

UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ
U.F.R. DES SCIENCES ET TECHNIQUES
Laboratoire de Biologie Environnementale (EA 3184, UsC INRA)

THÈSE

Présentée en vue de l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ

Spécialité : Sciences de la vie

École doctorale : Homme, Environnement, Santé

CINÉTIQUES DE TRANSFERT DE POLLUANTS MÉTALLIQUES DU SOL À L'ESCARGOT

par

Frédéric GIMBERT

Soutenue le 07 décembre 2006 devant le jury composé de :

Paule VASSEUR (Professeur, Université de Metz)	Rapporteur
Reinhard DALLINGER (Professeur, University of Innsbruck, Autriche)	Rapporteur
Pierre-Marie BADOT (Professeur, Université de Franche-Comté)	Directeur
Annette de VAUFLEURY (HDR, Université de Franche-Comté)	Co-directrice
Willie J.G.M. PEIJNENBURG (Docteur, RIVM, Bilthoven, Pays-Bas)	Examineur
Antonio BISPO (Docteur, ADEME)	Examineur
Michaël COEURDASSIER (Docteur, Université de Franche-Comté)	Examineur
Martina G. VIJVER (Docteur, University of Leiden, Pays-Bas)	Examineur

Remerciements

Mes premiers remerciements vont au Docteur Annette de Vaufleury et au Professeur Pierre-Marie Badot, respectivement co-directrice et directeur de cette thèse. Annette a su me transmettre avec compétence et pédagogie son enthousiasme pour la recherche. Ses qualités scientifiques mais également humaines ont été pour moi un exemple tout au long de cette thèse. Sa disponibilité (y compris les week-ends !) et sa confiance sont pour beaucoup dans la réussite de ce travail. Le Pr Badot a su très professionnellement concilier ses responsabilités au sein de l'Université de Franche-Comté et l'encadrement de mon travail. Son implication scientifique dans la thèse et son expérience des relations humaines et de l'administration ont joué de manière complémentaire sur ma façon d'aborder certaines difficultés. Qu'ils trouvent tous deux dans ces quelques mots un témoignage de mon admiration, de mon respect et de mon amitié.

Je tiens à remercier les Professeurs Paule Vasseur et Reinhard Dallinger d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse ainsi que les Docteurs Willie Peijnenburg et Martina Vijver d'être membres du jury. Willie et Martina m'ont accueilli pendant près de deux mois dans leurs laboratoires avec beaucoup de gentillesse. Malgré leur emploi du temps très chargé, ils ont pris le temps de m'écouter, de répondre à mes questions et m'ont fait partager leur mode de travail et leur vision de la recherche. Je tiens à leur témoigner ma plus haute considération.

Le Docteur Antonio Bispo, en tant qu'ingénieur responsable ADEME de cette thèse, a suivi avec intérêt l'évolution de mes travaux. Je le remercie pour sa présence dans le jury en tant qu'examinateur et pour les échanges enrichissants que nous avons eu lors de nos multiples rencontres (comités de pilotage, congrès...).

J'ai eu également beaucoup de plaisir à travailler avec les Docteurs Renaud Scheifler et Michaël Coeurdassier. Leur expérience en écotoxicologie et en matière d'enseignement m'a été d'une aide précieuse au cours de ces trois années de thèse. Je leur fais part ici de ma reconnaissance.

Je veux remercier chaleureusement le Docteur Francis Douay, directeur du laboratoire Sols et Environnement de l'ISA de Lille, pour nous avoir donné accès aux sols du site de Metaleurop. Sa connaissance des sites et son aide, aussi bien pour les prélèvements que pour les analyses, ont été très appréciées. Je tiens ici à lui faire part de ma considération.

Les Professeurs Patrick Giraudoux et Lucien Gomot ont suivi mon parcours tout au long de ce travail. Le Pr Giraudoux a répondu présent à mes sollicitations statistiques et a su, par ses analyses critiques et constructives, me réorienter dans la bonne direction. Le Pr Gomot par ses relectures assidues de mes travaux et les discussions fructueuses que nous avons

partagées, souvent à l'animalerie, a enrichi mes connaissances des mollusques gastéropodes terrestres et du milieu de la recherche. Qu'ils trouvent dans ces lignes l'expression de ma gratitude.

Avant les Pays-Bas, j'ai eu l'opportunité de séjourner à l'INRA de Bordeaux-Aquitaine où j'ai travaillé avec le Docteur Valérie Sappin-Didier et le Professeur Michel Mench. Valérie m'a accueilli chaleureusement et appris avec patience les tenants et les aboutissants de la technique de dilution isotopique. Si les résultats de cette collaboration n'apparaissent pas dans ce manuscrit, leur valorisation est en marche. Je la remercie pour sa gentillesse et son professionnalisme. J'ai beaucoup appris au contact de Michel. Sa vision de la science et de la recherche, ses connaissances encyclopédiques dans de nombreux domaines ont été très bénéfiques pour moi. Je lui témoigne ici ma très haute estime et mon amitié.

