol avait une forte teneur en cérussite, forme carbonatée du Pb hautement bioaccessible. [Caboche \(2009\)](#) a testé la bioaccessibilité de 5 sols ayant une concentration en Pb supérieure à 30000 mg.kg⁻¹ et ont rapporté des bioaccessibilités variant de 10 à 70% avec sur les 5 sols, 3 dont la bioaccessibilité est inférieure à 40%. La question que nous nous sommes posée était donc : la concentration totale en Pb dans un sol influence-t-elle la bioaccessibilité ?

5.1.2.1 Matériel et méthodes

Afin de confirmer cette hypothèse, un sol non contaminé, noté S2 décrit précédemment dans la section 2.2.1.1, a été dopé en Pb avec des particules prélevées dans les filtres des fours de la STCM Toulouse. 200g de sol ont été dopés avec ces particules afin d'avoir une masse conséquente pour une bonne homogénéisation. Le sol a ensuite été laissé à l'air libre pendant un mois pour favoriser les phénomènes de stabilisation. 11 concentrations différentes ont ainsi été établies : 500, 1000, 2000, 5000, 10000, 15000, 20000, 25000, 30000, 35000 et 40000 mg.kg⁻¹ de Pb. Les concentrations bioaccessibles du Pb dans ces sols ont ensuite été mesurées à l'aide du test de bioaccessibilité BARGE.

5.1.2.2 Résultats et discussion

Les résultats présentés dans la figure V.1.5 ci-dessous ont révélé une concentration maximale bioaccessible de 6828 mg.kg^{-1} de Pb pour une concentration dans le sol de 15000 mg.kg^{-1} . Ensuite, il est observé un pseudo-plateau et même si la concentration en Pb dans les sols augmente, la concentration bioaccessible du Pb n'augmente pas. Ce qui signifie que la bioaccessibilité du Pb (%) diminue lorsque sa concentration totale dans un sol augmente, à partir d'un certain seuil.

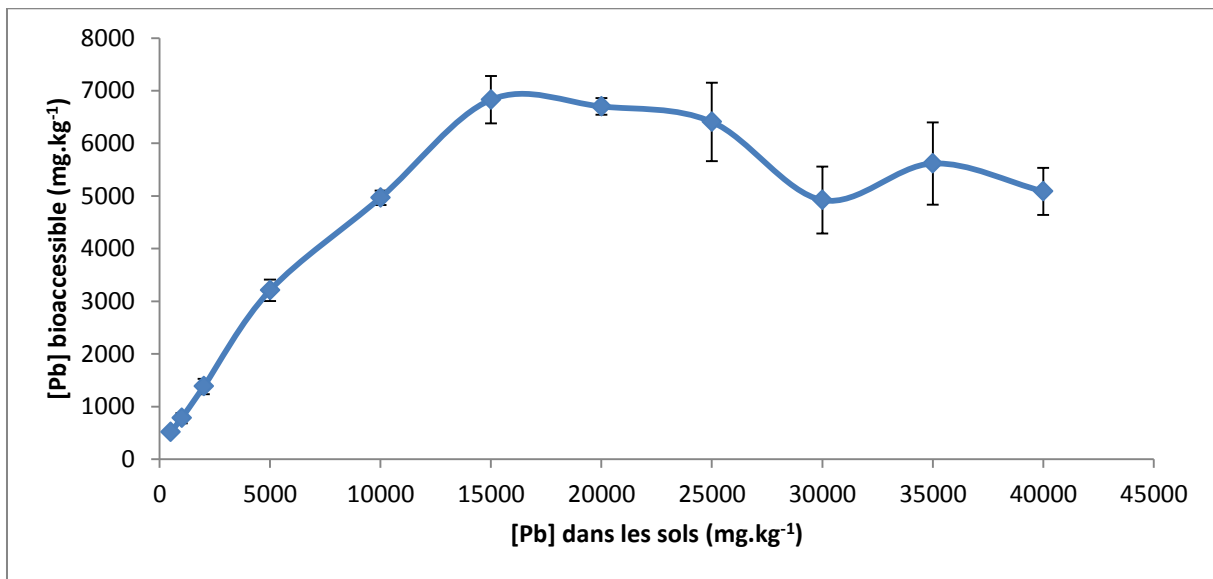


Figure V.1.5 : Valeurs moyennes des concentrations bioaccessibles en Pb dans les sols dopés (n=6)

L'hypothèse proposée pour expliquer ce phénomène serait une saturation de l'extraction digestive à partir d'une certaine dose de contaminant. Saturation pouvant être influencée par la température, le temps d'extraction et à la molarité des réactifs établis au cours de l'extraction digestive.

5.1.3 La taille des particules et la spéciation

5.1.3.1 Matériel et méthodes

Un sol non contaminé noté S2, précédemment décrit dans la section 2.2.1.1 a été dopé en Pb à hauteur de 1000 mg.kg^{-1} avec différentes particules de Pb. Des particules prélevées dans les filtres des fours (Pf) de la STCM, et des particules du commerce mono- métalliques et mono spéciation (PbO et PbSO₄).

Les Pf ont été impactées afin de les ségréguer selon leur classe granulométrique. Pour ce faire, un sac en PE 45×35 cm (ballon de baudruche) a été fixé sur un impacteur inertiel en cascade (DEKATI PM_{2.5/1/0.1}) (Fig V.1.6). Une fois la pompe mise en tension, 1g de Pf est introduit dans le ballon, puis de l'air est envoyé à l'aide d'un compresseur de façon à provoquer une remise en suspension des particules. Ces dernières vont être impacter suivant leur diamètre aérodynamique sur les différents étages de l'impacteur. Ainsi il a été récupéré des PM_{2.5} et PM₁ des particules de fours de la STCM.

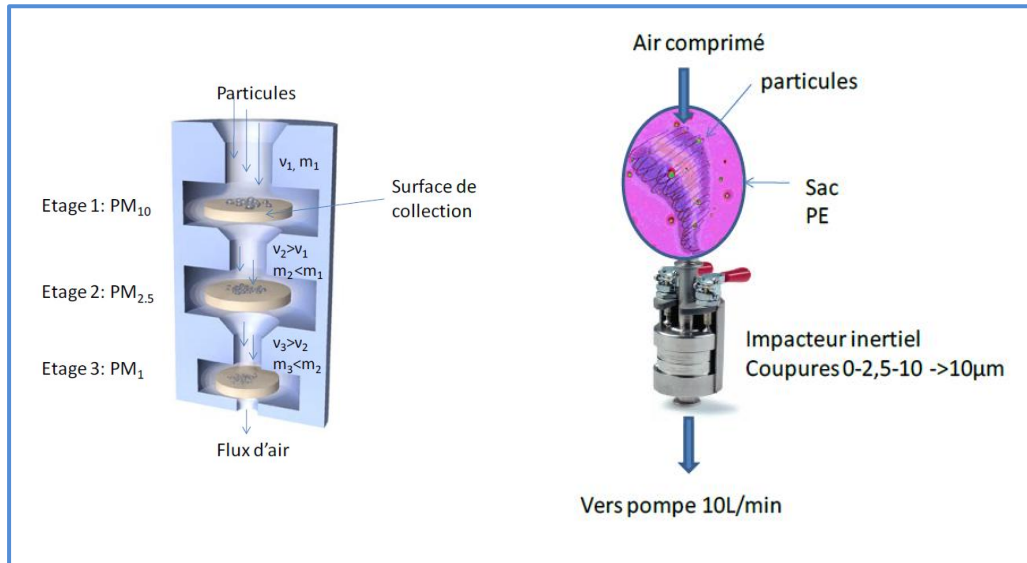


Figure V.1.6 : Schéma du principe de réimpaction des particules de fours de la STCM (Uzu, 2009)

Les particules de fours (Pf) et les particules du commerce mono métalliques et mono-spéciation (PbO et PbSO₄) ont été broyées à l'aide d'un pilon et d'un mortier sous hotte. Ceci par le même opérateur et pendant 5 min. Les particules ainsi générées ont permis de doper le sol non contaminé S2. Ainsi 8 sols ont été dopés à hauteur de 1000 mg Pb. kg⁻¹ avec les différentes particules de Pb décrites ci-dessus. Une fois dopés les sols ont été laissés 1 mois à l'air libre pour stabilisation. Les sols et leurs concentrations respectives déterminées après minéralisation sont présentés dans le tableau V.1.3 suivant.

La bioaccessibilité gastrique du Pb dans ces sols a ensuite été mesurée grâce au test de bioaccessibilité BARGE.

Tableau V.1.3 : Nomination des sols dopés et leurs concentrations en Pb après minéralisation.

Sols dopés	Concentration en Pb (mg.kg ⁻¹)
Pf	850,5
Pf broyées	1163,3
PM _{2,5}	841,1
PM ₁	985,1
PbO	1126,8
PbO broyées	1302,4
PbSO ₄	1136
PbSO ₄ broyées	1331,8

5.1.3.2 Résultats et discussion

Le graphique ci-dessous présente les résultats de bioaccessibilité gastrique du Pb dans les différents sols dopés (Figure V.1.7). La bioaccessibilité gastrique du Pb dans le sol dopé avec les Pf a été mesurée autour de 42%. Il est observé une légère augmentation pour les particules impactées avec 43% pour les sols dopés avec des PM_{2,5} et 51% pour ceux dopés avec les PM₁. Cependant cette augmentation ne s'est pas révélée statistiquement significative. En revanche, les sols dopés avec des Pf broyées ont une bioaccessibilité du Pb de 72% significativement plus élevée que pour les sols dopés avec les autres particules de four de la STCM. Cette tendance s'est répétée pour les sols dopés avec les particules du commerce, La bioaccessibilité du Pb est significativement plus élevée pour les PbO et PbSO₄ broyées (89 et 87% respectivement) que pour les particules non broyées. De plus la bioaccessibilité du Pb est significativement différente pour les sols dopés avec des particules de spéciation différente. En effet la bioaccessibilité pour le PbO est de 71% tandis que celle pour le PbSO₄ est de 52%.

Ces résultats ont montré que la taille des particules de Pb serait susceptible d'influencer leur bioaccessibilité. Très peu d'étude évoquent l'influence de la taille des particules sur la bioaccessibilité dans les sols. [Juhasz et al., \(2011\)](#) démontrent que la taille des particules de sols est un paramètre important impactant la bioaccessibilité du Pb. Ils ont mesurés la bioaccessibilité du Pb dans quatre différentes fractions granulométriques de sol (2mm, 250µm, 100µm et 50µm). Leurs résultats ont montré que la bioaccessibilité du Pb augmente quand la taille des particules diminue.

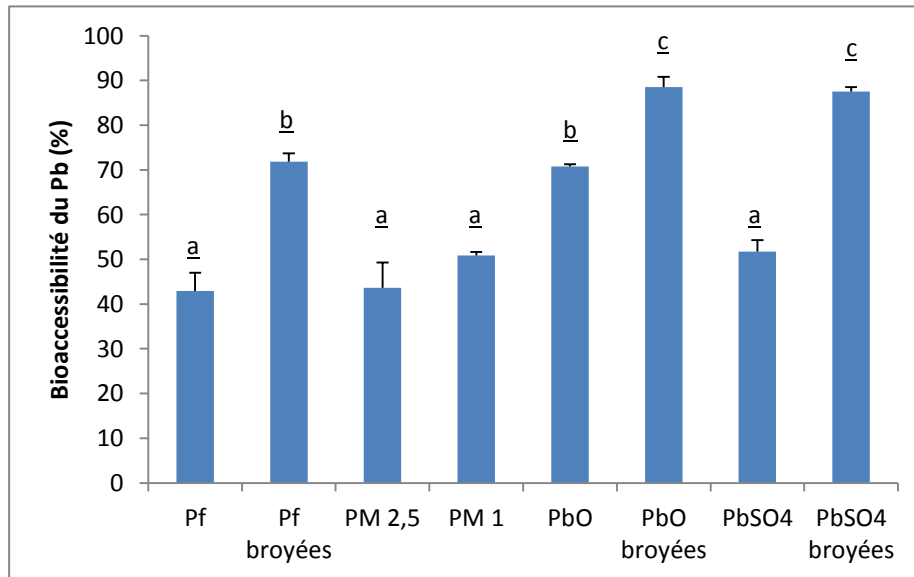


Figure V.1.7 : Valeurs moyennes de la bioaccessibilité du Pb dans les sols dopés (n=3). Les barres ne partageant pas la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0.05$, Tukey's HSD test)

Mais leurs travaux ont été axés sur la taille des particules de sols et non sur celles des particules métalliques. Uzu et al., (2011) a comparé la bioaccessibilité des particules de Pb à celle de particules de Pb impactée à $2,5\mu\text{m}$ et ont observé une bioaccessibilité significativement augmentée pour les particules plus fines. Ceci est un phénomène connu en chimie, plus la particule est petite plus sa surface spécifique est grande et donc plus les nombre d'interactions chimiques peuvent se produire. Dans notre étude, l'augmentation de bioaccessibilité la plus élevée est issue du broyage des particules. Ce qui diminue la granulométrie des particules mais modifie aussi leur surface spécifique pouvant ainsi augmenter leur réactivité et les échanges avec les réactifs des solutions digestives.

Les sols dopés avec du PbO ont montré une bioaccessibilité du Pb significativement plus importante comparée à celles des sols dopés avec du PbSO₄. Ceci souligne l'importance de la spéciation sur la bioaccessibilité d'un élément dans les sols. Bannon et al., (2009) évoquent le fait que la bioaccessibilité élevée, qu'ils ont pu estimer dans certains sols, est dû à la présence de formes du Pb hautement soluble telles que les oxydes de Pb et les carbonates de Pb. Par contre, dans certains sols miniers, une faible bioaccessibilité a été reportée dû à la présence de formes de Pb très peu solubles telles que les sulfides, les phosphates et les sulfates (Schröder et al., 2004).

5.1.4 La compartimentation dans le sol

Cette partie a fait l'objet d'une publication en collaboration avec l'université de Limoges dans le journal « Environmental Science and Pollution Research ». (Pascaud et al., 2014).

L'étude porte sur un ancien site minier à proximité de Pongibaud précédemment décrit dans la section 2.1.2. La bioaccessibilité des ETM sur ce site a été analysée en relation avec leur compartimentation et les risques induits pour la santé humaine.

5.1.4.1 Matériel et méthodes

Six échantillons ont été prélevés à différents points du site (Figure 8). Quatre provenant de déchets miniers notés de T1 à T4, un provenant des sédiments de la rivière à proximité noté Sed et 2 provenant du terrain de foot notés Soil 1a et 1b. Des extractions chimiques séquentielles ont été réalisées sur ces échantillons par Grégoire Pascaud à l'université de Limoges. Les analyses de bioaccessibilité ont été réalisées à EcoLab (Toulouse) par moi-même à l'aide du test de bioaccessibilité BARGE.

5.1.4.2 Résultats et discussion

L'essentiel des résultats est présenté dans l'article Pascaud et al., 2014

Le Tableau V.1.4 présente les concentrations totales en ETM dans les échantillons.

Tableau V.1.7 : Concentrations moyennes en Pb, Zn, As, et Sb dans les échantillons

Sample	Pb		Zn		As		Sb	
	----- (mg.kg ⁻¹) -----							
T1	16603	± 27	1064	± 7	354	± 113	196	± 14
T2	9651	± 19	786	± 6	325	± 72	157	± 13
T3	38412	± 45	1309	± 9	330	± 78	363	± 18
T4	15686	± 222	1177	± 7	592	± 111	228	± 15
Sed	12675	± 23	652	± 5	189	± 55	195	± 14
Soil 1a	2930	± 106	995	± 7	242	± 54	159	± 14
Soil 1b	2780	± 104	949	± 7	261	± 53	167	± 14
	DL = 5		DL = 3		DL = 3		DL = 34	

Les valeurs de bioaccessibilité sont listées dans le Tableau V.1.5. La bioaccessibilité gastrique du Pb dépend de l'origine de l'échantillon et varie de 7,2 à 40,6%. Dans les déchets miniers T1 et T2, la bioaccessibilité du Pb a été mesurée autour de 20%. La bioaccessibilité du Pb la plus élevée a été retrouvée dans les échantillons prélevés sur le terrain de foot avec 40,6% (Soil 1a) et 39,8% (Soil 1b). Ces valeurs sont relativement faibles comparées à celles obtenues dans un contexte de site minier (Smith et al., 2011). La bioaccessibilité gastrique des sols d'autres études avec un contexte similaire sont généralement autour de 60% (Juhász et al., 2011 ; Smith et al., 2011). Selon les extractions séquentielles, le Pb est distribué dans les quatre fractions avec une tendance supérieure pour la fraction la plus stable, la fraction résiduelle (Figure V.1.8). Le Pb lié à la fraction résiduelle est très stable et donc peu bioaccessible.

Tableau V.1.5 : Valeurs moyennes de la bioaccessibilité du Pb, Zn, As et Sb

Sample	Pb bioaccessibility (%)		Zn bioaccessibility (%)		As bioaccessibility (%)		Sb bioaccessibility (%)	
	Gastric phase	Intestinal phase	Gastric phase	Intestinal phase	Gastric phase	Intestinal phase	Gastric phase	Intestinal phase
T1	21.5 ± 1.3	5.3 ± 0.8	1.9 ± 1.3	0.9 ± 0.1	11.3 ± 1.3	11.2 ± 0.3	<DL	<DL
T2	23.3 ± 0.7	3.4 ± 1.3	1.7 ± 0.7	0.9 ± 0.1	4.9 ± 0.7	7.1 ± 0.3	<DL	<DL
T3	7.2 ± 0.4	3.3 ± 0.3	23.1 ± 0.4	13.6 ± 0.2	6.4 ± 0.4	8.7 ± 0.4	<DL	<DL
T4	13.6 ± 0.9	5.9 ± 0.9	2.6 ± 0.9	1.8 ± 0.2	2.3 ± 0.9	3.1 ± 0.1	<DL	<DL
Sed	19.0 ± 0.5	10.7 ± 1.6	30.7 ± 0.4	25.5 ± 3.2	5.3 ± 0.4	10.8 ± 5.4	<DL	<DL
Soil 1a	40.6 ± 0.4	7.3 ± 0.5	28.5 ± 0.4	5.1 ± 0.2	7.6 ± 0.4	8.4 ± 0.1	<DL	<DL
Soil 1b	39.8 ± 1.8	6.7 ± 0.2	26.9 ± 1.8	4.9 ± 0.3	6.0 ± 1.8	8.1 ± 0.5	<DL	<DL

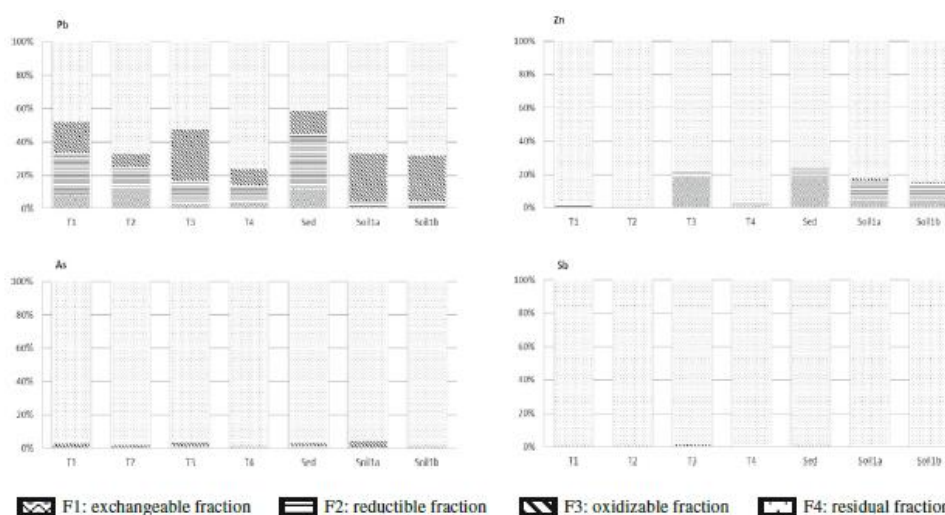


Figure V.1.8 : Distribution du Pb, Zn, As et Sb selon le protocole d'extractions séquentielles BCR

Le risque pour la santé humaine est déterminé par comparaison avec la dose journalière tolérable (DJT) pour un élément. La DJT correspond au plus petit apport en un

élément sans risque d'effets chroniques associés. Elle est généralement exprimée en μg par kg de masse corporelle par jour. La DJT_{Pb} est égale à $0,15 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (Winter-Sornika et al., 2003). Cette valeur représente $7,5\mu\text{g}$ par jour pour un humain pesant 50 kg . L'ingestion accidentelle d' 1g de sol provenant du terrain de foot (Soil 1a par exemple) provoquerait l'apport en Pb de $1347,8\mu\text{g}$ de Pb ($2930 \mu\text{gPb}\cdot\text{g}^{-1}$ de sol $\times 40,6\%$ de bioaccessibilité du Pb) ce qui dépasse largement la DJT_{Pb} . En conséquence, le risque sur la santé humaine du Pb sur le terrain de foot est significatif bien que l'ingestion d' 1g de sol par jour soit peu probable. La bioaccessibilité du Zn dans les échantillons analysés varie entre $1,7$ et $30,7\%$ avec les plus hautes valeurs pour les sols du terrain de foot. Ces valeurs sont relativement basses comparées aux données de la littérature (Turner et al., 2009). En effet comme pour le Pb, les résultats des extractions séquentielles BCR sur nos échantillons ont montré que le Zn est fortement lié à la fraction résiduelle du sol et donc très stable ce qui explique ces faibles valeurs de bioaccessibilité. Puisque le Zn est un élément essentiel, la DJT_{Zn} est plus grande que la DJT_{Pb} : $\text{DJT}_{\text{Zn}}=0,6 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (Okorie et al., 2012). La teneur en Zn d'un sol provenant du terrain de foot est $995 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. L'ingestion d'accidentelle d' 1g de ce sol provoquerait un apport en Zn de $283,575\mu\text{g}$, valeur largement inférieure à la DJT_{Zn} . Dans ce contexte, le Zn ne présente donc pas de risque pour la santé humaine. La bioaccessibilité de l'As dans les échantillons analysés varie entre $2,3$ et $11,3\%$. Contrairement à la bioaccessibilité du Pb, des valeurs supérieures ont été observées pour l'échantillon T1. Ces faibles valeurs de bioaccessibilité montrent que les liaisons entre As et phases porteuses sont stables ce qui est en accord avec les résultats de l'extraction séquentielle BCR (Beudanite phase). La TDI_{As} est égale à $0,3 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$ (Okorie et al., 2012) ce qui correspond à $0,015 \text{ mg}\cdot\text{j}^{-1}$ pour un humain de 50kg . Un gramme de sol du terrain de foot peut apporter $8,1\%$ de $0,261\text{mg}$ d'As (il est considéré la bioaccessibilité maximale en les 2 phases gastriques et intestinales) ce qui représente $0,021\text{mg}$. Ce taux est supérieur à la TDI_{As} . Même si la bioaccessibilité de l'As est faible, le risque pour la santé humaine est conséquent en raison de la toxicité élevée de l'As.