Plus proches dans l'espace, mes colocataires de bureau, Anne-Laure et Florian, ont aussi contribué au bon déroulement de cette thèse. J'ai partagé avec Anne-Laure beaucoup plus qu'un bureau et que les repas de midi : des moments de joie, d'autres plus difficiles et beaucoup de vocabulaire franc-comtois, dont encore aujourd'hui je n'ai pas percé tous les secrets. Je lui témoigne ici mon affection et ma sincère amitié. Florian a été une oreille attentive à certaines de mes frustrations et j'espère lui avoir rendu la pareille. Sa grande tolérance n'a d'égal que le désordre de son bureau, deux aspects (parmi d'autres) de sa personnalité sur lesquels nous nous retrouvons. Je veux lui garantir mon soutien pour la fin de sa thèse et mon amitié. Samuel, Marc et Mickaël ont eux aussi partagé avec moi de nombreux moments au sein et à l'extérieur du LBE. Leur amitié, leur écoute et leurs conseils ont été et sont encore précieux. Qu'ils en soient remerciés.

Bien sûr, l'ensemble des membres du LBE, toutes catégories confondues, ont contribué d'une façon ou d'une autre à mon intégration et à l'aboutissement de ce travail. Si je ne veux tous les citer nommément de peur d'en oublier, je tiens à les remercier et à leur exprimer ma gratitude. J'espère modestement avoir moi aussi contribué aux bonnes relations au sein du laboratoire et avoir répondu présent aux sollicitations de chacun.

Enfin, je ne peux terminer ces remerciements sans citer Sandrine, ma femme, à qui je dois tant. Sans sa très grande patience, sa compréhension, son soutien et son affection, je n'aurais pu mener ce travail à bien. Elle a tant contribué à cette thèse et à faire de moi ce que je suis aujourd'hui qu'elle mériterait de figurer, à mes côtés comme dans la vie, sur la page de garde. Je ne peux que lui dédier ce travail et lui assurer, à elle et à Baptiste, un soutien sans faille et ma reconnaissance infinie.

Avant-propos

La structure retenue dans ce manuscrit de thèse est la suivante. Le chapitre I constitue l'introduction générale qui présente un état des connaissances actuelles relatives à la problématique de recherche envisagée. Ce premier chapitre dégage les besoins identifiés en recherche pour une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents aux transferts de polluants métalliques chez l'escargot et présente les objectifs formulés pour y répondre. Cette première partie expose également les méthodes et les outils biologiques et mathématiques originaux développés pour l'étude cinétique des transferts. Le détail des matériels et méthodes employés ainsi que les résultats des expérimentations réalisées seront développés dans les chapitres II à V qui, présentés dans un format de publication, constituent le corps du manuscrit. Le dernier chapitre (chapitre VI) est consacré à la discussion générale. Il reprend les acquis fondamentaux obtenus au cours de la thèse et présente différentes perspectives. Dans cette partie, l'accent est mis sur l'apport des différentes approches mises en œuvre pour l'analyse et la compréhension des transferts de métaux et du risque qui en résulte pour les écosystèmes.

Sommaire

Chapitre I. Introduction générale.....	p.1
I.1. Pollution des sols par les éléments traces métalliques (ETM).....	p.3
I.2. Utilisation des escargots dans l'étude de la contamination des sols par les ETM.....	p.5
I.3. Bioaccumulation et devenir des ETM chez l'escargot.....	p.8
<i>I.3.1. Sources et voies d'exposition et d'absorption.....</i>	<i>p.8</i>
<i>I.3.2. Devenir.....</i>	<i>p.10</i>
<i>I.3.3. Effets.....</i>	<i>p.12</i>
I.4. Biodisponibilité des ETM dans les sols.....	p.13
<i>I.4.1. Le concept de biodisponibilité.....</i>	<i>p.14</i>
<i>I.4.2. Facteurs influençant la biodisponibilité.....</i>	<i>p.15</i>
<i>I.4.3. Estimation de la biodisponibilité : mesure et modélisation.....</i>	<i>p.17</i>
I.5. Aspects cinétiques et dynamiques de la biodisponibilité.....	p.19
<i>I.5.1. Toxicocinétique.....</i>	<i>p.19</i>
<i>I.5.2. Toxicodynamique.....</i>	<i>p.24</i>
I.6. Définition des objectifs.....	p.24
Chapitre II. Modélisation de l'exposition chronique à un sol contaminé : une approche toxicocinétique avec l'escargot <i>Helix aspersa</i> (Modelling chronic exposure to contaminated soil: a toxicokinetic approach with the terrestrial snail <i>Helix aspersa</i>).....	p.27
Résumé.....	p.27
Abstract.....	p.29
II.1. Introduction.....	p.29
II.2. Materials and Methods.....	p.31
<i>II.2.1. Animals.....</i>	<i>p.31</i>
<i>II.2.2. Substrates.....</i>	<i>p.31</i>
<i>II.2.3. Exposure modalities.....</i>	<i>p.31</i>
<i>II.2.4. Sampling and analytical procedures.....</i>	<i>p.32</i>

II.2.5. Accumulation and elimination modelling and statistical analysis.....	p.33
II.3. Results	p.36
II.3.1. Accumulation and elimination kinetics in terms of concentration.....	p.36
II.3.2. Accumulation and elimination kinetics in terms of body burden.....	p.38
II.4. Discussion.....	p.41
II.4.1. Cadmium and elimination patterns in <i>H. aspersa</i>	p.41
II.4.2. Involvement of kinetic parameters in ecotoxicological studies.....	p.42
II.4.3. Implication in ecological risk assessment (ERA)	p.44
II.5. Conclusion.....	p.45
Acknowledgements.....	p.45
References.....	p.45

Chapitre III. Réponses à long terme d'escargots exposés à des sols contaminés par du cadmium dans une expérience portant sur trois étapes du cycle biologique (Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment)..... p.51

Résumé.....	p.51
Abstract.....	p.53

III.1. Introduction.....	p.53
---------------------------------	-------------

III.2. Materials and Methods.....	p.54
III.2.1. Animals.....	p.54
III.2.2. Substrates.....	p.54
III.2.3. Exposure modalities.....	p.55
III.2.4. Monitoring design.....	p.55
III.2.5. Chemical analysis.....	p.56
III.2.6. Models and statistical analysis.....	p.56

III.3. Results.....	p.57
III.3.1. Survival.....	p.57
III.3.2. Growth.....	p.57
III.3.2.1. Model choice.....	p.57
III.3.2.2. Effects of soil contamination on juvenile growth.....	p.58

III.3.2.3. <i>Effects of soil contamination on adult growth</i>	p.60
III.3.3. <i>Reproduction</i>	p.61
III.3.3.1. <i>Sexual differentiation and maturation</i>	p.61
III.3.3.2. <i>Reproductive capacities</i>	p.62
III.4. Discussion	p.63
III.5. Conclusion	p.66
Acknowledgements	p.67
References	p.67

Chapitre IV. Comment la répartition subcellulaire des ETM peut-elle aider à comprendre leurs cinétiques d'accumulation et d'élimination chez les escargots ? (How subcellular partitioning can help to understand heavy metal accumulation and elimination kinetics in snails)p.73

Résumé	p.73
Abstract	p.75

IV.1. Introduction	p.75
---------------------------------	-------------

IV.2. Materials and Methods	p.76
IV.2.1. <i>Test organisms</i>	p.76
IV.2.2. <i>Soils</i>	p.77
IV.2.3. <i>Experimental design</i>	p.78
IV.2.3.1. <i>Experiment 1: accumulation and elimination kinetics</i>	p.78
IV.2.3.2. <i>Experiment 2: internal metal fractionation</i>	p.78
IV.2.4. <i>Analytical procedures</i>	p.79
IV.2.5. <i>Modelling</i>	p.80

IV.3. Results	p.81
IV.3.1. <i>Accumulation and elimination kinetics (Experiment 1)</i>	p.81
IV.3.2. <i>Metal distribution and internal fractionation (Experiment 2)</i>	p.84

IV.4. Discussion	p.88
IV.4.1. <i>The toxicokinetic approach</i>	p.88
IV.4.2. <i>Subcellular partitioning for understanding metal trafficking through the body</i>	p.89

IV.5. Conclusion.....p.91

Acknowledgements.....p.92

References..... p.92

Résultats complémentaires. Comparaison des cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd, Pb et Zn chez *Helix aspersa* : concentrations vs quantités..... p.97

Chapitre V. Aspects cinétiques et dynamiques du transfert sol-plante –escargot du cadmium *in situ* (Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field).....p.103

Résumé..... p.103

Abstract..... p.105

V.1. Introduction..... p.105

V.2. Materials and Methods..... p.106

V.2.1. Animals.....p.106

V.2.2. Field experimental design..... p.107

V.2.3. Analytical procedures..... p.107

V.2.4. Accumulation modelling and statistical analyses..... p.108

V.3. Results.....p.109

V.3.1. Soil and plant analysis..... p.109

V.3.2. Snail mortality and growth..... p.111

V.3.3. Accumulation kinetics..... p.112

V.3.3.1. In terms of concentrations.....p.112

V.3.3.2. In terms of body burdens.....p.113

V.4. Discussion..... p.116

V.4.1. Cd transfer and accumulation in plants and snails.....p.116

V.4.2. Effects on snail mortality and growth..... p.118

V.4.3. Involvement of kinetic parameters in ecotoxicological studies.....p.118

V.4.4. Relevance in ecological risk assessment.....p.119

V.5. Conclusion..... p.120

Acknowledgements..... p.121

References..... p.121

Chapitre VI. Discussion générale et perspectives.....	p.127
VI.1. Apports des cinétiques d'accumulation et d'élimination.....	p.129
<i>VI.1.1. Cinétiques d'accumulation.....</i>	<i>p.129</i>
<i>VI.1.2. Cinétiques d'élimination.....</i>	<i>p.132</i>
VI.2. Les dynamiques internes de la bioaccumulation : toxicodynamique.....	p.133
<i>VI.2.1. Distribution, stockage et excrétion.....</i>	<i>p.134</i>
<i>VI.2.2. Effets toxiques.....</i>	<i>p.136</i>
VI.3. Contribution au développement d'une méthode d'évaluation de la biodisponibilité et des transferts des ETM du sol pour l'escargot.....	p.138
<i>VI.3.1 Intérêt du suivi cinétique de l'accumulation par rapport aux études statiques.....</i>	<i>p.138</i>
<i>VI.3.2 Facteurs influençant le transfert.....</i>	<i>p.141</i>
<i>VI.3.3 Concentrations ou quantités ?.....</i>	<i>p.142</i>
VI.4. Synthèse et perspectives.....	p.144
Après-propos	p.149
Références Bibliographiques.....	p.151

Liste des figures

Chapitre I. Introduction générale

Figure I.1. Apports et contribution relative de différentes sources à la contamination des sols agricoles par le Cd, le Cu, le Pb et le Zn. D'après Bourrelier et Berthelin, 1998..... p.5

Figure I.2. *Helix aspersa aspersa* adulte (Masse fraîche : 8-12 g ; Diamètre coquille : 30-40 mm). a) photographie ; b) dessin de l'escargot sorti de sa coquille (d'après Daguzan, 1983). Les pointillés rouges symbolisent la ligne de dissection séparant le pied des viscères..... p.6