Dans cette étude, la bioaccessibilité de Sb semble être très faible. Ces résultats ne correspondent pas complètement à ce qui a pu être révélé dans la littérature disponible pour cet élément. Dans un contexte de site minier, Denys et al., (2009) ont observé une bioaccessibilité de Sb variant de 1 à $10,8\%$. La différence avec la présente étude porte sur la liaison de Sb avec les phases porteuses du sol. Dans notre étude, Sb est associé à la structure beudanite, qui est très stable. Aucun risque pour la santé humaine ne peut donc être attribué à l'antimoine sur ce site.

5.1.5 La matrice végétale

5.1.5.1 Matériel et Méthodes

Deux espèces végétales, la laitue (*Lactuca Sativa*) et le persil (*Petroselinum crispum*), choisies pour leur cycle de vie court et leur culture régulière dans les jardins de particuliers, ont été placées dans l'enceinte de la STCM Toulouse (Fig V.1.9). Ceci afin d'être exposées aux retombées atmosphériques et diffuses de la STCM. 5 végétaux ont été échantillonnés au bout de 2 et 4 semaines pour les persils et au bout de 4 et 6 semaines pour les laitues (exposition en fonction de leur croissance végétative).



Figure V.1.9 : Photographie des végétaux exposés dans l'enceinte de la STCM Toulouse

Pour chaque espèce, 5 témoins ont été placés en atmosphère non contaminée sur le site du laboratoire EcoLab. Après un lavage de la ménagère pour la laitue et un simple rinçage pour le persil, les végétaux ont été séchés puis broyés et enfin minéralisés à l' HNO_3 et H_2O_2 . (via le digiprep®) Leurs concentrations en Pb respectives sont indiquées dans le tableau V.1.6 suivant.

La bioaccessibilité gastrique du Pb dans les persils et les laitues a ensuite été mesurée avec le test de bioaccessibilité BARGE.

5.1.5.2 Résultats et discussion

Même après lavage, les concentrations en Pb dans les végétaux exposés étaient significativement plus élevées ($p < 0,01$) que dans les plantes témoins (jusqu'à 600 fois pour les persils exposés 6 semaines). De grandes quantités de Pb ont été retrouvées dans les végétaux exposés sans qu'il n'y ait apparition de symptômes macroscopiques de phytotoxicité, ce qui pourrait être un signe d'alerte pour les consommateurs éventuels de ces plantes potagères. De plus les concentrations en Pb dans les végétaux ont significativement augmenté avec le temps d'exposition ($p < 0,05$).

Les résultats de bioaccessibilité du Pb dans les végétaux exposés sont présentés dans la figure V.1.10 ci-dessous. La bioaccessibilité du Pb est d'environ 30% pour les persils exposés 2 et 4 semaines. La bioaccessibilité du Pb dans les laitues exposées 4 semaines est significativement ($p < 0,05$) plus élevée (52%) comparée à celle des persils pour le même temps d'exposition. Ces résultats indiquent une différence de bioaccessibilité selon la matrice

Tableau V.1.6 : Valeurs moyenne et écarts-types des concentration en Pb dans les végétaux exposés aux retombées atmosphériques de la STCM Toulouse

Végétaux	Concentration en Pb (mg.kg^{-1})
Persils témoins	$0,54 \pm 0,12$
Persils exposés 2 semaines	$100,5 \pm 6,2$
Persils exposés 4 semaines	$298,7 \pm 73,9$
Laitues témoins	$2,9 \pm 0,52$
Laitues exposées 4 semaines	$120 \pm 16,9$
Laitues exposées 6 semaines	$171,2 \pm 12,1$

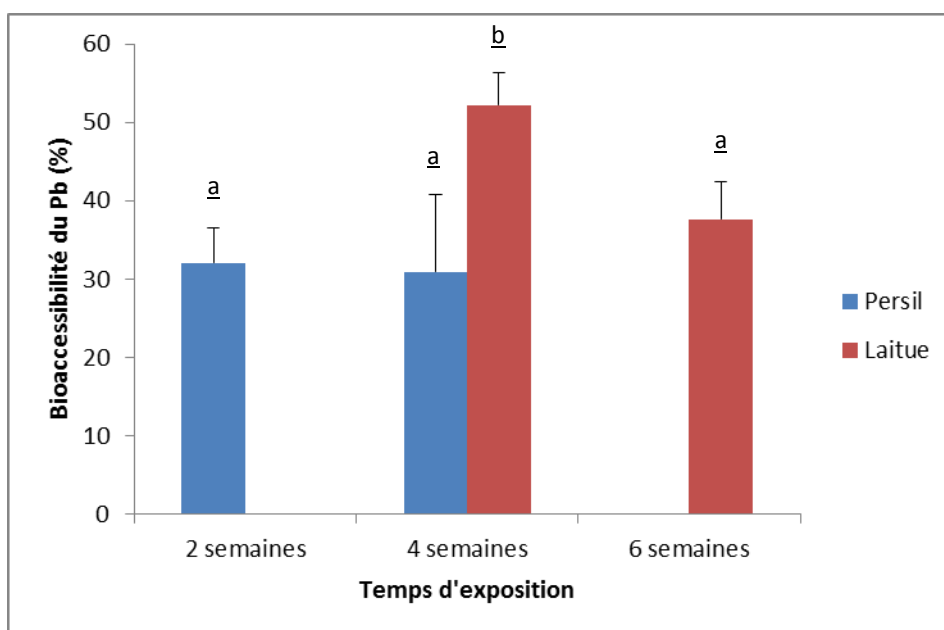


Figure V.1.10 : Valeurs moyennes de la bioaccessibilité du Pb dans les végétaux exposés (n=5). Les barres ne partageant pas la même lettre ne sont pas significativement différentes ($p < 0.05$, Tukey's HSD test)

végétale ingérée. Xiong et al., (2014) ont mesuré la bioaccessibilité des ETM dans le chou et l'épinard après déposition sur les feuilles de particules issus des filtres de fours de la STCM. Les résultats ont montré une bioaccessibilité du Pb de 82% et 78% respectivement dans le chou et l'épinard. Ceci suggère que la physio-morphologie des feuilles affecte la bioaccessibilité des ETM dans les plantes. Différents phénomènes pourraient expliquer ces variations de bioaccessibilité : i) une différence d'internalisation des particules dans les tissus des végétaux ii) un changement de spéciation des ETM après interactions avec les tissus foliaires. En effet, Uzu et al., (2010) évoquent une internalisation plus profonde des particules dans la laitue tandis que l'internalisation de ces dernières dans le persil serait plus superficielle. Il y aurait donc peu de modification de l'état de ces particules dans le persil. Il est possible d'en déduire que la bioaccessibilité du Pb dans les feuilles de persils se rapprocherait de celle des Pf telle quelles, qui a été mesurée à environ 30% par Uzu et al., (2010) et à 42% par moi-même (section 5.1.3.2). Schreck et al., (2014) ont montré que la spéciation du Pb était différente entre les feuilles de laitues et de ray-grass après exposition foliaire de particules. Ces différences de spéciation induites lors de l'internalisation et du stockage des ETM vont influencer leur bioaccessibilité. Xiong et al., (2014b) ont reporté que la bioaccessibilité du Pb et du Cd dans la laitue est différente selon la voie d'exposition (racinaire ou foliaire). En effet, l'exposition racinaire induit une bioaccessibilité plus

importante que l'exposition foliaire. Dans le cas de l'exposition racinaire, une première étape de solubilisation des ETM est nécessaire pour permettre leur absorption par les racines. Tandis que dans le cas d'une exposition foliaire, une part des particules peuvent être intégrées par endocytose à travers la cuticule (Schreck et al., 2012). Ces différences d'intégration pouvant être différentes selon les végétaux peuvent influencer la bioaccessibilité des ETM.

5.1.6 Influence de la bioturbation des vers de terre

L'objectif de ces travaux a été d'étudier l'influence de la bioturbation des vers de terre sur la bioaccessibilité humaine des ETM dans les sols et les végétaux.

5.1.6.1 Matériel et méthodes

Les sols utilisés ici pour étudier l'influence de la bioturbation des vers de terre sur la bioaccessibilité humaine des ETM, sont les sols de l'étude en mésocosmes (section 4.1). Ainsi 2 conditions expérimentales ont été différenciées : les sols bioturbés (SB), c'est-à-dire les sols ayant subi la bioturbation des vers de terre et les sols pollués (S) sans vers de terre. Les laitues testées sont aussi les laitues de l'étude en mésocosmes (section 4.1). Deux nouvelles conditions expérimentales ont été différenciées : les laitues cultivées sur du sol hébergeant des vers de terre (LE) et les laitues cultivées sur du sol seul (L). Les concentrations dans les sols pour chaque élément sont décrites dans la Table X de la section 4.1 de ce manuscrit. Les concentrations dans les laitues sont décrites dans la figure X de la section 4.1.

La bioaccessibilité gastrique des ETM dans les sols et les laitues a été mesurée à l'aide du test de bioaccessibilité BARGE.

5.1.6.2 Résultats et discussion

Les résultats de bioaccessibilité gastrique des ETM dans les sols sont présentés dans le graphique ci-dessous (figure V.1.11). Excepté pour le Zn, il a été observé une augmentation de la bioaccessibilité des ETM dans les sols bioturbés (SB) comparée à celle dans les sols qui n'ont pas hébergé de vers de terre (S). Cette tendance est vraie pour tous ces éléments et s'est révélée significative ($p < 0,05$) pour certaines concentrations dans les sols (figure V.1.11). Ceci suggère que la bioturbation des vers de terre augmente la bioaccessibilité des ETM dans les sols. Dans la section 4.1 (Lévêque et al., 2014), il a été observé une augmentation du pH des

sols sous l'action des vers de terre. Cette modification du pH peut à la fois réduire la solubilité directe des ETM, et augmenter le taux de matière organique dissoute (Quenea et al., 2009). Le système digestif humain est conçu pour dégrader et digérer la matière organique. Une augmentation des ETM liés à la matière organique dissoute pourrait donc augmenter leur bioaccessibilité.

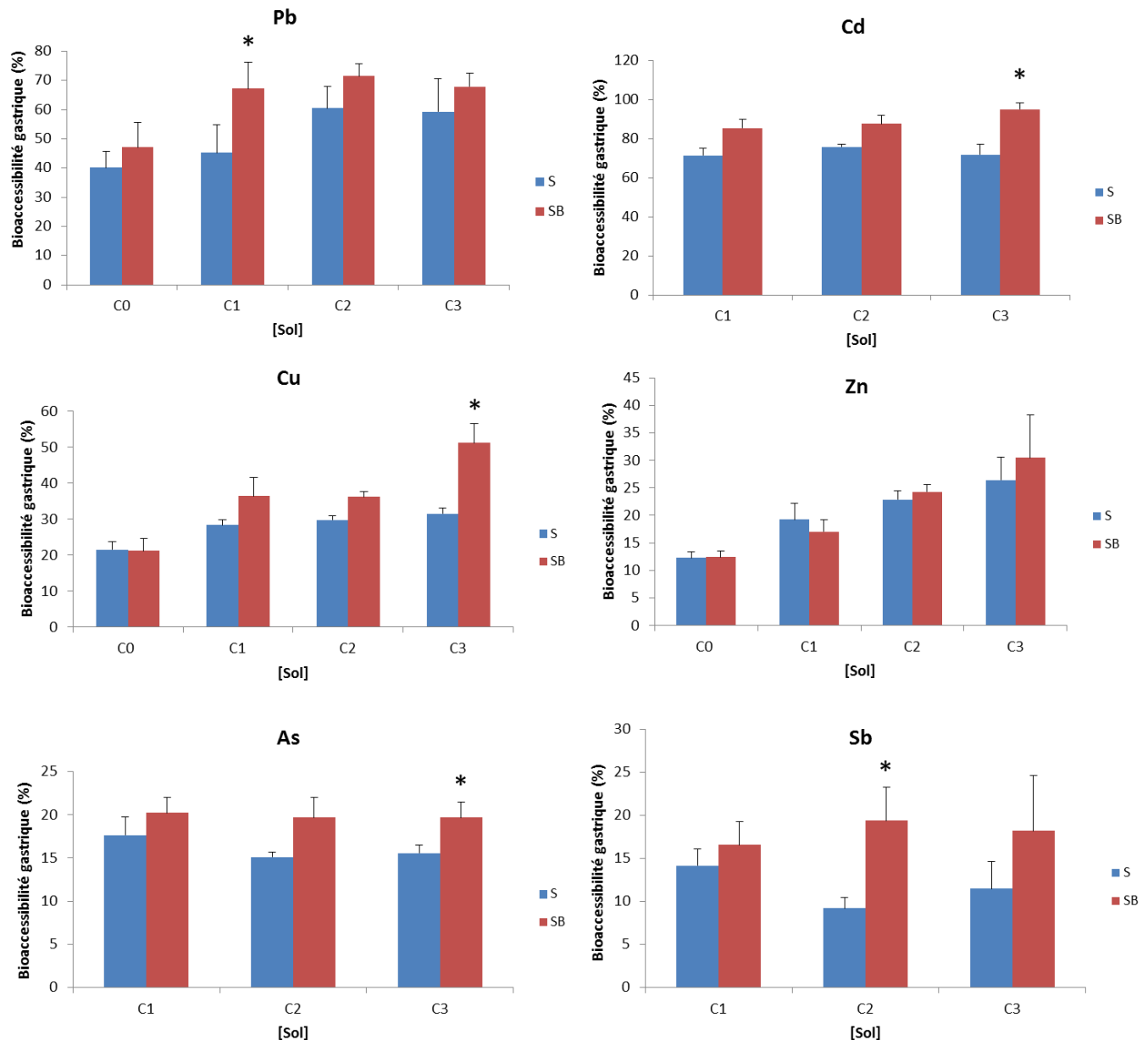


Figure V.1.11 : Valeurs moyennes et écart-types de la bioaccessibilité gastrique des ETM dans les sols bioturbés (SB) et les sols non bioturbés (S). Les « * » montrent les différences significatives observées avec le test t de Student ($p < 0.05$) entre les conditions expérimentales SB et S.

De plus, les modifications de pH peuvent induire des changements de spéciations des ETM notamment avec la formation d'oxydes et de carbonates (Denys et al., 2007). Et, il a été vu dans les études précédentes que les formes oxydées et carbonatées du Pb sont fortement bioaccessibles. Dans la section 4.2 (Bioturbation-Phytodisponibilité- RHYZOtest®), il a été décrit les possibles changements de spéciation et compartimentation dus au passage des ETM à travers le système digestif du ver de terre mais aussi à leurs interactions avec le mucus du ver et les microorganismes. L'ensemble des changements décrits pourraient jouer un rôle dans les modifications de bioaccessibilité humaine des ETM.

Afin de montrer ces différences de spéciation, des expérimentations EXAFS (Extended X-Ray Adsorption Fine Structure) ont été réalisées pour le Pb au synchrotron de Grenoble. Cette technique d'analyse de spectrométrie d'absorption des rayons X permet d'apporter des informations sur l'environnement atomique d'un élément donné, c'est-à-dire sur sa spéciation et sa compartimentation. Nombre de ces résultats sont en cours de traitement, ainsi il sera montré seulement la figure suivante (Figure V.1.12) dans ce manuscrit.

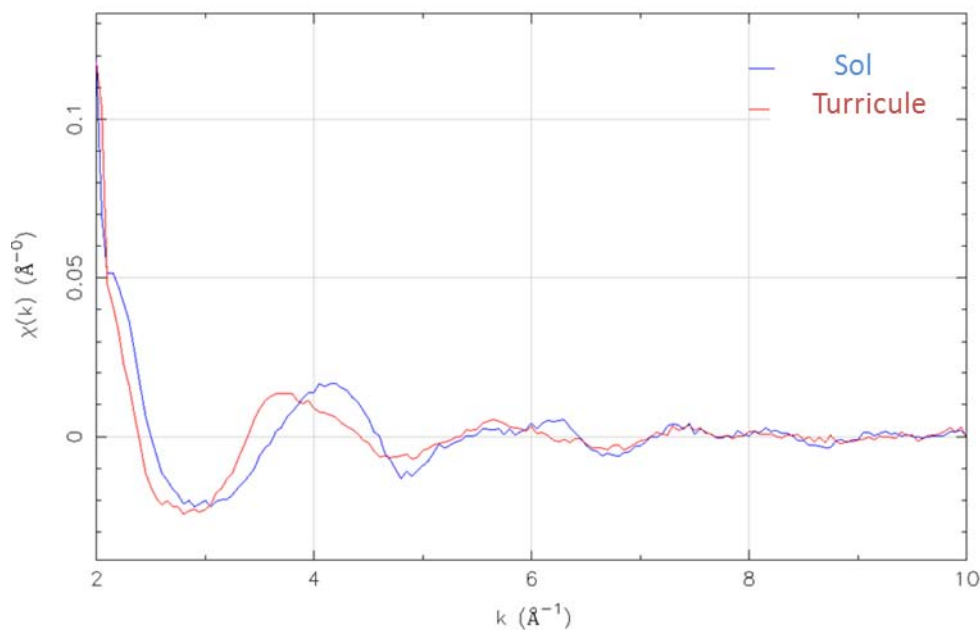


Figure V.1.12 : Spectre EXAFS du sol (bleu) et d'un turricule (rouge) au pic d'absorption du Pb

Cette figure présente le spectre EXAFS du Pb dans le sol (S) et dans un turricule produit par *L. terrestris* à partir du sol (S). Les oscillations EXAFS ont été acquises jusqu'à 10 Å⁻¹ et les spectres EXAFS du Pb dans les sols et dans les turricules ont été comparés entre eux. Des

différences dans les amplitudes et les oscillations des spectres des 2 conditions ont été clairement observées. Ce qui veut dire que l'environnement atomique du Pb, et donc sa spéciation, est différent dans les turricules comparé au sol, et suggère que le passage du Pb à travers le système digestif du ver de terre peut modifier sa spéciation. Des comparaisons de ces spectres avec des spectres d'échantillons de référence permettront d'identifier clairement ces changements de spéciation (résultats en cours d'acquisition).

En résumé, la bioturbation du ver de terre peut augmenter la bioaccessibilité gastrique humaine des ETM dans les sols par des modifications de pH du sol et de spéciation et compartimentation des ETM.

La figure V.1.13 suivante présente la bioaccessibilité gastrique du Pb, Cd, Cu et Zn dans les laitues cultivées sur du sol bioturbé (LE) et dans les laitues cultivées sur du sol standard (L). L'As et le Sb n'ont pas été étudiés car leurs concentrations dans les feuilles de laitues étaient en dessous des limites de détection (ICP-OES). Il n'a pas été observé de différence entre les 2 conditions (L) et (LE) pour tous les éléments étudiés.

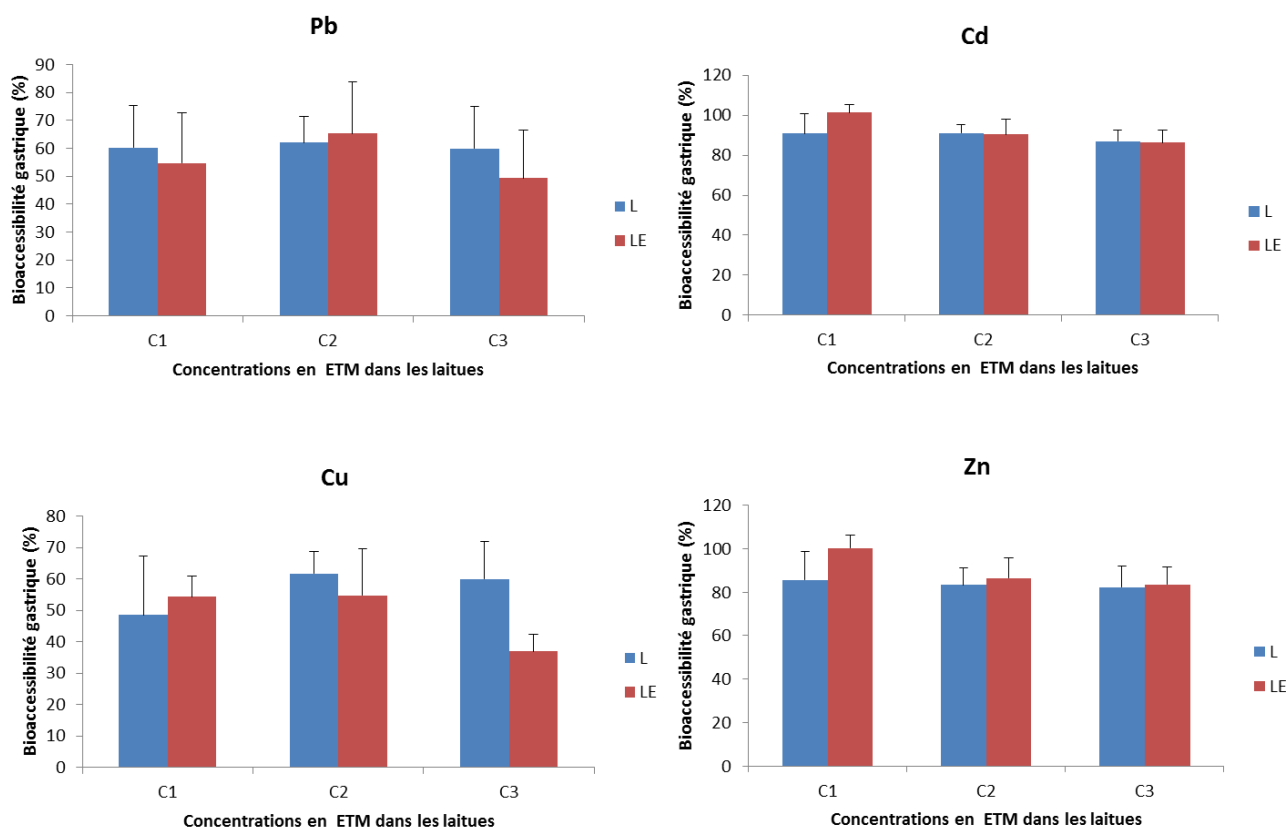


Figure V.1.13 : Valeurs moyennes et écart-types de la bioaccessibilité gastrique des ETM dans les laitues cultivées sur du sol bioturbé (LE) et les laitues cultivées sur du sol n'ayant pas hébergé de ver de terre (L).

Ceci suggère que la bioturbation des vers de terre ne modifie pas la bioaccessibilité gastrique des ETM dans les laitues. Ces résultats insinuent que, malgré les changements induits par les vers de terre, les ETM assimilés par les racines des laitues sont retrouvés sous une même forme chimique dans leurs parties aériennes. Ceci amène à penser que i) : la spéciation des ETM peut être modifiée durant leur translocation des racines vers les parties aériennes ou ii) que les éléments disponibles pour les racines des plantes sont sous une même forme chimique (Pb^{2+} , Cu^{2+} ...)

5.1.7 Conclusion

L'exposition de la population humaine aux ETM est gouvernée par la notion de biodisponibilité. Elle est fonction des interactions physiques, chimiques et biologiques qui déterminent l'absorption des contaminants d'une matrice dans la circulation sanguine. Afin de correctement estimer le niveau d'exposition des populations, il est nécessaire de prendre en considération la notion de biodisponibilité, ce qui n'est actuellement pas réalisé lors des évaluations quantitatives de risques en France. Afin d'approcher la biodisponibilité de façon simplifiée, il a été étudié l'étape de solubilisation des contaminants dans le tractus gastro-intestinal, c'est-à-dire la bioaccessibilité.

Au cours des différentes études précédemment décrites, il a pu être observé que la bioaccessibilité humaine des ETM est régie par de nombreux paramètres tels que la physico-chimie des éléments étudiés, la taille des particules, la compartimentation et la spéciation, la concentration totale, la nature de la matrice végétale, l'impact biotique etc... C'est une notion complexe qui va être en relation directe avec l'impact des ETM sur la santé humaine. La figure V.1.14 suivante résume les mécanismes et paramètres pouvant influencer la bioaccessibilité des ETM.

Les résultats obtenus dans ce chapitre ont montré que les valeurs de bioaccessibilité sont très variables d'un sol à l'autre ou encore d'un site à un autre présentant des sources de contamination identiques. Par conséquent, l'hypothèse d'une biodisponibilité identique (Par exemple, l'US EPA donne une valeur par défaut de biodisponibilité du plomb de 60%) pour l'ensemble des sites contaminés est peu crédible. Les résultats discutés ont en effet montré qu'il est difficile de prédire la bioaccessibilité d'un élément à partir des caractéristiques physico-chimiques des sols bien que certains de ces derniers puissent modifier la spéciation des ETM. La bioaccessibilité des ETM est dépendante de leur spéciation, les formes solubles du Pb telles que les carbonates ou en deuxième plan les oxydes sont hautement bioaccessibles, alors que les formes moins solubles comme les sulfides, phosphates ou sulfates le sont moins. La distribution des ETM dans les phases porteuses du sol est un paramètre important influençant leur bioaccessibilité.

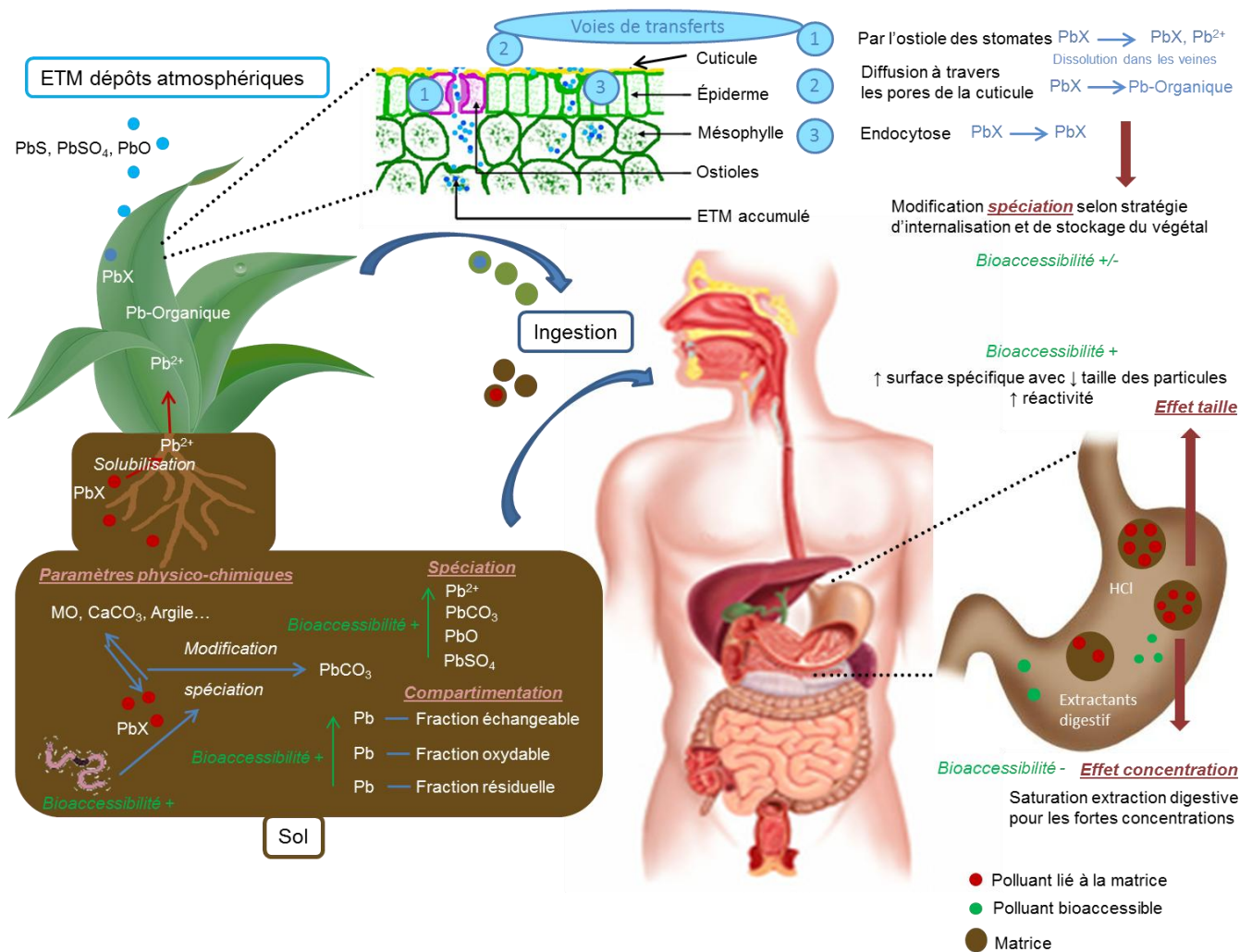


Figure V.1.14 : Schéma des différents mécanismes et paramètres influençant la bioaccessibilité des ETM

L'adsorption des ETM sur des phases insolubles du sol diminue leur bioaccessibilité et leur biodisponibilité. Ces différences de compartimentation dépendent aussi des sources de contamination. En effet selon la littérature (Caboche, 2009 ; Smith et al., 2011), les sols contaminés par des dépôts atmosphériques de fonderie présentent des ETM de formes chimiques différentes et adsorbés sur des phases porteuses plus échangeables que les sols échantillonnés sur les sites miniers. Les résultats présentés dans ce chapitre confirment cette hypothèse avec une bioaccessibilité du Pb dans les sols de l'ancien site minier de Pongibaud très inférieure à celle des sols de la STCM de Toulouse et Bazoches les Gallerandes. Il a aussi été constaté que la taille des particules peut jouer un rôle sur leur bioaccessibilité, notamment avec une augmentation de leur surface spécifique susceptible d'augmenter leur réactivité. Dans les sols fortement contaminés (<20000 mg Pb.kg⁻¹), il a été observé une saturation de l'extraction du test de bioaccessibilité *in vitro* UBM avec une concentration bioaccessible

maximale observée aux alentours de $7000 \text{ mg Pb.kg}^{-1}$ dans un sol dopé. Ce phénomène pourrait exister dans la digestion humaine, mais dans une moindre mesure du fait des volumes importants des réactifs dans le tractus gastro-intestinal. La bioaccessibilité du Pb dans des végétaux contaminés varie beaucoup en fonction du végétal pollué et des conditions d'exposition. Des changements de spéciation selon les mécanismes d'internalisation et de stockage de l'élément seraient susceptibles de modifier la bioaccessibilité. Enfin la bioturbation des vers de terre peut modifier la bioaccessibilité des ETM dans les sols, par les modifications de pH et les changements de spéciation et compartimentation des ETM qu'ils induisent.

La bioaccessibilité humaine des ETM est un phénomène complexe régie par de nombreux paramètres. Il est très donc difficile, voire illusoire de penser prédire la bioaccessibilité à partir de ces nombreux paramètres (même si certains tels que la compartimentation des ETM semblent plus robustes). Le travail réalisé ici préconise donc une mesure de la bioaccessibilité des contaminants lors des évaluations de risques sanitaires afin d'estimer de façon plus précise les risques associés à une exposition pour la population humaine. Le test de bioaccessibilité UBM est en effet une solution peu coûteuse et pertinente pour affiner la connaissance de l'exposition.

5.2. Toxicité des ETM sur les cellules épithéliales intestinales humaines

Avant-propos

La toxicité systémique des ETM est relativement bien documentée tout comme leur toxicité sur la paroi pulmonaire. En revanche, les effets potentiels des ETM sur le tractus gastro-intestinal requièrent plus d'investigations. Pourtant l'ingestion de sol et la consommation de végétaux contaminés sont considérées comme des voies majeures d'expositions majeures pour les polluants non volatils tels que les ETM (Kwon et al., 2004). Pour bien comprendre l'impact des ETM sur la santé humaine, des études de bioaccessibilité suivant leur ingestion, pourraient être complétées par des études de toxicité sur cellules épithéliales intestinales.

C'est dans ce contexte, qu'une nouvelle étude a été menée afin de répondre aux objectifs suivants : i) d'évaluer la toxicité sur les cellules épithéliales intestinales des ETM émis dans l'environnement par l'industrie métallurgique, tels que le Pb, Cd, Cu, et Zn ; ii) déterminer la responsabilité de la fraction bioaccessible des ETM dans cette toxicité.

Ces travaux ont été réalisés à l'IUF (**Research institute for environmental medicine de Düsseldorf (Allemagne)**) en collaboration avec les **Drs Roel Shins** et **Catrin Aldrecht**. Cet échange a duré 10 semaines à compter du 17 octobre 2013.

5.2.1 Matériels et méthodes

5.2.1.1 Matériel

Des particules fines (<1µm) et ultra fines (<0.1µm) monométalliques et mono-spéciation (manufacturées) ont été achetées dans le commerce chez Aldrich (CdO, CuO, PbO, PbSO₄, Sb₂O₃ and ZnO) et Acros Organics (CdCl₂). La trypsine, la solution saline tamponnée au phosphate (PBS), l'albumine de sérum bovin (ASB), le sérum fœtal bovin (SFB) ont été achetées chez Sigma (Allemagne). Le milieu de culture cellulaire (Minimum essential Medium :MEM) : a été obtenu chez Invitrogen (Allemagne) tandis que le réactif de test de prolifération cellulaire WST-1 provient du laboratoire Roche (Allemagne).

5.2.1.2 Propriétés physico-chimiques des particules

Les propriétés physico-chimiques des particules ont été déterminées dans une étude dont les résultats ont été publiés dans le journal Environmental Research. Cette publication pour laquelle je suis 2^{ème} auteur s'intitule « Environmental and health impacts of fine and ultrafine metallic particles : Assessment of threat scores ». Les expérimentations décrites ci-dessous ont été réalisées au laboratoire de Géosciences Environnement Toulouse (GET) en collaboration avec Sylvaine Goix, premier auteur de la publication.

La surface spécifique des particules a été mesurée avec la méthode Brunauer, Emmett et Teller method (BET) (Brunauer et al., 1938) avec un analyseur de micropores (Autosorb-1MP, Quantachrome®) avec du nitrogène et krypton. La taille des particules a été déterminée avec un analyseur à diffraction laser (modèle LA-950V2 ; HORIBA®).

La morphologie des particules ont été étudiées avec un microscope électronique à balayage (MEB) (modèle Jeol® JSM 6360LV) avec un voltage accéléré de 20 kV. La minéralogie des particules a été identifiée par diffraction à Rayon X en utilisant CuK_α radiation ($\lambda=1.78897 \text{ \AA}$) sur un goniomètre à rayon X (G3000, INEL).

La solubilité des particules dans un milieu de culture cellulaire a été testée afin d'évaluer le taux d'élément solubilisé durant la phase d'exposition des cellules (24h). Deux conditions ont été testées avec une incubation à 37.5°C : 1 heure d'incubation des particules dans du milieu de culture et 24 heures d'incubation dans du milieu de culture. Pour les 2 tests

la concentration des suspensions était de $4000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$. 3 fois 15 secondes de sonication avec une sonde à ultrason ont été appliquées pour obtenir une suspension homogène. A la fin de l'incubation, les particules ont été centrifugées à 4000rpm pendant 10 min. Les concentrations en ETM dans les solutions ont ensuite été analysées avec un HR-ICP-MS après haute dilution pour éviter un possible effet de matrice.

5.2.1.3 Evaluation du risque pour la santé humaine

5.2.1.3.1 Bioaccessibilité humaine

La bioaccessibilité gastrique humaine du Pb, Cd, Cu, Zn and Sb dans les particules a été évaluée avec le test de bioaccessibilité BARGE décrits dans les sections précédentes. 2 essais pour chacune des différentes particules ont été réalisés : le premier en testant 0.6mg (GB 0.6) de particules et le deuxième en modifiant le ratio liquide solide et en testant 0.1mg (GB 0.1) de particules afin de prévenir un éventuel effet de saturation. Les mesures de bioaccessibilité ont été réalisées à EcoLab (Toulouse).

5.2.1.3.2 Cytotoxicité

La lignée cellulaire d'adénocarcinome du colon humain, Caco-2 utilisée dans cette étude a été fournie par la Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, ACC 169) (Allemagne), et cultivé dans du MEM avec Earle's salt et des acides aminés non essentiels, supplémenté avec 20% SFB, 1% de L-glutamine et 30 IU/ml d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine).

L'intestin humain est en constante génération, les entérocytes non différenciés générés à partir de cellules souches migrent dans les cryptes de la villosité (intestin grêle) ou l'épithélium de surface (colon). En chemin, ils commencent à se différencier et deviennent post mitotique avant de subir l'apoptose suivie par l'excrétion cellulaire ([Ramachandran et al., 2000](#) ; [Sancho et al., 2004](#)). Il est donc nécessaire, pour correctement évaluer la cytotoxicité des ETM sur les cellules épithéliales intestinales, de travailler sur des cellules différenciées et non différenciées.

Pour les expériences les cellules ont été tripsinisées une fois atteint le niveau de confluence, c'est-à-dire une fois qu'elles se sont multipliées au point d'occuper toute la

surface du récipient de culture. Une fois atteint la confluence, les entérocytes ne peuvent plus se diviser et commencent à se différencier. 4×10^4 cellules ont été semés dans des plaques à 96 trous et remis à incuber pendant une nuit pour les cellules non-différenciées et pendant 10 jours pour obtenir des cellules différenciées. Toutes les expériences sont réalisées entre le passage des cellules 5 à 30. Les particules de PbO, PbSO₄, CdO, CdCl₂, CuO, ZnO, et Sb₂O₃ ont été mis en suspension dans le milieu de culture 1h avant l'exposition des cellules. 2 traitements ont été appliqués aux cellules : a) la suspension de particules soniquées (Sonorex TK52 bain à eau ; 60 Watt, 35kHz) pendant 10 min ou b) la solution bioaccessible des particules obtenues à l'aide du test de bioaccessibilité BARGE. Pour le traitement b) la solution a été centrifugée à 4500 rpm pendant 15 min puis neutralisé à pH neutre avec 1mg de NaHCO₃ et 200 µL de PBS. Les cellules différenciées (DF) et non différenciées (UF) ont été exposées pendant 24h aux 2 traitements. Les cellules UF ont été exposées une fois qu'elles ont atteint entre 75 et 85% de leur niveau de confluence.

La cytotoxicité des ETM a été déterminée avec le test WST-1 décrit dans la section 2.4.2.3.1. Après la période d'incubation avec les particules, les cellules ont été incubées pendant 2h (cellules non différenciées) et 30 min (cellules différenciées) avec le WST-1 et analysées selon le protocole du fabricant.

5.2.1.4 Statistiques

Toutes les moyennes ont été calculées avec trois expériences indépendantes et chaque condition a été répliquée 5 fois dans chaque expérience. Afin de détecter les différences significatives de viabilité cellulaire selon les concentrations en ETM a été réalisé avec Excel Stats software. Les CE50 ont été analysés par régression linéaire.