Figure I.3. Dispositifs d'exposition des escargots. a) système "en boîte" ; b) microcosmes maintenus au laboratoire ; c) microcosmes implantés en milieu naturel ; d) microcosmes implantés en agrosystème..... p.7

Figure I.4. Voies et sources d'exposition de l'escargot aux polluants (Scheifler, 2002)..... p.9

Figure I.5. Principaux processus impliqués dans le concept de biodisponibilité. Adapté de Lanno et al., 2004..... p.14

Figure I.6. Représentation des pools métalliques dans le fractionnement en solution et des composants et réactions dans la spéciation chimique en phase liquide. Adapté de Sauvé (2002)..... p.16

Figure I.7. Cinétiques d'accumulation imaginées pour deux ETM (A et B) dans un organisme exposé à un environnement contaminé. ✕ symbolise la mesure ponctuelle des concentrations internes après un temps d'exposition t..... p.19

Figure I.8. Représentation schématique d'un modèle à un compartiment. Ci est la concentration interne. Ce est la concentration externe biodisponible dans le sol divisée en un pool métallique lié à la phase solide du sol (C_{e_s}) et un pool métallique soluble (C_{e_l}). k_1 représente le taux d'absorption et k_2 le taux d'excrétion..... p.20

Chapitre II. Modélisation de l'exposition chronique à un sol contaminé : une approche toxicocinétique avec l'escargot *Helix aspersa*

Figure II.1. Cd accumulation and elimination kinetics (concentrations) in the viscera of *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. a) ISO 0, b) ISO 20, c) ISO 100 and d) ME4. k_1 is given in $\text{mg}_s.\text{mg}_{sn}^{-1}.\text{d}^{-1}$, k_2 and k_g in d^{-1} . Each data point represents an individual

snail. Parameter estimates that share similar letters are not significantly different ($p > 0.05$). NS = non significant ($p > 0.05$) p.37

Figure II.2. Cd accumulation and elimination kinetics (concentrations) in the foot of *H. aspersa* snails exposed to different treatments. a) ISO 0, b) ISO 20, c) ISO 100 and d) ME4. k_1 is given in $\text{mg}_s \cdot \text{mg}_{sn}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, k_2 and k_g in d^{-1} . Each data point represents an individual snail. Parameter estimates that share similar letters are not significantly different ($p > 0.05$). NS = non significant ($p > 0.05$). Negative values should be considered as zero values..... p.38

Figure II.3. Cd accumulation and elimination kinetics (body burdens) in the viscera of *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. a) ISO 0, b) ISO 20, c) ISO 100 and d) ME4. Each data point represents an individual snail..... p.39

Figure II.4. Cd accumulation and elimination kinetics (body burdens) in the foot of *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. a) ISO 0, b) ISO 20, c) ISO 100 and d) ME4. Each data point represents an individual snail..... p.40

Chapitre III. Réponses à long terme d'escargots exposés à des sols contaminés par du cadmium dans une expérience portant sur trois étapes du cycle biologique

Figure III.1. Fresh mass and growth rate time course of *H. aspersa* snails (whole body) exposed to the different treatments. The arrow indicates the time at which snails were transferred to the uncontaminated substrate. Full black symbols represent the average fresh mass (g) ($n > 3$) and refer to the right axis. The associated curves correspond to the Gompertz modelling. Empty symbols represent the average measured growth rate ($n > 3$) ($\text{g} \cdot \text{d}^{-1}$) and refer to the left axis..... p.59

Figure III.2. Sexual differentiation and maturation of *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. a) time course of adult percentages, b) time course of the genital tract fresh mass and c) time course of the cumulative number of clutches. The arrow indicates the time at which snails were transferred to the uncontaminated substrat..... p.61

Figure III.3. Time course of the weekly number of clutches per snail in the different treatments. The arrow indicates the time at which snails were transferred to the uncontaminated substrate..... p.62

Chapitre IV. Comment la répartition subcellulaire des ETM peut-elle aider à mieux comprendre leurs cinétiques d'accumulation et d'élimination chez les escargots ?

Figure IV.1. Cd, Pb and Zn accumulation and elimination kinetics in the viscera and the foot of *Helix aspersa* snails exposed to the field contaminated soil. Each data point represents an individual snail..... p.82

Figure IV.2. Distribution (cumulative percentage) of Cd (a), Pb (b) and Zn (c) in the viscera, the foot and the gut of *Helix aspersa* snails during the exposure (10 days) and the depuration (5 days) phases..... p.84

Figure IV.3. Subcellular distribution of Cd in different tissues (a) gut, b) foot and c) viscera) of *Helix aspersa* snails during the exposure to the contaminated field soil (10 days) and the depuration (5 days) phases. C = the cytosolic fraction; D = granular fraction; E = cell debris fraction and Total = the total soft body concentrations obtained by summing all subcellular fractions. Values in the rectangles correspond to the metal proportions (%) present in the different fractions. White rectangles = uncontaminated OECD soil exposed snails; grey rectangles = contaminated field soil exposed snails..... p.85

Figure IV.4. Subcellular distribution of Pb in different tissues (a) gut, b) foot and c) viscera) of *Helix aspersa* snails during the exposure to the contaminated field soil (10 days) and the depuration (5 days) phases. C = the cytosolic fraction; D = granular fraction; E = cell debris fraction and Total = the total soft body concentrations obtained by summing all subcellular fractions. Values in the rectangles correspond to the metal proportions (%) present in the different fractions. White rectangles = uncontaminated OECD soil exposed snails; grey rectangles = contaminated field soil exposed snails.....p.86