5.2.2 Résultats et discussion

5.2.2.1 Propriétés physico-chimiques des particules

Malgré la sonication, les observations microscopiques ont révélées que toutes les particules étudiées formées des agrégats, mesurant plus de 10 μm de diamètre dans le cas de CdCl_2 and PbSO_4 (Figure V.2.1). Les formes des particules étaient principalement sphériques ou cubiques, mais des formes fibreuses ont été distinguées pour CuO et Sb_2O_3 . La surface spécifique des particules variait entre 29.2 et $0.06\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$ dans l'ordre suivant $\text{PbO} > \text{ZnO} > \text{CuO} > \text{CdO} > \text{Sb}_2\text{O}_3 > \text{CdCl}_2 > \text{PbSO}_4$. Les surfaces spécifiques mesurées pour CuO et Sb_2O_3

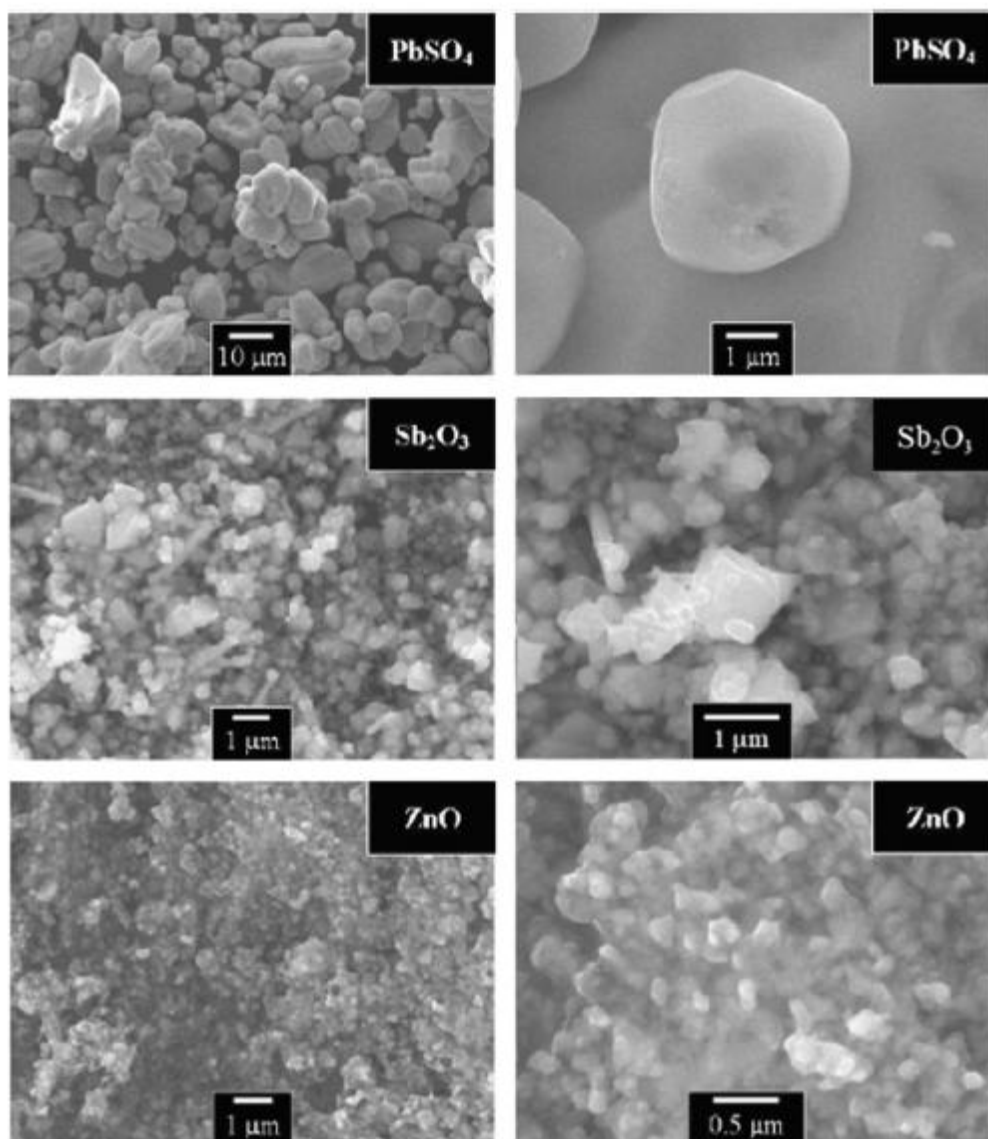


Figure V.2.1 Observations d'agrégats de particules réalisées par MEB-EDS (Goix et al., 2014)

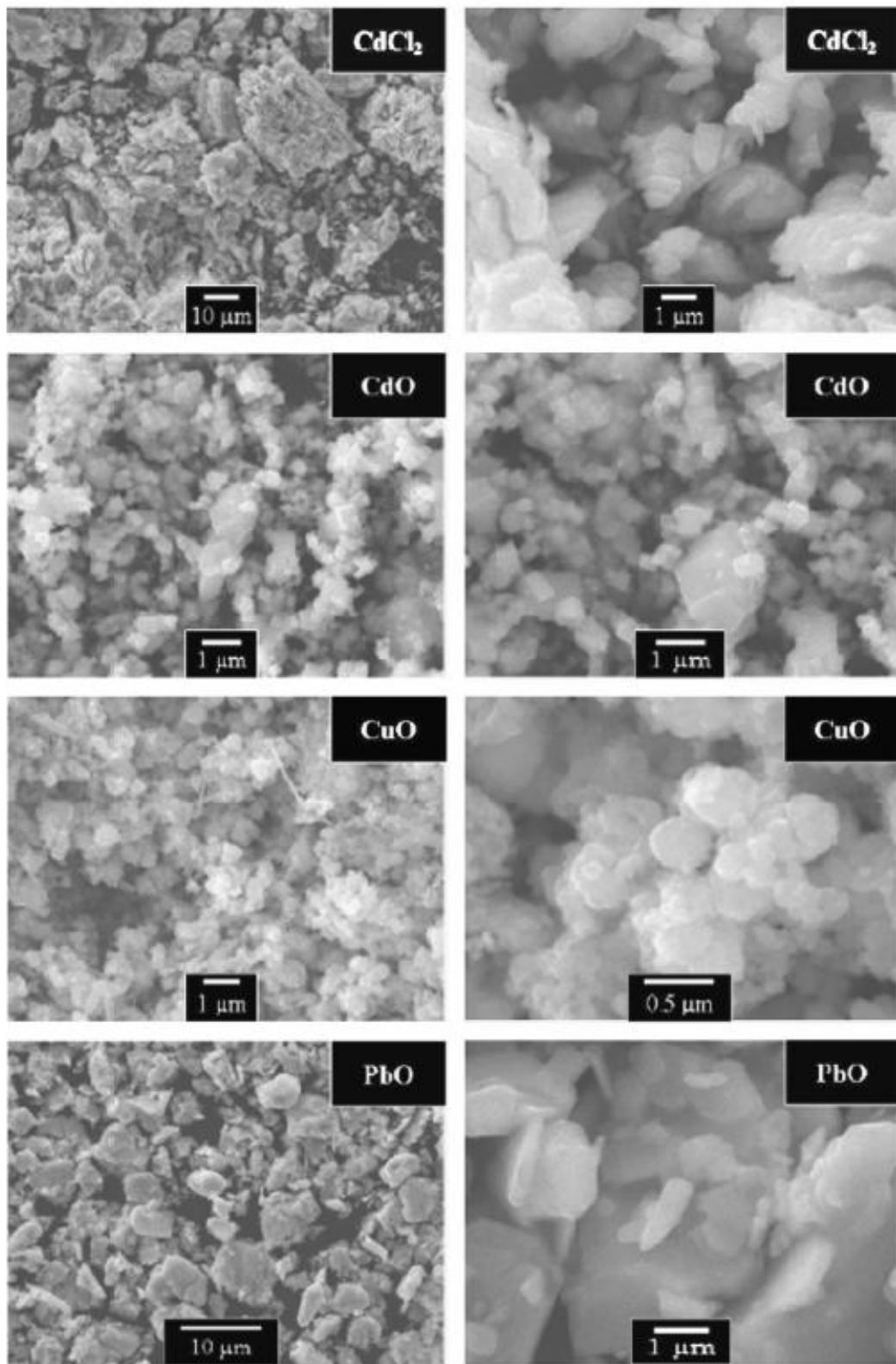


Figure V.2.1 (suite)

(12.55 et 3.93 m².g⁻¹ respectivement) sont plus faible que les valeurs certifiées par les fournisseurs (25-40 et 15.6m².g⁻¹ respectivement). Ceci est surement dû à la formation

d'agrégats comme observé dans la figure V.2.1. Étant donné leur petite taille et leur grande surface spécifique, les particules de CuO, PbO et ZnO sont susceptibles d'être très réactives. De nombreux effets biologiques indésirables sont dus à la surface spécifique des particules (Singh et al., 2007). L'agrégation des particules peut affecter leur toxicité et est généralement associé avec une diminution de leur assimilation par les cellules humaines (Tiede et al., 2008). Néanmoins, pour de nombreux types de particules agglomérées, l'assimilation par les cellules humaines a été décrites comme importante et non négligeable (Churg, 1996). Les formes fibreuses de CuO et Sb₂O₃ peuvent endommager les membranes des cellules et ainsi amener une toxicité (Fisher et al., 1989).

Une seule forme minéralogique a été identifiée pour CdO, PbSO₄ et ZnO, mais les autres particules ont montré (CdCl₂, CuO, PbO et Sb₂O₃) ont montré 2 phases minéralogiques principales avec différentes structure cristalline.

Aucune différence significative n'a été observée entre les dissolutions des ETM dans le milieu de culture pendant 1h et pendant 24h (Tab V.2.1). Ceci suggère que la dissolution des particules est un événement rapide ayant lieu dans la première heure de contact ou

Tableau V.2.1 Caractéristiques physico-chimiques des particules

Particules	Surface spécifique mesurée m ² /g	Forme minéralogique (système de cristallisation)	Fraction molaire des éléments dissous en % (mmol/L)	
			Milieu de culture 1h (a)	Milieu de culture 24h (a)
CdCl ₂	2,31	CdCl ₂ (rhomboédrique) CdCl ₂ (H ₂ O) orthorhombique	98% (10,7)	92% (10,04)
CdO	4,28	Monteponite (cubique)	1% (0,20)	2% (0,26)
CuO	12,55	CuO (orthorhombique) CuO (tétraogonal)	11% (2,76)	6% (1,51)
PbO	29,2	Massicot (orthorhombique) Litharge (tétraogonale)	0% (0,01)	0% (0,01)
PbSO ₄	0,06	Anglesite (orthorhombique)	0% (0,02)	0% (0,02)
Sb ₂ O ₃	3,93	Senarmonite (Cubique) Valentinite (orthorhombique)	1% (0,08)	1% (0,09)
ZnO	16,03	Zinците (hexagonal)	4% (1,32)	5% (1,32)

(a) Pour 4000 mg.L⁻¹ de composés dans la solution

pendant la phase de sonication. Dans le milieu de culture cellulaire, la solubilité des particules variait de 98% à en dessous des limite de détection (DL) dans cet ordre : $\text{CdCl}_2 > \text{CuO} > \text{ZnO} > \text{CdO} = \text{Sb}_2\text{O}_3 > \text{PbSO}_4 = \text{PbO}$. CdCl_2 est la particule la plus soluble avec une solubilité $> 90\%$. Les autres particules ont montré un taux de dissolution faible $< 10\%$.

5.2.2.2 Bioaccessibilité gastrique des particules

Les mesures de bioaccessibilité gastrique des particules sont présentées dans le tableau V.2.2. GB 0.6 variait entre 9.8% et 0.2% dans cet ordre $\text{CdO} > \text{PbSO}_4 = \text{ZnO} > \text{CuO} > \text{PbO} > \text{Sb}_2\text{O}_3$, tandis que GB 0.1 variait entre 89.1% et 0.25% dans cet ordre $\text{CdCl}_2 > \text{CdO} > \text{ZnO} > \text{PbO} > \text{CuO} > \text{PbSO}_4 > \text{Sb}_2\text{O}_3$. Les valeurs des GB 0.6 sont très faibles comparées à celles qui ont pu être observées sur les sols et les végétaux dans la section précédente (section 5.1) et celles dans la littérature : 12-60% pour Pb, 24-86% pour Cd, 6.9-70% pour Zn, 12-60% pour Cu et 1.5-12% pour Sb (Barsby et al., 2012 ; Denys et al., 2009 ; Wragg et al., 2011). Ces faibles valeurs peuvent être attribuées à un effet de saturation de l'extraction digestive déjà décrit dans la section 5.1.2. Le test de bioaccessibilité BARGE a été créé pour évaluer la bioaccessibilité des ETM dans les sols et ainsi dilués dans les phases minérales ou organiques. Les très fortes concentrations appliquées ici avec les poudres mono-élémentaires pourraient engendrer un effet de saturation de la solution et ainsi diminuer leur bioaccessibilité. Les valeurs de GB 0,1 étaient plus en accord avec les données de la littérature avec les particules

Tableau V.2.2 : Bioaccessibilité gastrique (%) pour le test avec 0.1g (GB 0.1) et 0.6g (GB 0.6)

Particules	GB 0,6 (%)	BG 0,1 (%)
CdCl₂	n.d	89,1 ± 1,6
CdO	9,81 ± 1,0	87,3 ± 1,0
CuO	5,32 ± 0,3	71,0 ± 4,3
PbO	4,05 ± 0,5	73,5 ± 1,5
PbSO₄	9,17 ± 0,3	2,8 ± 0,2
Sb₂O₃	0,2 ± 0,0	0,25 ± 0,0
ZnO	8,85 ± 0,3	81,56 ± 0,5

de Cd montrant la bioaccessibilité la plus haute et les particules de Sb la plus basse. Pour les particules de Pb, PbO a montré une bioaccessibilité significativement plus élevée que le PbSO₄ (73,5 et 2,8% respectivement), comme précédemment décrit dans la section 5.1.3 et dans la littérature (Davis et al., 1993 ; Han et al., 1992) pour la bioaccessibilité de ces éléments dans les sols. La GB 0,1 du ZnO est assez haute comparée aux valeurs de la littérature dans les sols, possiblement dû à des spéciations et compartimentations plus stable de cet élément dans les sols (Roussel et al., 2009). Finalement, en augmentant le ratio solide liquide et ainsi diminuant l'effet de saturation, la GB 0,1 apparait plus pertinente pour évaluer la bioaccessibilité des particules.

5.2.2.3 Cytotoxicité intestinale des particules

5.2.2.3.1 Validation inter-manipulateur

Afin de vérifier si les expérimentations effectuées par un nouveau manipulateur, dans un autre laboratoire sont correctement réalisées, il est nécessaire de comparer ses résultats avec ceux déjà obtenus sur une même molécule. La figure V.2.2 présente les résultats de viabilité cellulaire des Caco-2 indifférenciées évaluée avec le test WST-1, après exposition à des concentrations croissantes de ZnO. Aucune différence significative n'a été trouvée entre les résultats obtenus au cours de la présente étude et ceux déjà observés dans ce laboratoire. Ceci permet de valider les conditions opératoires appliquées au cours de cette étude.

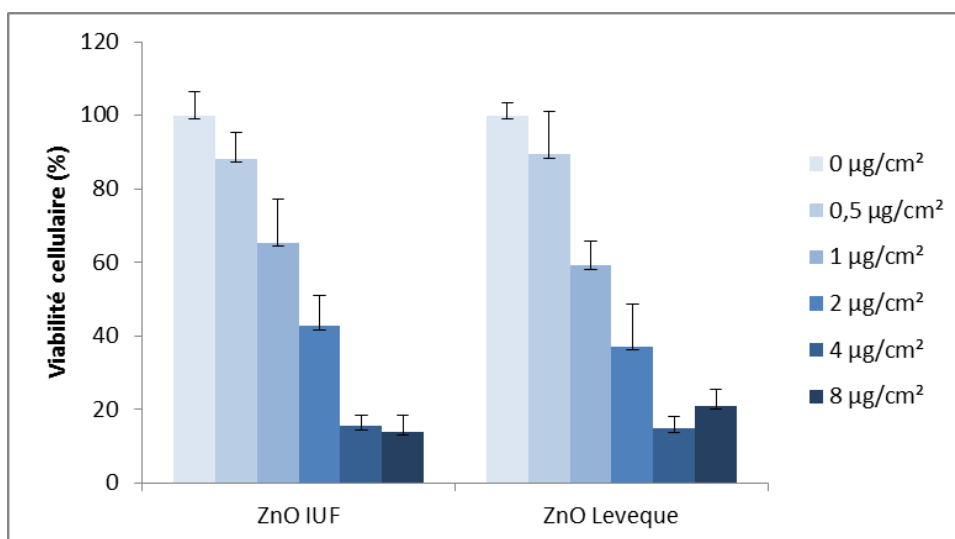


Figure V.2.2 : Effets du ZnO sur la viabilité cellulaire des Caco-2 non-différenciées évaluée par le test WST-1. Comparaison entre les résultats obtenus par le manipulateur Leveque (ZnO Leveque) et ceux précédemment observés à l'IUF. (ZnO IUF). Les valeurs présentent les moyennes et les écarts-types (n=3).

5.2.2.3.2 Evaluation de la cytotoxicité de la solution bioaccessible

Afin d'imiter les conditions intestinales suite au rejet pancréatique de bicarbonate, les solutions bioaccessibles ont été neutralisées avec une solution de bicarbonate et PBS jusqu'à un pH de 7.5. Pour savoir si la composition de la solution bioaccessible pourrait induire une toxicité sur les Caco-2, des solutions témoins (sans ETM) ont été testées sur les cellules aux mêmes dilutions utilisées pour celles contenant les ETM. Les résultats de viabilité cellulaire après 24h d'exposition à ces solutions sont présentés dans les graphiques ci-dessous (Fig. V.2.3). Les concentrations indiquées représentent les dilutions nécessaires dans le milieu de culture pour obtenir ces concentrations avec les solutions contenant les ETM. Pas de toxicité n'a été observée sur les Caco-2 non différenciées excepté à la plus forte concentration pour laquelle la viabilité cellulaire est de 86.7%. En revanche, une légère toxicité non dose dépendante (82,56% en moyenne) a été observée aux concentrations appliquées sur les Caco-2 différenciées. Ces résultats n'invalident pas les conditions expérimentales. Il faudra tout de même, par la suite, prendre en compte la légère baisse de viabilité cellulaire des cellules différenciées dans la discussion des résultats.

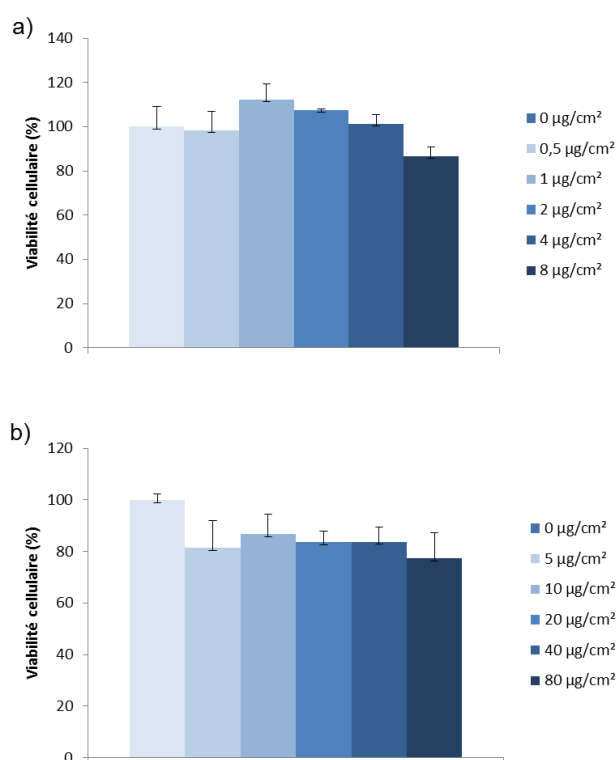


Figure V.2.3 : Effets de la solution bioaccessible témoin sur la viabilité cellulaire des Caco-2 non différenciées a) et différenciées b) évaluée par le test WST-1. Les valeurs présentent les moyennes et les écart-types (n=3).

5.2.2.3.2 Evaluation de la cytotoxicité des ETM

Les figures V.2.4 et V.2.5 montrent la viabilité des cellules épithéliales intestinales après 24h d'exposition aux particules de PbSO_4 , Sb_2O_3 , CdCl_2 , CdO , CuO , ZnO et PbO . Le spectre des concentrations variant de 0 à $80 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a été choisi afin de rester dans des cas réalistes d'exposition par ingestion de sols ou végétaux contaminés. La figure V.2.5 montre les différences de toxicité sur les Caco-2 non-différenciées (a) et différenciées (b) induites par i) les particules diluées dans le milieu de culture (ex: CuO) et ii) les fractions bioaccessibles de ces particules acquises à l'aide du test de bioaccessibilité BARGE (ex : CuO b). Cette comparaison a été réalisée afin d'évaluer la responsabilité de la fraction bioaccessible des ETM dans la cytotoxicité. Les fractions bioaccessibles des particules ont été testées aux concentrations correspondantes à la bioaccessibilité des particules (ex : Concentration testée $\text{CdO} = 8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \rightarrow$ Concentration testée $\text{CdO b} = 8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2} \times 87.3\% = 6.98 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Les fractions bioaccessibles sont majoritairement composé par l'élément solubilisé (Pb^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} ...). Les fractions bioaccessibles de PbSO_4 et Sb_2O_3 n'ont pas été testées étant donné leur faible taux de bioaccessibilité.

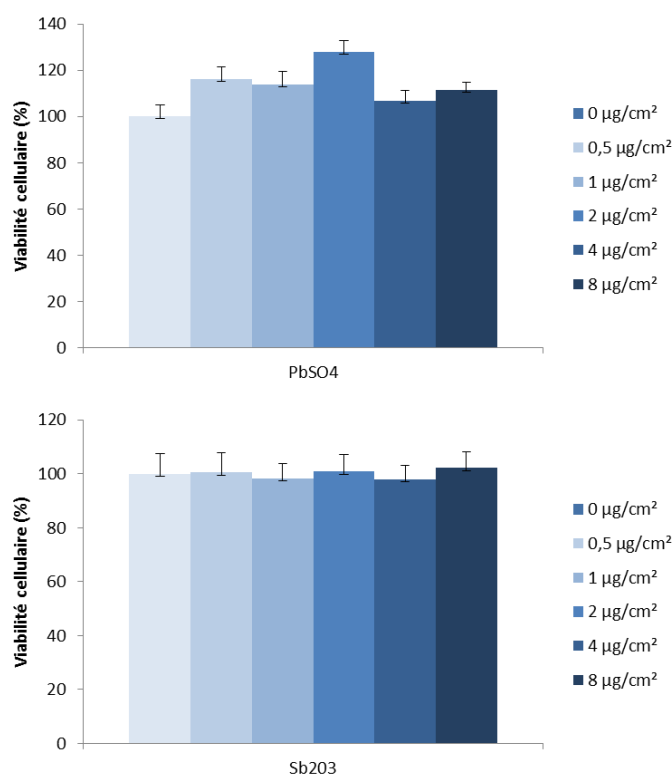


Figure V.2.4 : Effets du PbSO_4 et Sb_2O_3 sur la viabilité cellulaire des Caco-2 non-différenciées (UF) évaluée par le test WST-1. Les valeurs présentent les moyennes et les écarts-types ($n=3$).

PbO, PbSO₄ et Sb₂O₃ n'ont pas induit de cytotoxicité, ni sur les Caco-2 UF ni sur les DF, aux concentrations testées. PbO b a induit une légère cytotoxicité non dose-dépendante sur les Caco-2 DF (80,4% en moyenne de viabilité par rapport au témoin). Cet effet correspond à la tendance observée lors du test de la solution bioaccessible témoin. Il peut donc être considéré que le Pb n'est pas responsable de cette toxicité mais plus la composition de la solution bioaccessible. Cette absence de cytotoxicité du Pb a déjà été reporté par nos travaux sur les cellules épithéliales pulmonaires (Goix et al., 2014). Ceci ne peut être expliqué seulement par un manque de solubilité des particules de Pb, étant donné que la fraction bioaccessible (majoritairement Pb²⁺) n'induit pas de cytotoxicité. Pour Sb₂O₃, des études précédentes ont montré des résultats similaires avec une absence de cytotoxicité sur toutes les lignées cellulaires testées, cependant il a été mise en évidence une toxicité sélective sur le développement des colonies érythroïdes (Bregoli et al., 2009) Pour les autres particules, CdCl₂, CdO, CuO, ZnO, il a été observé une cytotoxicité dose dépendante sur les Caco-2 UF et DF. Le tableau V.2.3 présente les CE50 des Caco-2 UF et DF exposées aux particules pendant 24h. Les CE50 des Caco-2 DF étaient toujours significativement plus élevées (p<0.05), comparées à celles des Caco-2 UF. Ainsi, pour les cellules différenciées (DF), une dose plus importante de particules est nécessaire pour obtenir des effets toxiques comparables à ceux observés sur les cellules UF.

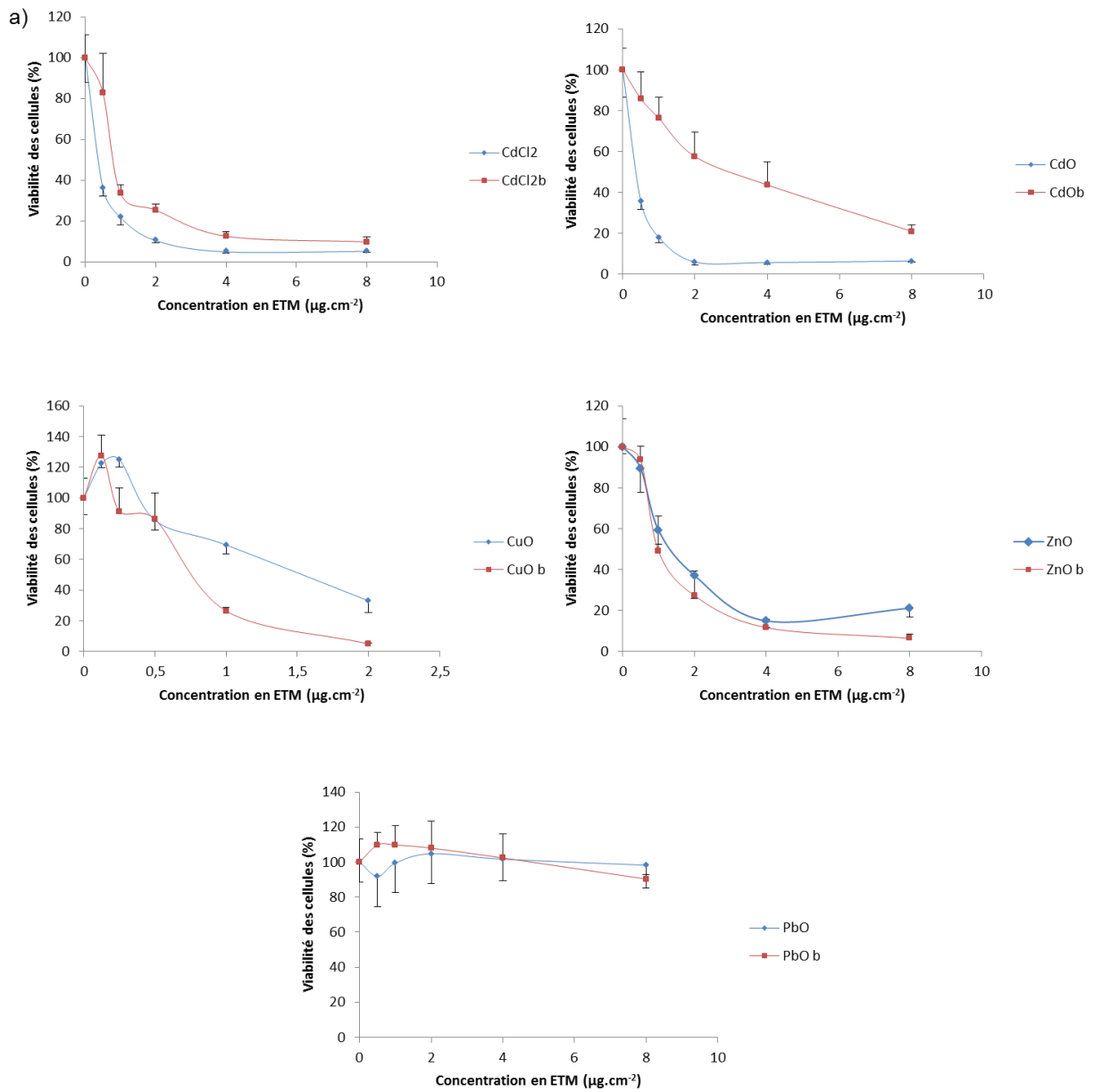


Figure 5.2.5 : Viabilité des Caco-2 UF (a) et DF (b) (en % du témoin \pm écart-types) après 24h d'exposition aux particules (bleu) et à leurs fractions bioaccessibles (rouge) (Test WST-1).

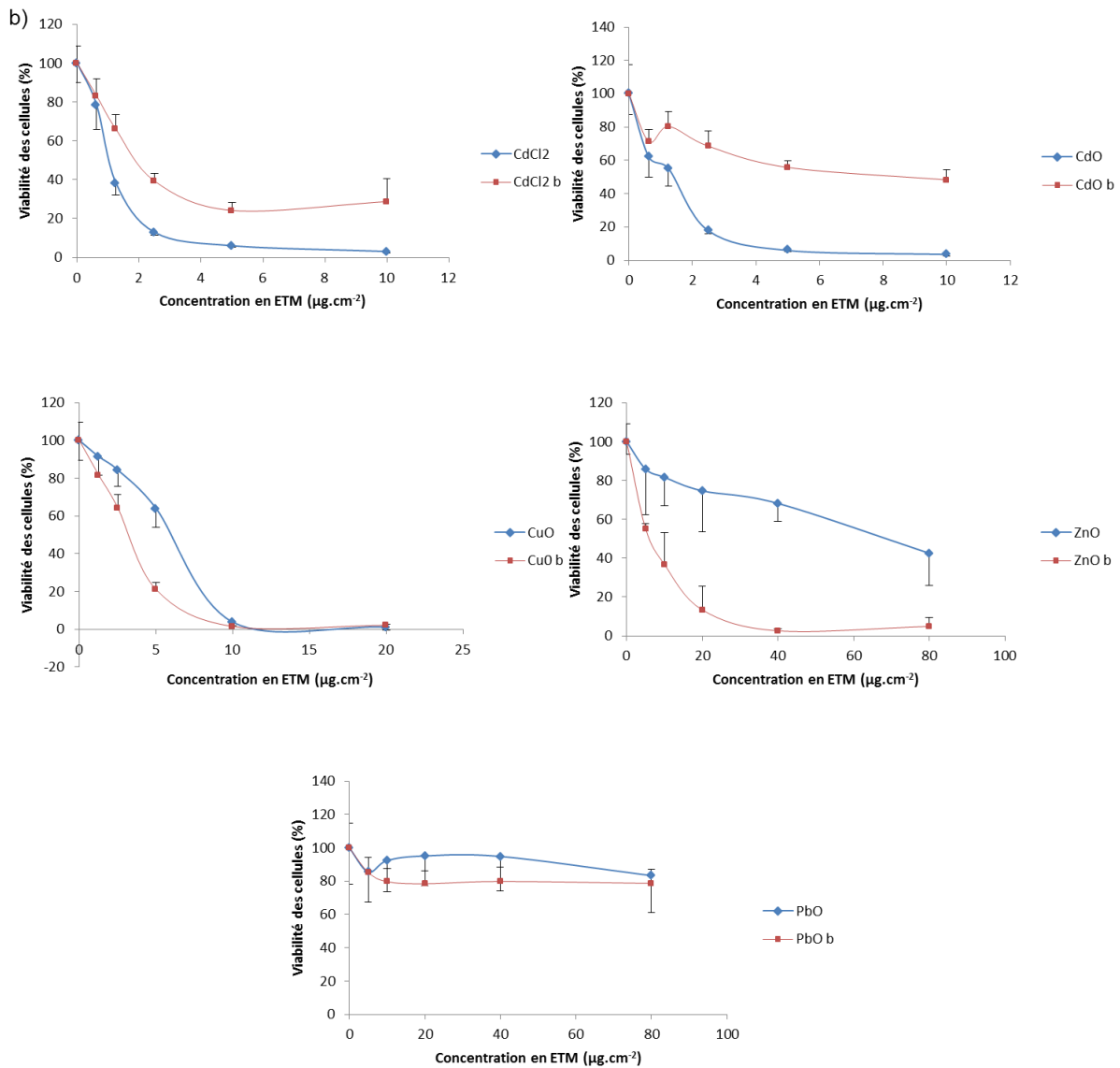


Figure V.2.5 (suite)

Il doit être noté que, en plus de la confluence et des processus de différenciation, une quantité de cellules 3 fois supérieure a été reportée dans les puits contenant des cellules DF comparé à ceux contenant des cellules UF à 80% de confluence (Gerloff et al., 2012). Cependant, même en tenant compte d'un ajustement de 3 fois la dose, des différences marquées restent présentes. Par exemple, les CE50 du Cu et du Zn, pour les Caco-2 DF sont au minimum 4 fois plus élevées que pour les UF. Ainsi, les contrastes observés dans la sensibilité ne peuvent être expliqués par de simples différences dans le nombre de cellules, mais par des changements physiologiques qui dépendent de la différenciation des cellules (Gerloff et al., 2012). Ceci indique que la différenciation des cellules épithéliales intestinales peut influencer leur réponse

aux agents toxiques. Mais ce phénomène est moins marqué pour certains contaminants. En effet, les facteurs d'augmentation des CE50 du Cd pour les Caco-2 DF variaient entre 2.1 et 3.6, ce qui correspond à l'augmentation du nombre de cellules dans les puits des DF. Les cellules UF et DF sont donc aussi sensibles à une contamination en Cd, et les mécanismes de tolérance apportés par la différenciation des cellules sont dépendants de l'agent toxique.

Tableau V.2.3 : CE 50 pour les Caco 2 non différenciées (UF) et différenciées (DF) après 24h d'exposition à différents ETM.

	CE50 ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)	
	Caco-2 UF	Caco-2 DF
CdCl ₂	0,39	1,07
CdCl ₂ b	0,83	1,75
CdO	0,39	1,42
CdO b	3,1	8,88
CuO	1,5	6,16
CuO b	0,8	3,33
ZnO	1,41	68,4
ZnO b	0,89	6,41

Le Zn induit une cytotoxicité dose-dépendante sur les Caco-2 UF et DF (Figure V.2.5). Sur les cellules UF, les effets de ZnO et de sa fraction bioaccessible ZnO b sont similaires, il a tout de même été observé une légère augmentation de toxicité en faveur de ZnO b avec un CE50 =0,89 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ contre 1,41 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour ZnO. En revanche, pour les cellules DF une différence significative ($p<0.001$) marquée a été mis en évidence entre la toxicité induite par ZnO et celle induite par ZnO b avec des CE50 respectives de 68,4 et 6.41 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. La dissolution du ZnO dans le milieu de culture étant très faible (5% à 24h), ceci suggère un effet à la fois lié aux particules et au Zn²⁺ (fraction bioaccessible) sur les cellules UF, mais un effet principalement conduit par le Zn²⁺ pour les cellules DF. La différenciation des cellules épithéliales intestinales est connue pour réduire leur réponse pro-inflammatoire (Böcker et al., 2000, Gerloff et al., 2012). La cytotoxicité peut être induite par une réponse inflammatoire due au contact entre les particules et les cellules, et leur différenciation pourrait ainsi réduire les effets adverses de ZnO. Ainsi la fraction bioaccessible ZnO b se révèle majoritairement responsable de la cytotoxicité du Zn sur les cellules DF.

Comme le Zn, le Cu induit une cytotoxicité dose dépendante sur les Caco-2 UF et DF. Cependant pour les cellules UF, il a été observé une prolifération cellulaire après exposition aux plus faibles doses de CuO et CuO b (0.125 et $0.25 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Le cuivre est un élément essentiel et impliqué dans la production d'énergie des cellules (Ishida et al., 2010). Ainsi, une dose non cytotoxique de Cu produirait un effet bénéfique sur les cellules et induirait une prolifération cellulaire. Cet effet n'a pas été observé pour les cellules DF, ce qui est parfaitement logique vu que ces cellules sont 100% confluentes et n'ont plus d'espace pour se diviser contrairement aux cellules UF à 80% confluentes. Une diminution d'un facteur 2 a été mise en évidence entre les CE50 de CuO et de sa fraction bioaccessible CuO b pour les Caco-2 UF et DF. La fraction bioaccessible CuO b est donc cytotoxique à plus faible dose que les particules qui ont un faible taux de dissolution (6% à 24h). Mais à partir d'une certaine concentration, les 2 conditions induisent presque 100% de mortalité des cellules UF et DF (>2 et $10 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$). Ceci indique que, à la fois l'internalisation de particules par les cellules et les interactions avec l'élément solubilisé (fraction bioaccessible = majoritairement Cu^{2+}) pourrait contribuer à la mortalité des cellules intestinales épithéliales. De plus, il a été vu que CuO pouvait être trouvé sous forme fibreuse, ce qui peut augmenter la cytotoxicité des particules en endommageant la membrane des cellules. La fraction bioaccessible CuO b induit dans tous les cas une forte toxicité sur les cellules épithéliales intestinales.

Le Cd induit une cytotoxicité dose-dépendante sur les Caco-2 UF et DF. Les particules de CdCl_2 et leurs fractions bioaccessibles CdCl_2 b ont montré une cytotoxicité similaire sur les cellules UF et DF. CdCl_2 étant presque complètement soluble (92% à 24h) et sa fraction bioaccessible (bioaccessible à 89.1%) majoritairement composé de Cd^{2+} , cette cytotoxicité similaire n'est pas étonnante. Ceci suggère que Cd^{2+} , solubilisé dans le milieu et la solution bioaccessible, joue un rôle important dans la mortalité cellulaire. Ceci est en accord avec de précédentes études mettent en avant l'effet cytotoxique de Cd^{2+} (Nishimura et al., 2006). Néanmoins, CdO induit la même cytotoxicité que CdCl_2 avec exactement les mêmes CE50 pour les cellules UF ($0.39 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$) et très proches pour les cellules DF (CE50 CdO= 1.42 et CE50 CdCl_2 =1.07. La cytotoxicité du CdO est donc fortement liée aux particules qui ont une surface spécifique relativement faible ($4,28\text{m}^2\cdot\text{g}^{-1}$) et non à la très faible fraction de Cd^{2+} solubilisé dans le milieu de culture (2% à 24h). La cytotoxicité du Cd ne semble donc pas liée à sa forme (solubilisée ou non). La CE50 de CdO est apparue significativement moins élevée que celle de sa fraction bioaccessible CdO b pour les cellules UF et DF (Tableau V.2.3). Ceci est assez difficile à expliquer, vu que les fractions bioaccessibles CdCl_2 b et CdO b devraient

être pareillement composés (Cd^{2+}). Il est possible que les ions libres de Cd aient précipité, lors de la neutralisation de la solution bioaccessible avec le NaHCO_3 , sous une forme moins cytotoxique ($\text{CdCO}_3\dots$). Dans tous les cas, contrairement au Zn et au Cu, la fraction bioaccessible du Cd semble moins responsable de la cytotoxicité que les particules.

La cytotoxicité des particules est classée dans l'ordre suivant pour les cellules UF : $\text{CdCl}_2 = \text{CdO} > \text{CuO b} > \text{CdCl}_2 \text{ b} > \text{ZnO b} > \text{ZnO} > \text{CuO} > \text{CdO b} > \text{PbO} = \text{PbSO}_4 = \text{Sb}_2\text{O}_3$ et dans celui-ci pour les cellules DF : $\text{CdCl}_2 > \text{CdO} > \text{CdCl}_2 \text{ b} > \text{CuOb} > \text{CuO} > \text{ZnOb} > \text{CdOb} > \text{ZnO} > \text{PbO} = \text{PbSO}_4 = \text{Sb}_2\text{O}_3$. Ceci suggère une différence de réponse aux agents toxiques avec la différenciation cellulaire.

5.2.3 Conclusion

En conclusion, il a été reporté, dans cette étude, différentes réponses des cellules épithéliales intestinales aux ETM. PbSO_4 , Sb_2O_3 , PbO n'ont pas induit de cytotoxicité aux doses testées et cela malgré une haute surface spécifique mesurée pour PbO . De plus, la fraction bioaccessible du Pb n'a pas montré de cytotoxicité, son faible taux de solubilité dans le milieu de culture n'en est donc pas la cause. Le Pb n'est donc pas cytotoxique sur les cellules épithéliales intestinales aux doses testées.

La différenciation des cellules épithéliales intestinales est un processus constant dans le système digestif humain. Il a pu être observé que la réponse aux agents toxiques est influencée par l'état de différenciation des cellules. Les Caco-2 non-différenciées (UF) sont plus sensibles à la toxicité des particules et sont donc un bon modèle initial d'évaluation des risques. Cependant, la physiologie des Caco-2 différenciées (DF) est plus proche de celle de l'épithélium intestinal. La combinaison des deux modèles cellulaires pourrait donc être l'outil le plus utile pour des batteries de test de toxicité et d'évaluations des risques sanitaires.

CdCl_2 , CdO , CuO et ZnO ont induit une cytotoxicité importante sur les cellules épithéliales intestinales. Différents mécanismes possibles de toxicité ont été mis en évidence. A l'exception du Cd, il a pu être observé que la fraction bioaccessible des ETM conditionne en grande partie leur toxicité. Ce phénomène est décrit par le schéma suivant (Figure V.2.6). Pour certains éléments, évaluer la fraction bioaccessible permettrait donc de prédire la toxicité de ces derniers sur la paroi du tube digestif.

Des résultats de transferts des ETM à travers une couche de cellules épithéliales intestinales sont en cours de traitement. Une fois acquis, ils permettront d'évaluer la biodisponibilité des ETM à travers la barrière intestinale.