Figure IV.5. Subcellular distribution of Zn in different tissues (a) gut, b) foot and c) viscera) of *Helix aspersa* snails during the exposure to the contaminated field soil (10 days) and the depuration (5 days) phases. C = the cytosolic fraction; D = granular fraction; E = cell debris fraction and Total = the total soft body concentrations obtained by summing all subcellular fractions. Values in the rectangles correspond to the metal proportions (%) present in the different fractions. White rectangles = uncontaminated OECD soil exposed snails; grey rectangles = contaminated field soil exposed snails..... p.88

Résultats complémentaires. Comparaison des cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd, Pb et Zn chez *Helix aspersa* : concentrations vs quantités

Figure IV.6. Évolution temporelle des concentrations internes en Cd (a, b), du Pb (c, d) et du Zn (d, e) dans les viscères et le pied des escargots exposés au sol contaminé. Chaque point représente un escargot..... p.98

Chapitre V. Toxicocinétiques : une voie pour évaluer l'influence de facteurs environnementaux sur le transfert sol-plante-escargot du cadmium *in situ*

Figure V.1. Cd concentrations in the shoots of the plant species sampled in the different plots in a) spring and b) autumn. For the same species, similar letters indicate the absence of significant difference ($p < 0.05$). p.110

Figure V.2. Average fresh masses ($n=6$) of the snails exposed to the different treatments (paired soil contamination / soil pH) during spring and autumn.....p.111

Figure V.3. Cd accumulation kinetics expressed in a) concentrations and b) body burdens in the soft tissues of *H. aspersa* snails exposed to the different plots during spring (continuous line, full circles) and autumn (dotted line, empty circles). Each data point represents an individual snail..... p.114

Chapitre VI. Discussion générale et perspectives

Figure VI.1. Schéma généralisé montrant les différents compartiments dans lesquels les ETM peuvent être présents et s'accumuler à l'intérieur d'un escargot (modifié de Rainbow, 2002). $[M]_{\text{métab.}}$ est le pool de métal métaboliquement disponible ; $[M]_{\text{exc.}}$ est le pool de métal en excès par rapport aux besoins métaboliques ; $[M]_{\text{stock.}}$ est le pool de métal stocké et $[M]_{\text{détox.}}$ est le pool de métal détoxiqué. † symbolise le seuil de mortalité..... p.134

Figure VI.2. Cinétiques d'accumulation du Cd *in situ* sur deux parcelles présentant des contaminations différentes. Comparaison des flux d'absorption (a , $\mu\text{g Cd.g}^{-1} \text{ esc.j}^{-1}$) et des concentrations internes à 56 jours ($C_{\text{sn}}(56)$, $\mu\text{g Cd.g}^{-1} \text{ esc}$). Les valeurs présentant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$) p.139

Figure VI.3. Principaux processus impliqués dans le concept de biodisponibilité. La disponibilité environnementale est envisagée comme la partition des ETM entre la phase solide du sol et l'eau interstitielle (à gauche). La biodisponibilité environnementale est représentée par les caractéristiques toxicocinétiques de l'absorption (flux d'absorption, a , et la concentration à l'équilibre, $C(\text{eq.})$, au centre) (Chapitres II, IV et V). La biodisponibilité toxicologique est présentée (à droite) sur la base de la distribution interne, du transport aux sites cibles d'action toxique et des processus de stockage des métaux accumulés (Chapitre IV). Adapté de Peijnenburg (2002) p.140

Figure VI.4. Schéma général des concepts développés et de leur implication en évaluation du risque environnemental lié à la contamination des sols par les ETM..... p.143

Figure VI.5. Représentation schématique des paramètres cinétiques de l'accumulation et de l'élimination des ETM par l'escargot *H. aspersa*. Avec k_1 , le taux d'absorption ; a , le taux d'assimilation et k_2 ; le taux d'excrétion..... p.145

Liste des tableaux

Chapitre I. Introduction générale

Tableau I.1. Classification des principaux ETM selon leur affinité pour des ligands oxygénés (classe A), des ligands azotés ou soufrés (classe B) et pour les deux types de ligands (classe intermédiaire). D'après Nieboer et Richardson (1980)..... p.3

Tableau I.2. Concentrations totales en ETM dans les sols français ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ sol sec). D'après Baize, 2000..... p.4

Tableau I.3. Dénomination et unités des paramètres cinétiques..... p.21

Chapitre II. Modélisation de l'exposition chronique à un sol contaminé : une approche toxicocinétique avec l'escargot *Helix aspersa*

Table II.1. Physico-chemical characteristics of ISO soil and top layer (0-20 cm) of ME4 soil..... p.32

Table II.2. Main characteristics of the accumulation of Cd (body burdens) by *H. aspersa* snails exposed to the different substrates..... p.39

Table II.3. Main characteristics of the elimination of Cd (body burdens) by *H. aspersa* snails exposed to the different substrates..... p.41

Chapitre III. Réponses à long terme d'escargots exposés à des sols contaminés par du cadmium dans une expérience portant sur trois étapes du cycle biologique

Table III.1. Measured and modelled parameters of the growth of *H. aspersa* snails (whole body) exposed to different treatments. W_{max} is the maximal mass reached (g), k_g the growth constant (d^{-1}), I the time at the inflection point (d) and t_0 the time (d) at which mass would be zero..... p.58

Table III.2. Parameters of the Gompertz model fitted to the foot, viscera and shell growth data of the *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. W_{max} is the maximal mass reached (g), k_g the growth constant (d^{-1}) and I the time at the inflection point (d)..... p.60

Table III.3. Internal concentrations (C_{sn}) and parameter estimates for uptake of Cd in the foot and the viscera of *H. aspersa* snails exposed to the different treatments.....p.66

Chapitre IV. Comment la répartition subcellulaire des ETM peut-elle aider à mieux comprendre leurs cinétiques d'accumulation et d'élimination chez les escargots ?