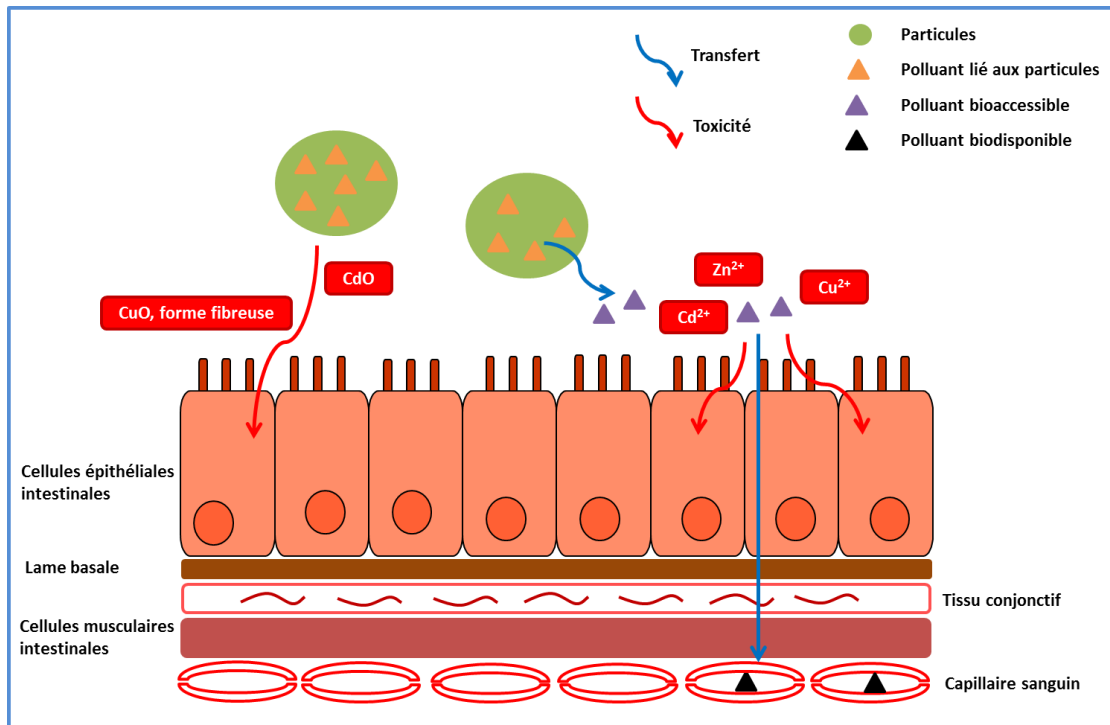


Figure V.2.6 : Schéma du lien entre toxicité des particules et leur fraction bioaccessible.

Conclusions générales et Perspectives

► Au cours de ma thèse, j'ai investigué les risques environnementaux et sanitaires induits par les sols pollués par les ETM. L'objectif était double :

- (i) étudier de façon individuelle l'écotoxicité, la toxicité, la biodisponibilité et
- (ii) étudier de façon croisée ces paramètres afin d'éclairer les interactions et les mécanismes en jeu dans les systèmes complexes sol-vers de terre-métaux-plantes.

La biodisponibilité des ETM est le thème central de ce projet.

► En conditions contrôlées, les ETM ont impacté la biomasse des vers de terre et leur activité : production de turricules et capacité d'enfouissement de la matière organique de surface. Les vers de terre ont montré une sensibilité significativement différente aux ETM selon le sol dans lequel ils évoluent. Ainsi, certains paramètres physico-chimiques du sol ont été clairement identifiés comme influençant l'écotoxicité des ETM. Ces variations de d'écotoxicité se sont révélées pour partie dues à des différences d'assimilation des ETM par les vers de terre, donc leur **biodisponibilité** pour les vers de terre. La biodisponibilité des ETM pour les vers de terre est fortement influencée par le taux de matière organique et le pH du sol. Sur site contaminé, les communautés de vers de terre se sont montrées sensibles à un gradient de concentration en ETM induit par la distance à l'usine. Aucune espèce de ver de terre n'a été trouvée dans les zones les plus polluées de 0 à 20m de l'usine ($>5000 \text{ mg Pb.kg}^{-1}$). Avec l'éloignement à l'usine et la diminution des concentrations en ETM dans les sols, la densité et la diversité des vers dans le sol ont augmenté. Les espèces endogées se sont montrées plus sensibles aux ETM que les espèces anéciques et n'ont été récoltées qu'à partir de 100m de l'usine ($< 1030 \text{ mg Pb.kg}^{-1}$). Une espèce anécique, *A. longa*, présentant une tolérance plus grande aux ETM a pu être identifiée, et était majoritaire dans les zones les plus contaminées. Enfin, il a été décrit un effet des ETM sur le ratio (vers juvénile/vers adultes), avec une sensibilité plus importante des vers juvéniles et un possible impact des ETM sur la reproduction des vers de terre. Les études écotoxicologiques ont donc généré des données

améliorant les connaissances sur les paramètres d'intérêt et les mécanismes en jeu et aussi permis d'établir les conditions expérimentales requises pour l'étude suivante d'influence de la **bioturbation des vers de terre** sur le transfert des ETM. En effet, afin d'évaluer l'impact d'un organisme vivant sur un phénomène (ici le transfert sol- plante des ETM), il est indispensable de se placer dans des conditions de faible écotoxicité qui garantissent une activité relativement normale de cet organisme vivant (ici le ver de terre).

► Mieux cerner l'impact de la bioturbation des vers sur la qualité des végétaux cultivés sur des sols pollués et consommés par l'homme, était un autre objectif de la thèse nécessitant l'étude de systèmes complexes et visant la compréhension des mécanismes. La bioturbation des vers de terre a significativement influencé la **phytodisponibilité** des ETM étudiée en mésocosmes. Les concentrations en Pb et en Cd dans les feuilles de laitues ont augmenté d'environ 50% avec l'activité des vers de terre et ce sans changement de la fraction échangeable des métaux étudiée par extractions chimiques (CaCl_2 et EDTA). Une étude tomographique des sols des mésocosmes a éclairé le rôle prépondérant de l'impact des vers de terre sur la structure du sol dans la phytodisponibilité. Ensuite, pour vérifier cette hypothèse du rôle prépondérant des changements de structure induits par la bioturbation du vers sur la phytodisponibilité des ETM et affiner la compréhension des mécanismes, le RHYZOtest® a été utilisé afin de s'absoudre de l'impact physique du ver de terre et de focaliser sur le sol rhizosphérique. Une augmentation de la phytodisponibilité des ETM a été de nouveau observée avec l'activité des vers de terre dans ce cas. Des changements de spéciation et compartimentation des ETM et les interactions vers de terre/micro-organismes/ETM seraient dans ce cas les mécanismes à l'origine des changements de phytodisponibilité.

► L'ingestion de sols et végétaux contaminés est la principale source d'exposition aux ETM pour les populations humaines. L'évaluation quantitative des risques sanitaires associés à leurs ingestions, telle qu'elle est pratiquée en France, ne prend pas en compte la notion de **biodisponibilité**. Or, la **bioaccessibilité** permet d'approcher la biodisponibilité de façon opérationnelle, et elle peut être évaluée à l'aide d'un test in vitro, le test BARGE. Nos études ont montré que la bioaccessibilité humaine des ETM est un **phénomène complexe** régie par de nombreux paramètres tels que les paramètres physico-chimiques des sols, la taille des particules, la compartimentation et la spéciation, la concentration totale, la nature de la matrice végétale, l'impact biotique etc... Il paraît donc difficile de prédire la bioaccessibilité à partir de ces nombreux paramètres. Le **test de bioaccessibilité BARGE** apparaît donc comme une solution fonctionnelle, peu coûteuse et pertinente pour évaluer le niveau d'exposition aux

ETM de la population humaine. Malgré sa toxicité systémique reconnue, le Pb n'a pas induit de cytotoxicité sur les cellules épithéliales intestinales humaines. En revanche, le Cd, le Cu et le Zn ont provoqué une cytotoxicité importante. Il a pu être observé que la **fraction bioaccessible** de ces ETM conditionne en grande partie leur toxicité.

► Un des grands objectifs de cette thèse a été d'explorer les différentes possibilités de **biotest** et **outils** afin d'améliorer et faciliter **l'évaluation des risques** d'exposition aux ETM pour les écosystèmes et les populations humaines. Dans plusieurs expérimentations indépendantes, en microcosmes, en mésocosmes et sur site contaminé, nous avons rapporté de fortes corrélations entre les concentrations en Pb, Cd, As et Sb dans les sols et dans les vers de terre. Ainsi les vers de terre se sont révélés être de très bons **bio-indicateurs** de la contamination des sols pour ces éléments. De plus, au cours de nos travaux, nous avons montré la pertinence de tests écotoxicologiques adaptés aux rôles écologiques du ver de terre dans les sols. Ainsi l'utilisation de tests indicateurs des réponses à la fois physiologiques et comportementales des vers de terre est préconisée. En effet la **cast production** s'est révélée être un paramètre écotoxicologique sensible et un proxy pour évaluer l'activité de bioturbation du ver de terre. Mais aussi, le « **test de la paille** », qui a permis de mettre en évidence l'impact des ETM sur la capacité d'enfouissement de la matière organique de surface par les vers anéciques. La **cartographie** d'un site contaminé à l'aide de SIG a permis de mettre en valeur les résultats d'une étude écotoxicologique sur les vers de terre. Les résultats ainsi présentés sont plus faciles à visualiser et à interpréter pour les responsables d'entreprise à risques. De plus ce type d'outil est efficace pour modéliser un historique de pollution et peut faciliter la communication avec les organismes de surveillance. Ainsi la cartographie se révèle être un outil très précieux pour les gestionnaires d'ICPE.

► Pour estimer la **phytodisponibilité** des ETM, l'étude en mésocosmes est une méthodologie solide mais très contraignante. Ceci au niveau des quantités de sols (plus de 500 kg de sols ont été nécessaires pour notre étude), d'organismes vivants (ici vers de terre et laitues), de travail de préparation (récolte de sols contaminés, tamisages...) et d'entretien (arrosage...). Les extractions chimiques au CaCl_2 et EDTA quant à elles sont dans ce cas peu pertinentes pour évaluer l'impact d'un organisme vivant sur la biodisponibilité des ETM. Le **RHYZOTest®** est moins contraignant à tout point de vue (quelques grammes de sols, hydroponie ect...). Il a permis d'obtenir des résultats (concentrations dans les parties

aériennes des laitues) relativement proches de ceux obtenus par l'expérimentation en mésocosmes. De plus, il a été trouvé pertinent pour estimer un **impact biotique** sur la phytodisponibilité des ETM. RHYZOtest® semble donc un outil opérationnel pour évaluer la phytodisponibilité des ETM. La **bioaccessibilité** humaine étant régie par de très nombreux paramètres, nos travaux préconisent l'utilisation du test de bioaccessibilité BARGE pour les évaluations de risques sanitaires associés à l'ingestion de sols et végétaux contaminés. La **combinaison de test** sur les cellules différenciées (UF) et non différenciées (DF) s'est montrée la méthodologie la plus pertinente pour évaluer la cytotoxicité des ETM sur la paroi intestinale. Ainsi ces travaux de thèse ont permis de générer de nouvelles données et d'éclaircir sur les mécanismes de toxicité et de transferts des ETM à plusieurs niveaux au cours du transport de ces derniers dans un écosystème. Ceci est représenté par le schéma ci-dessous (Figure V.1). Il peut y être observé le travail de monitoring réalisé à l'aide de différents outils, à partir du rejet des particules riches en ETM par les activités industrielles jusqu'à la consommation de matrice contaminée par la population humaine. En passant par : i) une étude de l'écotoxicité des ETM sur un organisme-clé du sol, le ver de terre, ii) une étude de son influence sur le transfert sol/plante des ETM et enfin iii) une étude d'évaluation des risques associés à l'ingestion de végétaux et sols contaminés. Tous ces travaux montrant finalement que la **biodisponibilité des ETM** joue un rôle majeur dans leur **(éco)toxicité**.

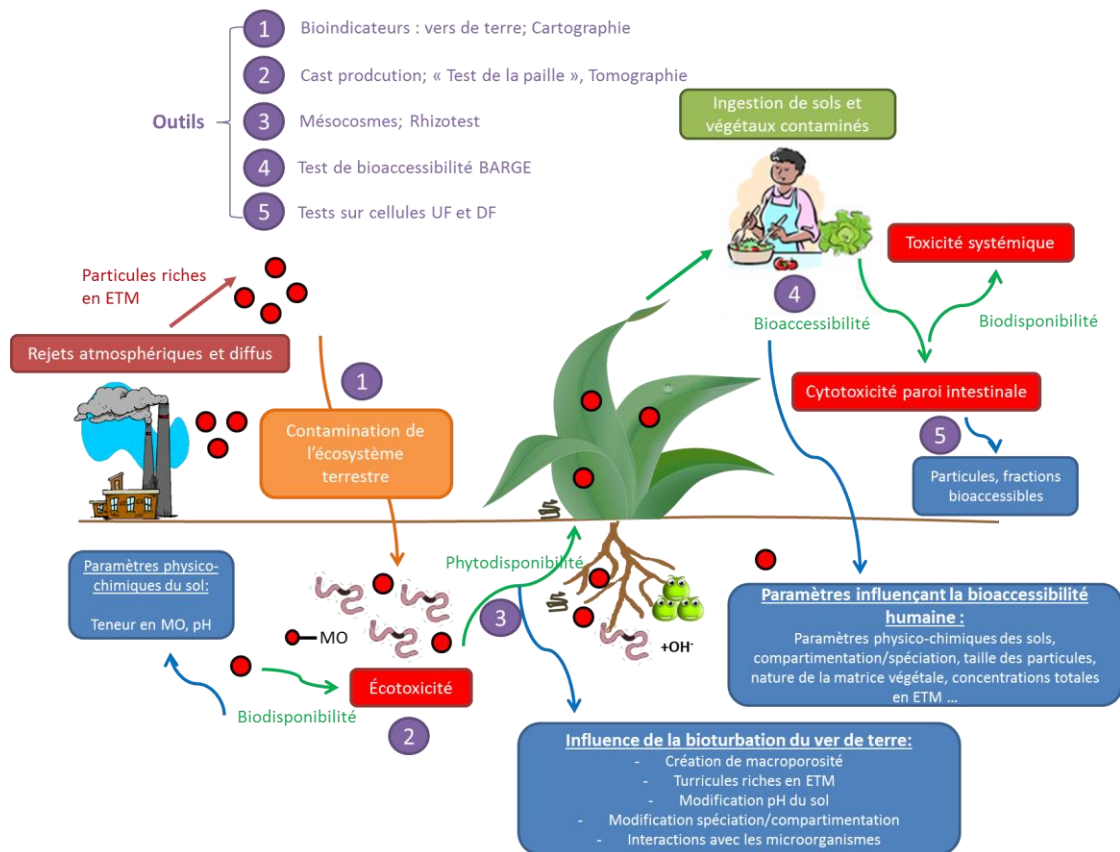


Figure X : Schéma représentant le transfert des ETM à travers un écosystème et les différents outils utilisés et développés pour évaluer leur toxicité et disponibilité.

Ce travail de thèse basé sur une approche intégrative transdisciplinaire de la gestion des risques environnement-santé a donc permis d'apporter un certain nombre de réponses et de générer des données et outils utiles pour les gestionnaires de sites et les chercheurs. Il a aussi induit d'autres questions scientifiques et donc certaines perspectives sont présentées ensuite :

► Des tests écotoxicologiques davantage reliés aux rôles écologiques d'un organisme dans un écosystème pourraient être développés et utilisés en routine au cours des évaluations de risques. Des travaux supplémentaires pourraient être envisagés dans l'optique de faciliter l'usage de la cartographie par les gestionnaires d'ICPE pour révéler les interactions entre les différents paramètres et établir ainsi des cotations.

► Il a été montré l'influence du ver de terre sur l'augmentation de la phytodisponibilité des ETM. Cet organisme jouant un rôle majeur dans les écosystèmes terrestres pourrait-il être associé à des plantes phyto-extractrices afin d'améliorer leurs

capacités de phyto-remédiation des sols ? Ainsi, il est possible d'imaginer des inséminations de vers de terre à grande échelle dans les protocoles de phyto-remédiation de sites contaminés.

- ▶ Explorer davantage les liens entre biodisponibilité-écotoxicité-toxicité pour d'autres contaminants.

- ▶ De nombreux résultats sont encore en cours d'acquisition. Concernant, les mécanismes d'influence du ver de terre sur le transfert des ETM, des expérimentations de spectrométries XANES et EXAFS ont été réalisés au synchrotron de Grenoble. Ces résultats, une fois acquis, nous permettront de mieux comprendre les changements de spéciation/compartimentation induits par la bioturbation vers de terre.

- ▶ Dans l'optique d'utiliser la notion de bioaccessibilité dans les évaluations de risques sanitaires, une étape importante serait de développer et certifier des matériaux de références (sols et végétaux). Ceci afin que les différents laboratoires pouvant générer des données de bioaccessibilité puissent les valider et les transmettre aux évaluateurs de risques.

Valorisation des travaux

Articles publiés :

- **Lévêque T.**, Capowiez Y., Schreck E., Xiong T., Foucault Y., Dumat C*. Earthworm bioturbation influences the phytoavailability of metals released by particles in cultivated soils. 2014. Environmental Pollution (DOI: 10.1016/j.envpol.2014.04.005).
- **Lévêque T.**, Capowiez Y., Schreck E., Mazzia C., Foucault Y., Austruy A., Auffan M., Dumat C*. 2013. Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species. Environmental Pollution 179, 232-241.
- Pascaud G., **Lévêque T.**, Soubrand M., Boussen S., Joussein E. & Dumat C. 2014. Environmental and health risk assessment of Pb, Zn, As and Sb in soccer field soils and sediments from mine tailings: solid speciation and bioaccessibility. Environmental Science and Pollution Research 21, Issue 6, pp 4254-4264. (DOI: 10.1007/s11356-013-2297-2).
- Goix S., **Lévêque T.**, Xiong T., Schreck E., Baeza A., Geret F., Uzu G., Dumat C*. Environmental and health impacts of fine and ultrafine metallic particles: Assessment of threat scores. 2014. Environmental Research.
- Xiong T., **Lévêque T.**, Austruy A., Goix S., Schreck E., Dappe V., Sobanska S., Foucault Y. and Dumat C*. Foliar uptake and bioaccessibility of metal(loid)s in vegetables exposed to particulate matters. 2014. Environmental Geochemistry & Health (DOI:10.1007/s10653-014-9607-6).
- Xiong T., **Lévêque T.**, Shahid M., Foucault Y., Dumat C*. Lead and cadmium phytoavailability and human bioaccessibility for vegetables exposed to soil or atmosphere pollution by process ultrafine particles. 2014. Journal of Environmental Quality, in press.

- Foucault Y., **Lévêque T.**, Xiong T., Schreck E., Austruy A., Muhammad S. & Dumat C.*. 2013. Green manure plants for remediation of soils polluted by metals and metalloids: ecotoxicity and human bioavailability assessment. *Chemosphere* 93, 1430–1435.
- Foucault Y, Schreck E, **Lévêque T**, Pradère P, Dumat C, 2012. Gestion et remédiation des sols contaminés au plomb. *Environnement, Risques et Santé*, 11, 61-66.
- Foucault Y., Durand MJ., Tack K., Schreck E., Geret F., **Lévêque T.**, Pradere P., Goix S. & Dumat C.*. 2013. Use of ecotoxicity test and ecoscores to improve the management of polluted soils: case of a secondary lead smelter plant. *Journal of Hazardous Materials*, 246– 247, 291– 299.
- Foucault, Y., Schreck, E., **Lévêque, T.**, Pradère, P. & Dumat, C. 2012. Vers une gestion raisonnée des terres excavées contaminées par des éléments traces métalliques (ETM). *Environnement Risques & Santé* 11, 61–66.
- Shahid M., Xiong T., Masood N., **Lévêque T.**, Quenea K., Austruy A., Foucault Y., Dumat C.*. Influence of plant species and phosphorus amendments on metal speciation and bioavailability in a smelter impacted soil: a case study of food chain contamination. 2014. *Journal of Soils and Sediments* 14, 655–665. (DOI: 10.1007/s11368-013-0745-8).
- Shahid M., Xiong T., Castrec-Rouelle M., **Lévêque T.**, Dumat C.* Water extraction kinetics of metals, arsenic and dissolved organic carbon from industrial contaminated poplar leaves. 2013. *Journal of Environmental Sciences* 25, 2451–2459.
- Schreck E, Bonnard R, Laplanche C, **Lévêque T**, Foucault Y, Dumat C. 2012. DECA: a new model for assessing the foliar uptake of atmospheric lead by vegetation, using *Lactuca sativa* as an example. *Journal of Environmental Management*, 112, 233-239.

Articles soumis:

- **Lévêque T.**, Capowiez Y., Schreck E., Mombo S., Mazzia C., Foucault Y., Dumat C. 2014. Effects of an metal(loid)s historic pollution on earthworms communities. Science of the total environment.

Communications orales :

- **T. Lévêque**, Y. Foucault, E. Schreck, P. Pradère, Y. Capowiez & C. Dumat. Earthworm's bioturbation influence metals bioavailability in polluted soils. 4th International Congress EUROSIL 2012, 2-6 July 2012, Bari, Italy.
- **T. Lévêque**, Y. Capowiez, Y. Foucault, E. Schreck, M. Couveignes & C. Dumat. Earthworm: a multifunction tool for biomonitoring and refunctionalization of polluted soils. International Conference on Environmental Geochemistry and Health, 8-12 July 2013, Toulouse, France.
- Y. Foucault, S. Compant, B. Mitter, **T. Lévêque**, A. Sessitsch & C. Dumat. Activity and evolution of rhizospheric microorganisms under green manures crops influenced by different soil properties and pte contaminations. 7th SUITMA International Conference, 16-20 September 2013, Torun, Poland.
- Y. Foucault, M.J. Durand, K. Tack, E. Schreck, F. Geret, **T. Lévêque**, P. Pradère & C. Dumat. Use of ecotoxicity tests and ecoscores to improve management of polluted soils. 12th O+International UFZ-Deltares Conference on Groundwater-Soil-Systems and Water Resource Management – AquaConSoil. 16-19 April 2013, Barcelona, Spain.
- Y. Foucault, K. Tack, E. Schreck, **T. Lévêque**, Y. Capowiez, P. Pradère & C. Dumat. Phyto-restoration of lead-contaminated soils using green manures crops. 6th SUITMA International Conference, 3-7 October 2011, Marrakech, Marocco.

Posters:

- **T. Leveque**, Y. Foucault, E. Schreck, Y. Capowiez, A. Austruy, C. Laplanche & C. Dumat. Earthworms as a new tool to assess human bioaccessibility and bioavailability of metals. Environmental Health 2013 – Science and Policy to Protect Future Generations, 3-6 March 2013, Boston, USA.
- **T. Leveque**, Y. Capowiez, E. Schreck, Y. Foucault, C. Ricard, R.G. Rakotomanana & C. Dumat. Earthworm influence on metals bioavailability in relation with metal speciation and ecotoxicity. 6th SETAC World Congress 2012, 20-24 May 2012, Berlin, Germany.
- **T. Leveque**, Y. Capowiez, E. Schreck, Y. Foucault & C. Dumat. Influence de la Bioturbation des Vers de Terre sur la Bioaccessibilité et la Biodisponibilité des Métaux dans les sols pollués. Colloque Adebitech Ineris, 15-16 November 2011, Paris, France
- S. Goix, T. Xiong, Y. Foucault, **T. Leveque** & C. Dumat. Soil pollution by atmospheric fine particles enriches with metal(loid)s: biodisponibility and (eco)toxicity. 7th SUITMA International Conference, 16-20 September 2013, Torun, Poland.
- E. Schreck, Y. Foucault, F. Geret, **T. Leveque** & C. Dumat. Ageing influence on ecotoxicityof contaminated soils by process metallic ultra-fine particles. 6th SUITMA International Conference, 3-7 October 2011, Marrakech, Marocco.
- E. Schreck, Y. Foucault, S. Sobanska, **T. Leveque**, P. Pradère & C. Dumat. Transfert foliaire de particules atmosphériques fines et ultra-fines vers différentes plantes – Exposition par ingestion. Colloque Adebitech Ineris, 15-16 November 2011, Paris, France
- Y. Foucault, **T. Leveque**, T. Xiong, E. Schreck, A. Austruy, M. Shahid & C. Dumat. Green manure plants for polluted soil re-functionalization in the case of urban brownfields or kitchen gardens contaminated by metals and metalloids. 7th SUITMA International Conference, 16-20 September 2013, Torun, Poland.

- Y. Foucault, **T. Leveque**, M. Couveignes, S. Goix, Muhammad Shahid & C. Dumat. Study of bioavailability and ecotoxicity of metals and metalloids in polluted soils to assess the efficiency of phytoremediation techniques. International Conference on Environmental Geochemistry and Health, 8-12 July 2013, Toulouse, France.
- Y. Foucault, **T. Leveque**, K. Tack, A. Austruy, T. Xiong & C. Dumat. Refunctionalization of polluted soils using green manures. Environmental Health 2013 – Science and Policy to Protect Future Generations, 3-6 March 2013, Boston, USA.
- Y. Foucault, **T. Levêque**, M.J. Durand, E. Schreck, A. Paul, K. Tack, P. Pradere & C. Dumat. Ecotoxicity tests to assess landfilling of lead-contaminated soils. 4th International Congress EUROSIL 2012, 2-6 July 2012, Bari, Italy.
- Y. Foucault, M.J. Durand, E. Schreck, K. Tack, **T. Levêque**, A. Paul, P. Pradere & C. Dumat. Risk assessment around a lead-batteries recycling company using ecotoxicity tests. 6th SETAC World Congress 2012, 20-24 May 2012, Berlin, Germany.
- Y. Foucault, K. Tack, E. Schreck, **T. Levêque**, P. Pradere & C. Dumat. Evaluation des risques sanitaires et écotoxicologiques d'une usine de recyclage de batteries. Colloque Adebitech Ineris, 15-16 November 2011, Paris, France.
- Y. Foucault, K. Tack, E. Schreck, **T. Levêque**, P. Pradere & C. Dumat. Environmental and sanitary risks assessment for lead-battery recycling activities. 6th SUITMA International Conference, 3-7 October 2011, Marrakech, Morocco.
- Austruy, Y. Foucault, T. Xiong, **T. Leveque**, C. Moussard, A. Hitmi & C. Dumat. Adaptive strategy of *S. vulgaris* metallophyte plant to soils polluted by metals. International Conference on Environmental Geochemistry and Health, 8-12 July 2013, Toulouse, France.
- Austruy, C. Gers, **T. Leveque**, E. Schreck, Y. Foucault & C. Dumat. Effects and accumulation of trace metals on the microarthropods communities in contaminated soil. International Conference on Environmental Geochemistry and Health, 8-12 July 2013, Toulouse, France.
- T. Xiong, A. Austruy, **T. Leveque**, G. Uzu, E. Schreck, Y. Foucault, C. Laplanche & C. Dumat. Impact of atmosphere fine particles enriched with metals on vegetables in

kitchen gardens. Environmental Health 2013 – Science and Policy to Protect Future Generations, 3-6 March 2013, Boston, USA.

- T. Xiong, A. Austruy, Y. Foucault, **T. Leveque**, V. Dappe, S. Sobanska & C. Dumat. Human health risk due to ingestion of vegetables cultivated on polluted soils and/or exposed to atmospheric fallouts of fine particles enriched with metal(loid)s. 7th SUITMA International Conference, 16-20 September 2013, Torun, Poland

Bibliographie

A

- ATSDR : Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for lead. Atlanta, GA: US. Department of Health and Human Services, 1992
- Abdul-Rida, A.M.M. et M.B., Bouché. 1997. Earthworm toxicology: From acute to chronic tests. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 29, p. 699-703
- AFNOR, 1994. Le Dictionnaire de l'environnement. Les termes normalisés. Ed. AFNOR, Paris La Défense, France, 307 p
- Ali, H., Khan, E., Sajad, M.A., 2013. Phytoremediation of heavy metals – Concepts and applications. *Chemosphere* 91, 869–881

B

- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). Références et stratégie d'interprétation. Ed. INRA, Paris, France, 410 p
- Bannon, D., Drexler, J.W., Fent, G.M., Casteel, S.W., Hunter, P.J., Brattin, W.J, Major, M.A. Evaluation of small arms range soils for metal contamination and lead bioavailability, *Environ. Sci. Technol.* 43 (2009) 9071–9076
- Barsby, A., McKinley, J.M., Ofterdinger, U., Young, M., Cave, M.R., Wragg, J., 2012. Bioaccessibility of trace elements in soils in Northern Ireland. *Sci. Total Environ.* 433, 398–417
- Basta N, Gradwohl R. Estimation of Cd, Pb and Zn Bioavailability in smelter-contaminated soils by a sequential extraction procedure. *J Soil Contamination* 2000 ; 9 : 149-64
- Binet, F., Le Bayon R.C. (1999). Space-time dynamiques in situ of earthworm casts under temperature cultivated soils. *Soil Biol. Biochem.* 31, 85-93
- Binet, F., Curmi, P. (1992). Structural effects of *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta: Lumbricidae) on the soil-organic matter system: micromorphological observations and autoradiographs. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1519-1523
- Binet, F. (1993). Dynamique des peuplements et fonctions des lombriciens en sols cultivés tempérés. Thèse de Doctorat, Université de Rennes 1

- Bittel J.R., Miller R.J. Lead, Cadmium, and Calcium selectivity coefficients on montmorillonite, illite and kaolinite. *Journal of Environmental Quality*, 1974
- Böcker U, Schottelius A, Watson JM, Holt L, Licato LL, Brenner DA, Sartor RB, Jobin C. (2000). Cellular differentiation causes a selective down-regulation of interleukin (IL)-1beta-mediated NF-kappaB activation and IL-8 gene expression in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 275(16):12207-13.
- Bouché, M.B. (1977). *Stratégies lombriciennes. Soil organisms as components of ecosystems.* Swedish Natural Science Research Council Ecological Bulletin, Stockholm 25,122-132
- Bourelrier, P.H., Berthelin, J., Pedro, G.,1998. Contamination des sols par les éléments traces : les risques et leur gestion. In: Académie des Sciences, Rapport n°42, Technique et Documentation, Ed. Lavoisier, Paris, France, 440 p
- Bosso S.T., Enzweiler J. Bioaccessible lead in soils slag, and mine wastes from an abandoned mining district in Brazil. *Environmental Geochemistry and Health*, 2007
- Brown, G.G., Barois, I., Lavelle, P. (2000). Regulation of soil organic matter dynamics and microbial activity in the drilosphere and the role of interactions with other edaphic functional domains. *Eur. J. Soil Biol.* 36, 177–198
- Bregoli, L., Chiarini, F., Gambarelli, A., Sighinolfi, G., Gatti, A.M., Santi, P., Martelli, A. M., Cocco, L., 2009. Toxicity of antimony trioxide nanoparticles on human hematopoietic progenitor cells and comparison to cell lines. *Toxicology* 262, 121–129
- Brunauer, S., Emmett, P.H., Teller, E., 1938. Adsorption of gases in multimolecular layers. *J. Am. Chem. Soc.* 60, 309–319.

C

- Calabresse E.J., Stanek E.L., James R.C., Roberts S.M. Soil ingestion : A concern for acute toxicity in children. *Journal of Environmental and Health*, 1999
- Casteel SW, Cowart RP, Weis CP, et al. Bioavailability of lead to juvenile swine dosed with soil from the smuggler mountain NPL site of Aspen, Colorado. *Fundam Appl Toxicol* 1997
- Casteel SW, Cowart RP, Weis CP, Henningsen GM, Hoffman E, Brattin WJ. Estimation of relative bioavailability of lead in soil and soil-like materials using young swine. *Environmental Health Perspectives*, 2006
- Capowiez, Y., Dittbrenner, N., Rault, M., Triebkorn, R., Hedde, M. and Mazzia, C. 2010. Earthworm cast production as a new behavioural biomarker for toxicity testing. *Environmental Pollution* 158(2): 388–393
- Carrizales L., Razo I., Tellez-Hernandez J.I., Torres-Nerio R., Torres A., Batres L.E., Cubillas A.C., Diaz-Barriga F. Exposure to arsenic and lead of children living near a copper-

- smelter in San Luis Potosi, Mexico: Importance of soil contamination for exposure of children. *Environmental Research*, 2005, 101: 1-10
- Cecchi, M., Dumat, C., Alric, A., Felix-Faure, B., Pradere, P., Guisresse, M., 2008. Multi-metal contamination of a calcic cambisol by fallout from a lead-recycling plant. *Antarct. Soils Soil Form. Process. Chang. Environ.* 144, 287–298. doi:10.1016/j.geoderma.2007.11.023
- Chaignon, V., Hinsinger, P., 2003. A biotest for evaluating copper bioavailability to plants in a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality* 32, 824–833
- Cheng, J., Wong, M.H., 2002. Effects of earthworms on Zn fractionation in soils. *Biology and Fertility of Soils* 36, 72e78.
- Churg A. (1996). The uptake of mineral particles by pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 154:1124-40
- Coeurdassier, M., Scheifler, R., de Vaufleury, A., Crini, N., Saccomani, C., Du Mont, L.S., Badot, P.-M., 2007. Earthworms influence metal transfer from soil to snails. *Appl. Soil Ecol.* 35, 302–310. doi:10.1016/j.apsoil.2006.08.004
- Caboche J. Validation d'un test de mesure de bioaccessibilité. Application à 4 éléments traces métalliques dans les sols : As, Cd, Pb et Sb. Thèse d'université. Institut National Polytechnique de Lorraine. 2009.

D

- Daniel, O., Anderson, J.M., 1992. Microbial biomass and activity in contrasting soil materials after passage through the gut of the earthworm *Lumbricus rubellus* Hoffmeister. *Soil Biology and Biochemistry* 24, 465–470
- Davis, A., Drexler, J.W., Ruby, M.V., Nicholson, A., 1993. Micromineralogy of mine wastes in relation to lead bioavailability, Butte, Montana. *Environ. Sci. Technol.* 27, 1415–1425.
- Denys S, Caboche J, Tack K, Delalain P. Bioaccessibility of lead in high carbonate soils. *J Environ Sci Heal A* 2007 ; 42 : 1331-9
- Denys, S.; Caboche, J. ; Tack, K. Biodisponibilité et bioaccessibilité des métaux et métalloïdes des sols pollués pour la voie orale chez l'homme. ERS, 2009
- Denys S, Tack K, Caboche J, Delalain P (2009) Bioaccessibility, solid phase distribution, and speciation of Sb in soils and in digestive fluids. *Chemosphere* 74:711–716
- Dittbrenner, N., Moser, I., Triebkorn, R. and Capowiez Y. 2011. Assessment of short and long-term effects of imidacloprid on the burrowing behaviour of two earthworm species by using 2D and 3D post-exposure techniques. *Chemosphere* 84(10): 1349-55

- Dumat, C., Chiquet, A., Gooddy, D., Aubry, E., Morin, G., Juillot, F., Benedetti, M.F., 2001. Metal ion geochemistry in smelter impacted soils and soil solutions. *Bulletin De La Societe Geologique De France* 172, 539–548
- Dumat, C., Quenea, K., Bermond, A., Toinen, S., Benedetti, M.F., 2006. Study of the trace metal ion influence on the turnover of soil organic matter in cultivated contaminated soils. *Environ. Pollut.* 142, 521–529. doi:10.1016/j.envpol.2005.10.027

E

- Edwards, W.M., Shipitalo, M.J., Owens, L.B., Norton, L.D. (1989). Water and nitrate movement in earthworm burrows within long-term no-till cornfield. *J. Soil Water Conserv.* 44, 240-243.
- Edwards, W.M., Shipitalo, M.J., Traina, S.J., Edwards, C.A., Owens, L.B. (1992). Role of *Lumbricus terrestris* burrows on quality of infiltrating water. *Soil Biol. Biochem.* 24, 1555-1561.
- Edwards, C.A. et P.J., Bohlen. 1992 The effects of toxic chemicals on earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 125, p. 23-100
- Edwards, C.A. et P.J., Bohlen. 1996. *BioJogy and ecology of earthworms*. Third Edition. Chapman and Hall, London, UK, 426 p
- Edwards, C.A., 2004. The importance of earthworms as key representatives of the soil fauna. In: Edwards, C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology*, second ed., Boca Raton, Florida, pp. 3–11.
- Eijsackers, H., 2001. A future for soil ecology ? Connecting the system levels: moving from genomes to ecosystems: Opening Lecture to the XIII ICSZ –Biodiversity of soil organisms and ecosystem functioning?. *Eur. J. Soil Biol.* 37, 213–220. doi:10.1016/S1164-5563(01)01087-1
- Eisenhauer, N., Marhan, S., Scheu, S., 2008. Assessment of anecic behavior in selected earthworm species: effects on wheat seed burial, seedling establishment, wheat growth and litter incorporation. *Applied Soil Ecology* 38, 79e82
- Ellis et Schnoes, C.J. Eating disorder : Pica. eMedecine website, 2005

F

- Fischer, S.M., Kokolus, W.J., Baldwin, J.K., Patrick, K.E., 1989. The antioxidant effects of copper sulphate on the actions of a phorbol ester and xanthine–xanthine oxidase superoxide–anion generating system in murine epidermal cells. *Toxicol. invitro* 3, 293–298.

G

Guivarch, A., Hinsinger, P., Staunton, S., 1999. Root uptake and distribution of radiocesium from contaminated soil and the enhancement of Cs adsorption in the rhizosphere. *Plant & soil* 211, 131–138

H

Han, Z., Bi, X., Li, Z., Yang, W., Wang, L., Yang, H., Li, F., Ma, Z., 2012. Occurrence, speciation and bioaccessibility of lead in Chinese rural household dust and the associated health risk to children. *Atmos. Environ.* 46, 65–70.

Hernandez-Soriano, M.C., Jimenez-Lopez, J.C., 2012. Effects of soil water content and organic matter addition on the speciation and bioavailability of heavy metals. *Science of the Total Environment* 423, 55–61

Hopkin, S.P. 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier applied science, London, UK

I

ISO (International Organization for Standardization). 1998. Soil quality: effects of soil pollutants on earthworms (*Eisenia fetida*). Part 2: determination of effects on reproduction. ISO, Geneva, Switzerland. International Standard ISO 11268-2, 16 p

J

Juhasz A.L., et al., Impact of soil particle size and bioaccessibility on children and adult lead exposure in peri-urban contaminated soils, *J. Hazard. Mater.* (2011)

Jusselme, M.D., Miambi, E., Mora, P., Diouf, M., Rouland-Lefèvre, C., 2013. Increased lead availability and enzyme activities in root-adhering soil of *Lantana camara* during phytoextraction in the presence of earthworms. *Science of The Total Environment* 445–446, 101–109

Jones, C.G., Lawton, J.H. and Shachak, M. (1994). Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* 69, 373-386

Johnson, C.E., Petras, R.J., 1998. Distribution of zinc and lead fractions within a forest Spodosol. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62: 782–789

K

- Kammenga, I.E., R., Dallinger, M.H., Donker, H.R., Kahler, V., Simonsen, R., Triebkorn et J.M., Weeks. 2000. Biomarkers in terrestrial invertebrates for ecotoxicological soil risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 164, p.93-147
- Kelley ME, Brauning SE, Schoof RA, Ruby MV. Assessing oral bioavailability of metals in soil. Columbus : Battelle Press, 2002
- Kizilkaya, R., 2004. Cu and Zn accumulation in earthworm *Lumbricus terrestris* L. in sewage sludge amended soil and fractions of Cu and Zn in casts and surrounding soil. *Ecological Engineering* 22, 141e151
- Kwon E., Zhang H., Wang Z., Jhangri G.S., Lu X., Fok N., Gabos S., Li X.F., Le X.C Arsenic on the hands of children after playing in playgrounds. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112, 1375-1381

L

- Lanno, R.P., A., Fairbrother, c., Gaudet, R, Loehr, A., Saterbak et H., Tabak. 2003. Introduction. In *Contaminated soils: From soil-chemical interactions to ecosystem management* (R.P., Lanno; Ed.). Society of Environmental Toxicology and Chemistry, Pensacola, FL, USA, p. 1-8
- Laquatra, I. Childhood Lead Poisoning and its Prevention. Heinz Infant Nutrition Institute, 2001
- Lavelle, P. (1981). Stratégies de reproduction chez les vers de terre, *Acta Oecologia. Oecologia Generalis* 2, 117-133
- Lavelle, P. and Gilot, C. (1994). Priming effects of macroorganisms on microflora: A key process of soil function? In: *Beyond the Biomass* (eds. K. Ritz, J. Dighton and K. Giller), 176–181
- Lavelle, P. (1996). Diversity of soil fauna and soil function. *Biol. Intern.* 33, 3-16
- Lavelle, P., Bignell, D., Lepage, M., Wolters, V., Roger, P., Ineson, P., Heal, O.W., Ghillion, S. (1997). Soil function in a changing world: The role of invertebrate ecosystem engineers. *Eur. J. Soil Biol.* 33, 159–193
- Lavelle, P., Pashanasi, B., Charpentier, F., Gilot, C., Rossi, J.P., Derouard, L., Andre, J., Ponge, J.F., Bernier, N. (1998). Large-scale effects of earthworms on soil organic matter and nutrient dynamics, in: Edwards C.A. (Ed.), *Earthworm Ecology*, St. Lucie Press, Boca Raton, USA, 103–122.