Table IV.1. Physico-chemical characteristics of the ISO artificial and ME4 field soils....p.77

Table IV.2. Estimates for kinetic parameters for Cd, Pb and Zn accumulation in *Helix aspersa* snails exposed to the field contaminated soil..... p.83

Table IV.3. Estimates for kinetic parameters for Cd, Pb and Zn elimination from *Helix aspersa* snails previously exposed to the field contaminated soil..... p.83

Résultats complémentaires. Comparaison des cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd, Pb et Zn chez *Helix aspersa* : concentrations vs quantités.

Tableau IV.4. Estimation des paramètres cinétiques de l'accumulation du Cd, du Pb et du Zn dans les escargots exposés au sol contaminé sur la base de leurs concentrations internes (C_{sn})..... p.99

Tableau IV.5. Estimations des paramètres cinétiques de l'élimination du Cd, du Pb et du Zn des escargots précédemment exposés au sol contaminé..... p.100

Chapitre V. Toxicocinétiques : une voie pour évaluer l'influence de facteurs environnementaux sur le transfert sol-plante-escargot du cadmium *in situ*

Table V.1. Main physico-chemical characteristics of the plot soils..... p.109

Table V.2. Main characteristics of the Cd accumulation (concentrations) in *H. aspersa* snails exposed to the different plots..... p.113

Table V.3. Main characteristics of the Cd accumulation (body burdens) in *H. aspersa* snails exposed to the different plots..... p.115

Chapitre VI. Discussion générale et perspectives

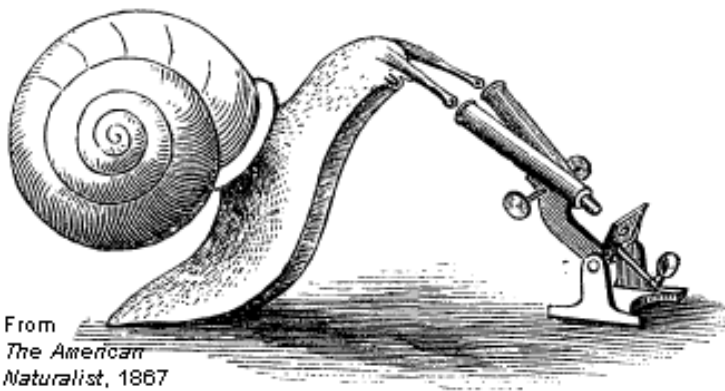
Tableau VI.1. Sous-estimation (<) et sur-estimation (>) des potentiels de bioaccumulation du Cd, du Pb et du Zn par les FBA statiques 28 jours dans les escargots juvéniles exposés à un sol contaminé (ME4) p.130

Tableau VI.2. Paramètres cinétiques et estimation des quantités à l'équilibre du Cd, Pb et Zn accumulés dans l'escargot *H. aspersa* exposé en laboratoire au sol ME4..... p.131

Tableau VI.3. Résultats des analyses de régression pour les concentrations en Cd ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) entre les compartiments sol-plantes (n=18x3), sol-escargot (flux d'absorption, a, n=36) et plantes-escargot (a, n=18x3). Pt=*Poa trivialis*, Tp=*Trifolium pratense*, Rr=*Ranunculus repens*. *p*, pente; *q*, ordonnée à l'origine; *r*, coefficient de détermination. *r* significatif à * $p<0,05$, ** $p<0,01$ et *** $p<0,001$; ns=non significatif..... p.142

Chapitre I

Introduction générale



Chapitre I

Introduction générale

La contamination de l'environnement par les éléments traces métalliques (ETM), l'augmentation du nombre de friches industrielles et le recensement croissant de sites pollués (voir les bases de données Basol à <http://basol.environnement.gouv.fr> et Basias à <http://basias.brgm.fr>) sont des préoccupations majeures des sociétés humaines en ce début de siècle. Malgré la prise en compte de ces problèmes dans les politiques publiques et les efforts de recherche, un certain nombre de points restent à améliorer comme la préservation de la qualité des sols qui est devenue, au même titre que la protection des milieux aquatiques et aériens, un enjeu d'importance, comme en témoigne la récente proposition de la Communauté Européenne d'une directive cadre de la protection des sols (Directive COM(2006)232).

I.1. Pollution des sols par les éléments traces métalliques (ETM)

Les éléments traces sont les 68 éléments minéraux, constituants de la croûte terrestre, présentant une concentration inférieure à 0,1% (Alloway, 1995 ; Baize, 1997). Ensemble, ils ne représentent que 0,6% du total des éléments. L'expression « éléments traces métalliques » fait référence aux métaux présents à l'état de traces tels que le cadmium (Cd), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le plomb (Pb), le zinc (Zn),... Le terme de « métaux lourds », s'il reste largement utilisé, est sujet à discussion, la masse atomique de référence étant controversée (Hopkin, 1989). Pour résoudre ces difficultés, Nieboer et Richardson (1980) ont proposé une classification des ETM à destination des biologistes et basée sur les propriétés chimiques des ETM (Tableau I.1). Cette classification est importante pour la compréhension des mécanismes intra- et intercellulaire de transport et de stockage des ETM.

Tableau I.1. Classification des principaux ETM selon leur affinité pour des ligands oxygénés (classe A), des ligands azotés ou soufrés (classe B) et pour les deux types de ligands (classe intermédiaire). D'après Nieboer et Richardson (1980).

Classe A	Classe intermédiaire	Classe B
calcium	plomb	cadmium
magnésium	fer	cuivre
manganèse	chrome	zinc
potassium	cobalt	mercure
strontium	nickel	argent
sodium	arsenic	

Les ETM dans les sols proviennent de différentes sources. Les ETM endogènes sont hérités du matériau parental, redistribués par les processus pédogénétiques et constituent le fond pédogéochimique (Baize, 1997). La concentration naturelle de ces éléments dans les sols varie selon la nature de la roche, sa localisation, son âge et de la nature de l'élément (Tableau I.2).

Tableau I.2. Concentrations totales en ETM dans les sols français ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ sol sec). D'après Baize, 2000.

ETM	Minimum	Moyenne	Maximum	Médiane
Cd	<0,02	0,42	6,99	0,16
Cr	<2	75,0	691	66,3
Cu	<2	14,9	107	12,8
Fe	50	3650	19160	3240
Mn	<10	1585	24975	754
Ni	<2	41,3	478	31,0
Pb	2,2	64,8	3088	34,1
Zn	<5	149	3820	80,0

Les ETM exogènes peuvent être d'origine naturelle (érosion, émissions volcaniques, feux de forêt) (Garrett, 2000) ou anthropiques (Senesi et al., 1999). Trois principaux types de pollutions anthropiques sont responsables de l'augmentation des flux de métaux (Figure I.1) :

✓ la pollution industrielle qui émet dans l'environnement (air, sol, eau) de nombreux ETM provenant principalement des activités métallurgiques telles que le traitement des minerais, l'exploitation minière ou des processus industriels comme le recyclage du plomb des batteries ou la fabrication de peintures. Il faut distinguer les apports diffus d'origine lointaine, des apports ponctuels localisés d'origine proche. Dans les apports diffus sont classés les poussières et aérosols pouvant parcourir des centaines de kilomètres à partir de leur source avant de se déposer (Godin et al., 1985 ; Merian et al., 2004). Les apports localisés résultent de rejets anthropiques liés aux activités industrielles de longue durée sans protection efficace contre la dispersion dans l'environnement (Baize, 1997).

✓ la pollution liée aux activités agricoles *via* l'application de produits ou substances destinés à améliorer les propriétés physico-chimiques du sol. Parmi ces apports il est possible de distinguer : les engrais (Cd dans les engrais phosphatés ; Hamon et al., 1998), les produits phyto-sanitaires (Cu dans la bouillie bordelaise ; Morgan et Taylor, 2004), les lisiers (Cu, Zn, Cd ; Moore et al., 2006)...

✓ la pollution urbaine qui regroupe des émissions atmosphériques liées au trafic routier et à l'incinération des ordures ménagères (Denison et Silbergeld, 1988) et des rejets

solides sous la forme des composts et des boues de station d'épuration épandues dans les champs (Robert et Juste, 1999 ; McBride, 1995).

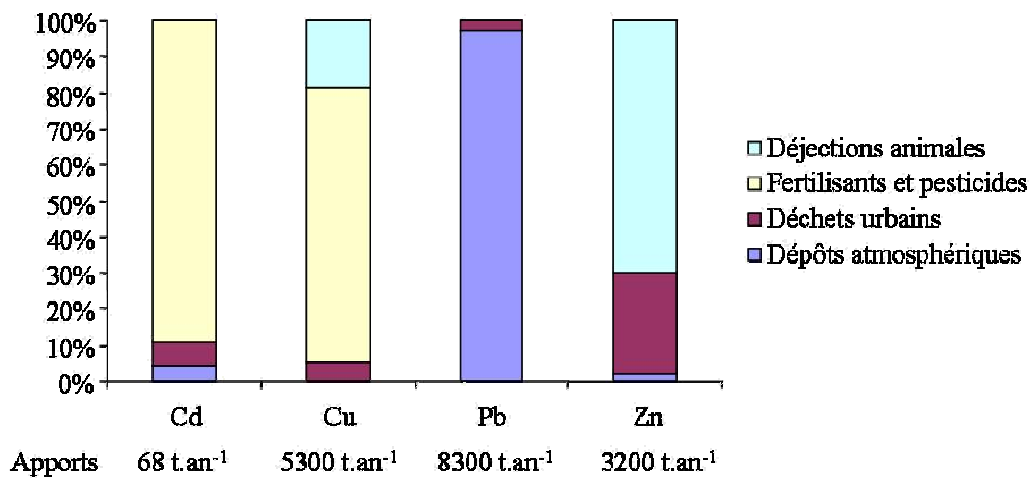


Figure I.1. Apports et contribution relative de différentes sources à la contamination des sols agricoles par le Cd, le Cu, le Pb et le Zn. D'après Bourrelier et Berthelin, 1998.

Dans ce contexte, la communauté scientifique est sollicitée pour proposer des méthodes et des outils fiables visant à étudier le devenir des polluants dans l'environnement et leurs conséquences écologiques. Ce sont les objectifs de l'écotoxicologie (Calow, 1998). L'amélioration des procédures d'évaluation des risques et le développement d'outils mathématiques et biologiques de biosurveillance de la qualité des sols doit permettre de répondre à ces préoccupations.