- Lanphear, B.P., Weitzman, M., Winter, N.L., Tanner, M., Yakir, B., Eberly, S., Emond, M., Matte, T.D. Lead contaminated house dust and urban children's blood lead levels. *American Journal of Public Health*, 1996.
- Lanphear B.P., Roghmann K., Pathways of lead exposure in urban children. *Environmental Research*, 1997
- Le Bayon, R.C., Binet, F., 1999. Space-time dynamics in situ of earthworm casts under temperate cultivated soils. *Soil Biology and Biochemistry* 31, 85–93
- Lee, K.E. (1985). *Earthworms, their ecology and relationships with soils and land use*. Academic Press, New York, p. 411
- Lee, K.E., Foster, R.C., 1991. Soil fauna and soil structure. *Australian Journal of Soil Science* 29, 745–775
- Ljung K. Metals in urban playground soils : distribution and bioaccessibility. Doctoral thesis Swedish university of agricultural sciences, Uppsala, 2006
- Luo, X.S., Yu, S., Li, X.D., 2011. Distribution, availability, and sources of trace metals in different particle size fractions of urban soils in Hong Kong: implications for assessing the risk to human health. *Environmental Pollution* 159, 1317–1326
- Leveque, T., Capowiez, Y., Schreck, E., Mazzia, C., Auffan, M., Foucault, Y., Austruy, A., Dumat, C., 2013. Assessing ecotoxicity and uptake of metals and metalloids in relation to two different earthworm species (*Eiseina hortensis* and *Lumbricus terrestris*). *Environ. Pollut.* 179, 232–241. doi:10.1016/j.envpol.2013.03.066
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Väisänen, A., Haimi, J., 2004. Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 59, 340–348. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.09.011

M

- Manceau, A., Lanson, B., Drits, V.A., 2002. Structure of heavy metal sorbed birnessite. Part III: Results from powder and polarized extended X-ray absorption fine structure spectroscopy. *Geochimica & Cosmochimica Acta* 66, 2639–2663
- Mansour, S.A., Belal, M.H., Abou-Arab, A.A.K., Ashour, H.M., Gad, M.F., 2009. Evaluation of some pollutant levels in conventionally and organically farmed potato tubers and their risks to human health. *Food Chem. Toxicol.* 47, 615–624. doi:10.1016/j.fct.2008.12.019

N

- Nahmani, J., M.E., Hodson et S., Black. 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. *Environmental Pollution*, vol. 145, p. 402-424
- Niebes, J.F., Dufey, J.E., Jaillard, B., Hinsinger, P., 1993. Release of non-exchangeable potassium from different size fractions of two highly K-fertilized soils in the rhizosphere of rape (*Brassica napus* cv Drakkar). *Plant & Soil* 155, 403–406
- Nishimura, Y., Yamaguchi, J., Kanada, A., Horimoto, K., Kanemaru, K., Satoh, M., Oyama, Y., 2006. Increase in intracellular Cd²⁺ concentration of rat cerebellar granule neurons incubated with cadmium chloride : Cadmium cytotoxicity under external Ca²⁺-free condition. *Toxicol. in vitro* 20, 211–216

O

- OCDE (Organisation pour la Coopération et le Développement Economique). 1984. Guideline for testing of chemicals: Earthworm, acute toxicity test. OCDE, Paris, France. Guideline No. 207, 9 p
- Okorie A, Entwistle J, Dean JR (2012) Estimation of daily intake of potentially toxic elements from urban street dust and the role of oral bioaccessibility testing. *Chemosphere* 86:460–467
- Oomen, A.G., 2000. Determination of oral bioavailability of soil-borne contaminants. PhD thesis, University of Utrecht, Utrecht, Netherlands
- Oomen A.G., Brandon E.F.A., Swarties F.A., Sips A.J.A.M. How can information on oral bioavailability improve human health risk assessment for lead-contaminated soils? Implementation and Scientific Basis. RIVM report, 2006.

P

- Pascaud, G., Leveque, T., Soubrand, M., Boussem, S., Joussein, E., Dumat, C., 2014. Environmental and health risk assessment of Pb, Zn, As and Sb in soccer field soils and sediments from mine tailings: solid speciation and bioaccessibility. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 4254–4264. doi:10.1007/s11356-013-2297-2
- Paustenbach, D.J. The practice of exposure assessment : A state of the art review. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B : Critical Review*, 2000, 3, 179-291.
- Poggio L., Vrsacaj B., Schulin R., Hepperle E., Marsan F.A. Metals pollution and human bioaccessibility of top soils in Grugliasco (Italy). *Environmental Pollution*, 2009

Polichetti, G., Cocco, S., Spinali, A., Trimarco, V., Nunziata, A., 2009. Effects of particulate matter (PM10, PM2.5 and PM1) on the cardiovascular system. *Toxicology* 261, 1–8. doi:10.1016/j.tox.2009.04.035

Q

Quenea, K., Lamy, I., Winterton, P., Bermond, A., Dumat, C., 2009. Interactions between metals and soil organic matter in various particle size fractions of soil contaminated with waste water. *Geoderma* 149, 217–223. doi:10.1016/j.geoderma.2008.11.037

R

Ramachandran A, Madesh M, Balasubramanian KA. (2000). Apoptosis in the intestinal epithelium: its relevance in normal and pathophysiological conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 15(2):109-20

Reinecke, AJ., S.A., Reinecke, D.E., Musilbono et A., Chapman. 2000. The transfer of lead (Pb) from earthworms to shrews (*Myosorex varius*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 39, p. 392-397

Ribera, D. et M., Saint-Denis. 1999. Le ver *Eisenia fetida* : [ntérêts et perspectives en écotoxicologie terrestre. *Bulletin de la Société Zoologique de France*, vol. 124, p. 411-420

Roussel, H., Waterlot, C., PelfrÃane, A., Pruvot, C., Mazzuca, M., Douay, F., 2009. Cd, Pb and Zn Oral bioaccessibility of urban soils contaminated in the past by atmospheric emissions from two lead and zinc smelters. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 58, 945–954

Ruby MV, Davis A, Schoof R, Eberle S, Sellstone CM. Estimation of lead and arsenic bioavailability using a physiologically based extraction test. *Environ Sci Technol* 1996 ; 30 : 422-30

Ruby MV, Schoof R, Brattin W., Goldlade M., Post G., Harnois M., Mosby DE., Casteel SW., Berti W., Carpentier M., Edwards D., Cragin D., and Chappel W. Advances in evaluating the oral bioavailability of inorganics in soil for use in human health risk assessment. *Environmental Science and Technology*, 1999

Ruiz, E., Rodríguez, L., Alonso-Azcárate, J., 2009. Effects of earthworms on metal uptake of heavy metals from polluted mine soils by different crop plants. *Chemosphere* 75, 1035–1041.

Ruiz, E., Alonso-Azcárate, J., Rodríguez, L., 2011. *Lumbricus terrestris* L. activity increases the availability of metals and their accumulation in maize and barley. *Environ. Pollut.* 159, 722–728. doi:10.1016/j.envpol.2010.11.032

S

- Sanchez-Hernandez, J.c. 2006. Earthworm biomarkers in ecological risk assessment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 188, p. 85-126
- Sancho E, Batlle E, Clevers H. (2004). Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:695-723
- Scheu, S., 2003. Effects of earthworms on plant growth: patterns and perspectives. *Pedobiologia* 47, 846e856
- Schreck, E., Foucault, Y., Geret, F., Pradère, P., Dumat, C. 2011. Influence of soil ageing on bioavailability and ecotoxicity of lead carried by process waste metallic ultrafine particles. *Chemosphere* 85(10), 1555–1562
- Schreck, E., Y. Foucault, G. Sarret, S. Sobanska, L. Cécillon, M. Castrec-Rouelle, G. Uzu, and C. Dumat. 2012. Metal and metalloid foliar uptake by various plant species exposed to atmospheric industrial fallout: Mechanisms involved for lead. *Sci. Total Environ.* 427–428:253–262. doi:10.1016/j. scitotenv.2012.03.051
- Schreck, E., Laplanche, C., Le Guédard, M., Bessoule, J.J., Austruy, A., Xiong, T., Foucault, Y, Dumat, C., 2013. Influence of fine process particles enriched with metals and metalloids on *Lactuca sativa* L. leaf fatty acid composition following air and/or soil-plant field exposure. *Environmental Pollution* 179, 1–8
- Schreck, E., V. Dappe, G. Sarret, S. Sobanska, D. Nowak, J. Nowak, E.A. Stefaniak, V. Magnin, V. Ranieri, and C. Dumat. 2014. Foliar or root exposures to smelter particles: Consequences on lead compartmentalization and speciation in plant leaves. *Sci. Total Environ.* 476–477:667–676. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.089
- Schroder JL, Basta NT, Casteel SW, Evans TJ, Payton ME, Si J. Validation of the in vitro gastrointestinal model (IVG) to estimate relative bioavailable lead in contaminated soils. *J Environ Qual* 2004 ; 33 : 513-21
- Scott-Fordsmand, J.J. et IM., Weeks. 2000. Biomarkers in earthworms. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, vol. 165, p. 117-159
- Shahid, M., Pinelli, E., Pourrut, B., Silvestre, J., Dumat, C., 2011. Lead-induced genotoxicity to *Vicia faba* L. roots in relation with metal cell uptake and initial speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74, 78–84
- Shahid, M., Pinelli, E., Dumat, C., 2012. Review of Pb availability and toxicity to plants in relation with metal speciation: role of synthetic and natural organic ligands. *Journal of Hazardous Materials* 219–220, 1–12
- Shahid, M., Xiong, T., Masood, N., Leveque, T., Quenea, K., Austruy, A., Foucault, Y., Dumat, C., 2013. Influence of plant species and phosphorus amendments on metal speciation and bioavailability in a smelter impacted soil: a case study of food-chain contamination. *J. Soils Sediments*. doi:10.1007/s11368-013-0745-8

- Sims, R.W., Gerard, B.M. (1985). Earthworm. Keys and notes for identification and study on the species. Brill and Backhuys, London
- Singh, O.V., Labana, S., Pandey, G., Budhiraja, R., Jain; R.K., 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. *Applied Microbiology & Biotechnology* 61, 405–412
- Singh S, Shi T, Duffin R, Albrecht C, van Berlo D, Höhr D, Fubini B, Martra G, Fenoglio I, Borm PJ, Schins RP. (2007). Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. *Toxicol Appl Pharmacol* 222(2):141-51
- Sips, A.J.A.M.; Bruil, M.A.; Dobbe, C.J.G.; et al. Bioaccessibility of Contaminants from Ingested Soil in Humans. Method Development and Research in the Bioaccessibility of Pb and Benzo[a]pyrene. RIVM report 711701012/2001. 2001; 22–40
- Sizmur, T., Hodson, M.E., 2009. Do earthworms impact metal mobility and availability in soil? – A review. *Environmental Pollution* 157, 1981–1989.
- Sizmur, T., Watts, M.J., Brown, G.D., Palumbo-Roe, B., Hodson, M.E., 2011. Impact of gut passage and mucus secretion by the earthworm *Lumbricus terrestris* on mobility and speciation of arsenic in contaminated soil. *J. Hazard. Mater.* 197, 169–175. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.09.071
- Smith E, Weber J, Naidu R et al (2011) Assessment of lead bioaccessibility in peri-urban contaminated soils. *J HazardMater* 186:300–305
- Spurgeon, D.J., Hopkin, S.P., 1996. The effects of metal contamination on earthworm populations around a smelting works: quantifying species effects. *Appl. Soil Ecol.* 4, 147–160. doi:10.1016/0929-1393(96)00109-6
- Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Rimmer V.R., Hopkin S.P., and Weeks J.M. (2000). Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in four earthworm species exposed to zinc. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 1800–1808
- Stork, N.E. and Eggleton, P. (1992). Invertebrates as determinants and indicators of soil quality. *American Journal of Alternative Agriculture* 7, 38-47

T

- Tiede K, Boxall AB, Tear SP, Lewis J, David H, Hasselov M. (2008). Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 25(7):795-821
- Tomlin, A.D., Protz, R., Martin, R.R., McCabe, D.C., Lagace, R.J., 1993. Relationships amongst organic matter content, heavy metal concentrations, earthworm activity, and soil microfabric on a sewage sludge disposal site. *Geoderma* 57, 89–103.

- Tomlin, A.D., M.J. Shipitalo, W.M. Edwards, and R. Protz. (1995). Earthworms and their influence on soil structure and infiltration. In P.F. Hendrix (ed.) *Earthworm ecology and biogeography in North America*. Lewis Publ., Boca Raton, FL., 159–183
- Turner A, Singh N, Richards JP (2009) Bioaccessibility of metals in soils and dusts contaminated by marine antifouling paint particles. *Environ Pollut* 157:1526–1532

U

- Udovic, M., Plavc, Z., Lestan, D., 2007. The effect of earthworms on the fractionation, mobility and bioavailability of Pb, Zn and Cd before and after soil leaching with EDTA. *Chemosphere* 70, 126–134. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.06.044
- USEPA. Exposure factors handbook. EPA/600/P-95/002Fc. Office of Research and Development, U.S.EPA, Washington, DC. 1997.
- USEPA. Estimation of relative bioavailability of lead in soil and soil-like materials using in vivo and in vitro methods. OSWER 2007 ; 9285 : 7-77
- Uzu, G., Sobanska, S., Aliouane, Y., Pradere, P., Dumat, C., 2009. Study of lead phytoavailability for atmospheric industrial micronic and sub-micronic particles in relation with lead speciation. *Behav. Eff. Nanoparticles Environ.* 157, 1178–1185. doi:10.1016/j.envpol.2008.09.053
- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Munoz, M., Dumat, C., 2010. Foliar lead uptake by lettuce exposed to atmospheric fallouts. *Environmental Science & Technology* 44, 1036–1042
- Uzu, G., Sobanska, S., Sarret, G., Sauvain, J.J., Pradère, P., Dumat, C., 2011. Characterization of lead-recycling facility emissions at various workplaces : Major insights for sanitary risk assessment. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1018–1027

V

- van Gestel, C.A.M., Koolhaas, J.E., Hamers, T., van Hoppe, M., van Roover, M., Korsman, C., Reinecke, S.A., 2009. Effects of metal pollution on earthworm communities in a contaminated floodplain area: Linking biomarker, community and functional responses. *Environ. Pollut.* 157, 895–903. doi:10.1016/j.envpol.2008.11.002
- Van Hoof, P. (1983). Earthworm activity as a cause of splash erosion in a Luxembourg forest. *Geoderma* 31, 195-204
- Vijver, M.G., I.P.M., Vink, C.J.H., Miermans et C.A.M., van Gestel. 2003. Oral sealing using glue: a new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Sail Biology and Biochemistry*, vol. 35, p. 125-132

- Violante, A., Huang, P.M., Gadd, G.M., 2007. Biophysico-chemical processes of heavy metals and metalloids in soil environments. Ed. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, USA, 18 p
- Vorenhout, M., van Straalen, N.M., Eijsackers, H.J.P., 2000. Assessment of the purifying function of ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2161–2163. doi:10.1002/etc.5620190901

W

- Wang, C.M., Ouyang, H., Wang, J.D., Liu, J.S., Zhang, X.L., Wang, Y. Impact of lead pollution in environment on children's health in Shenyang City. *Environmental Science*, 2003
- Whalen, J.K., Sampredo, L., Waheed, T., 2004. Quantifying surface and subsurface cast production by earthworms under controlled laboratory conditions. *Biology and Fertility of Soils* 39, 287–291.
- Winter-Sorkina R, Bakker MI, Donkersgoed G, Klaveren JD (2003) Dietary intake of heavy metals (cadmium, lead and mercury) by the Dutch population
- WHO - World Health Organization. Inorganic Lead. Geneva : IPCS - International Programme on Chemical Safety. *Environmental Health Criteria*, 1995
- Wragg, J., Cave ,M., Basta, N., Brandon, E., Casteel ,S., Denys ,S., Gron ,C., Oomen ,A., Reimer , K., Tack , K ., VandeWiele , T., 2011. An inter-laboratory trial of the unified BARGE bioaccessibility method for arsenic, cadmium and lead in soil. *Sci. Total Environ.* 409, 4016–4030.

X

- Xiong, T., Leveque, T., Austruy, A., Goix, S., Schreck, E., Dappe, V., Sobanska, S., Foucault, Y., Dumat, C., 2014a. Foliar uptake and metal(loid) bioaccessibility in vegetables exposed to particulate matter. *Environ. Geochem. Health* , <http://dx.doi.org/10.1007/s10653-014-9607-6>.

Y

Yamamoto N., Takahashi Y., Yoshinaga J., Tamaka A., Shibita Y. Size distribution of soil particles adhered to children's hands. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2006, 51, 157-163

Résumé

Dans un contexte où les préoccupations environnement-santé sont croissantes à l'échelle globale. Améliorer la compréhension des mécanismes de biodisponibilité et d'(éco)toxicité des polluants métalliques persistants est un enjeu prioritaire, notamment en raison de leur omniprésence observée dans les écosystèmes en relation avec leur compartimentation et spéciation. Le ver de terre est utilisé pour évaluer la qualité des sols ; de plus cet organisme du sol de par ses activités de bioturbation a une influence sur les cycles biogéochimiques. Des tests d'écotoxicité en conditions contrôlées sur vers de terre ont donc été réalisés avec différents sols et espèces de vers. Puis une étude d'impact sur les communautés de vers a été effectuée sur un site pollué présentant un gradient de concentration. L'influence de la bioturbation du ver sur la phytodisponibilité des polluants a été étudiée grâce à des expériences en mésocosmes. Finalement, des mesures de bioaccessibilité des polluants ont été réalisées *in vitro* sur des sols et végétaux pollués dans différents contextes : friches industrielles, jardins potagers, terrain de sport. L'objectif étant d'étudier le lien entre biodisponibilité pour l'homme, caractéristiques des sols et contexte de pollution. Deux approches complémentaires ont été développées : recherche scientifique liés aux mécanismes et développement d'outils, de procédures pratiques utilisables par les gestionnaires et évaluateurs de risques.

L'écotoxicité des métaux et métalloïdes (notés ETM) sur les vers de terre n'est pas simplement régie par leurs concentrations totales, mais dépend fortement des caractéristiques physico-chimiques des sols. Par ailleurs, l'analyse des communautés de ver de terre présentes sur un site contaminé permet d'évaluer la qualité des sols puisqu'on constate un impact sur les l'abondance, la diversité et le taux de juvénile des vers. De plus, la bioturbation du ver de terre augmente significativement la biodisponibilité des ETM pour les plantes potagères telles que la laitue. Finalement, la bioaccessibilité humaine des ETM est régi par de nombreux facteurs liés en particulier au contexte de pollution. Cette fraction bioaccessible des ETM est directement responsable de leur cytotoxicité sur les cellules intestinales. Ces différents résultats ont été complétés par des études mécanistiques (IR, EXAFS, XANES, μ -XRF).

Mots clés : Bioaccessibilité, Vers de terre, Sols pollués, ETM, (Eco)toxicité, Biodisponibilité, Evaluation des risques, Environnement-Santé-Société, Friches industrielles.

Abstract

In a context where environmental health concerns are globally increasing. Improve understanding of the mechanisms and bioavailability (eco) toxicity of persistent metals pollutants is a priority, especially because of their observed omnipresence in ecosystems in relation to their compartmentation and speciation. The earthworm is used to assess soil quality; moreover this soil organism through its bioturbation activities affects biogeochemical cycles. Ecotoxicity tests under controlled circumstances on earthworms have been conducted with different soils and worms' species. Then an impact study on earthworms' communities was conducted on a polluted site showing a concentration gradient. The influence of earthworms' bioturbation on phytoavailability of pollutants was studied through experiments in mesocosms and Rhizotest. Finally, *in vitro* measures of pollutants bioavailability were performed on polluted soils and plants in different contexts: brownfields, gardens, sports field. The objective is to study the link between bioavailability for humans, soil characteristics, context of pollution and toxicity. Two complementary approaches have been developed: scientific research related to the mechanisms and development of tools, practical procedures which could be used by managers and risk assessors.

Ecotoxicity of metals and metalloid (denoted ETM) on earthworms is not simply governed by their total concentrations, but strongly depends on the physico-chemical characteristics of soils. Furthermore, analysis of earthworm communities from a contaminated site can evaluate the quality of soil since seen an impact on the abundance, diversity and rate of juvenile worms. In addition, earthworms' bioturbation significantly increases the bioavailability of ETM for vegetable plants such as lettuce. Finally, the human bioaccessibility of ETM is governed by many factors, in particular the context of pollution. The bioaccessible fraction of ETM is directly responsible for their cytotoxicity on intestinal cells. These results were complemented by mechanistic studies (IR, EXAFS, XANES, μ -XRF).

Key-words: Bioaccessibility, Earthworms, Polluted soils, MTE, (Eco)toxicity, Biodisponibility, Risk assessment, Environmental health, Brownfield.