I.2. Utilisation des escargots dans l'étude de la contamination des sols par les ETM

Selon la définition générale de Spellerberg (2005), un indicateur biologique peut être défini comme une espèce reflétant l'état du milieu dans lequel elle vit. Il doit pour cela répondre à un certain nombre de critères (Hopkin, 1993 ; Edwards et al., 1996) :

- ✓ participer activement au fonctionnement de l'écosystème,
- ✓ être sédentaire, largement distribué et facile à identifier et à échantillonner,
- ✓ être bioaccumulateur,
- ✓ être tolérant aux fortes contaminations de l'environnement,
- ✓ leur écologie et physiologie doivent être connues.

L'utilisation des invertébrés pour l'évaluation de la qualité des écosystèmes a une longue histoire dans les milieux aquatiques (Phillips, 1977) et terrestres (Eijsackers, 1983).

Plus récemment on s'est intéressé, en milieu terrestre, à la faune du sol et notamment aux escargots (Mollusques, Gastéropodes, Pulmonés). Ils remplissent les critères précédemment développés et sont reconnus comme des indicateurs écologiques pertinents (Berger et Dallinger, 1993 ; Cortet et al., 1999), car :

- ✓ ils représentent une biomasse significative au sein de la communauté des invertébrés du sol (Dallinger et al., 2001),
- ✓ ils occupent une situation privilégiée à l'interface sol-plante-atmosphère (Barker, 2001),
- ✓ ils intègrent des sources et voies de contamination multiples (cf. § I.2.1.),
- ✓ ils possèdent des capacités de bioaccumulation importantes pour de nombreux polluants métalliques (Dallinger et Wieser, 1984a ; Brooks et al., 1992 ; Gomot et Pihan, 1997 ; Menta et Parisi, 2001 ; Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2002 ; Viard et al., 2004) et organiques (Coeurdassier et al., 2001 ; Sverdrup et al., 2006),
- ✓ ils présentent des réponses physiologiques (inhibition de croissance, de reproduction, mortalité) (Laskowski et Hopkin, 1996a ; Gomot, 1997 ; Swaileh et Ezzughayyar, 2001 ; Gomot-de Vaufleury et Bispo, 2000 ; Notten et al., 2006) et biochimiques (Coeurdassier et al., 2001 ; Ismert et al., 2002 ; Regoli et al., 2006) quand ils sont exposés aux contaminants,
- ✓ ils constituent un élément des réseaux trophiques qui contribue au transfert des polluants du sol et/ou des plantes aux prédateurs (Beeby, 1985 ; Laskowski et Hopkin, 1996b ; Scheifler et al., 2002a).

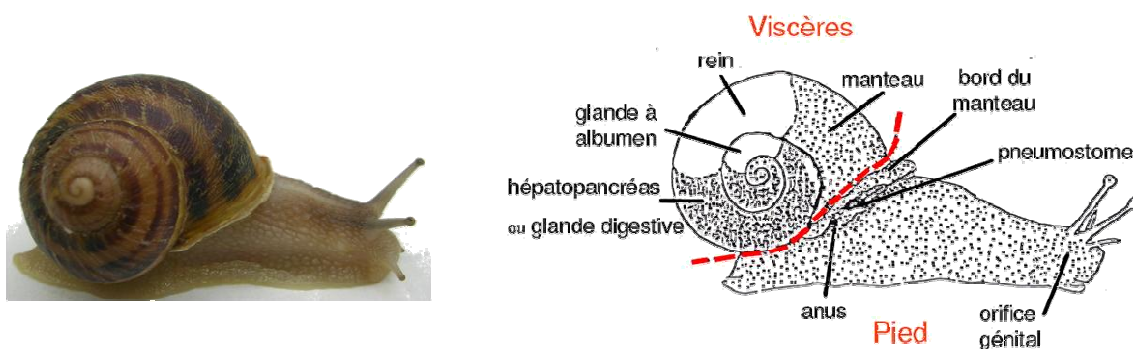


Figure I.2. *Helix aspersa aspersa* adulte (Masse fraîche : 8-12 g ; Diamètre coquille : 30-40 mm). a) photographie ; b) dessin de l'escargot sorti de sa coquille (d'après Daguzan, 1983). Les pointillés rouges symbolisent la ligne de dissection séparant le pied des viscères.

Parmi les espèces d'escargots utilisées en écotoxicologie, le Laboratoire de Biologie Environnementale a porté ses efforts sur *Helix aspersa aspersa* Müller (aussi nommé *Cantareus aspersus* ou *Cornu aspersum* dans la nomenclature récente, Barker, 2001) ou

escargot petit-gris (Figure I.2). Le choix préférentiel de cette espèce est principalement lié à sa distribution mondiale, traduisant ses capacités d'adaptation à des biotopes, des sols et des climats variés, et à ses facilités d'élevage (Gomot et Deray, 1987). Les escargots utilisés au cours des expérimentations proviennent d'une population originaire de la région de Cavaillon (Sud-est de la France), maintenue au laboratoire depuis 1996. Ils sont obtenus par la technique d'élevage dite "hors sol" effectuée en intérieur dans un environnement contrôlé, permettant de disposer d'animaux toute l'année. Le cycle d'élevage et les conditions de maintenance de l'élevage (photopériode, température, humidité) ont été décrits en détail par Gomot-de Vaufleury (2000).

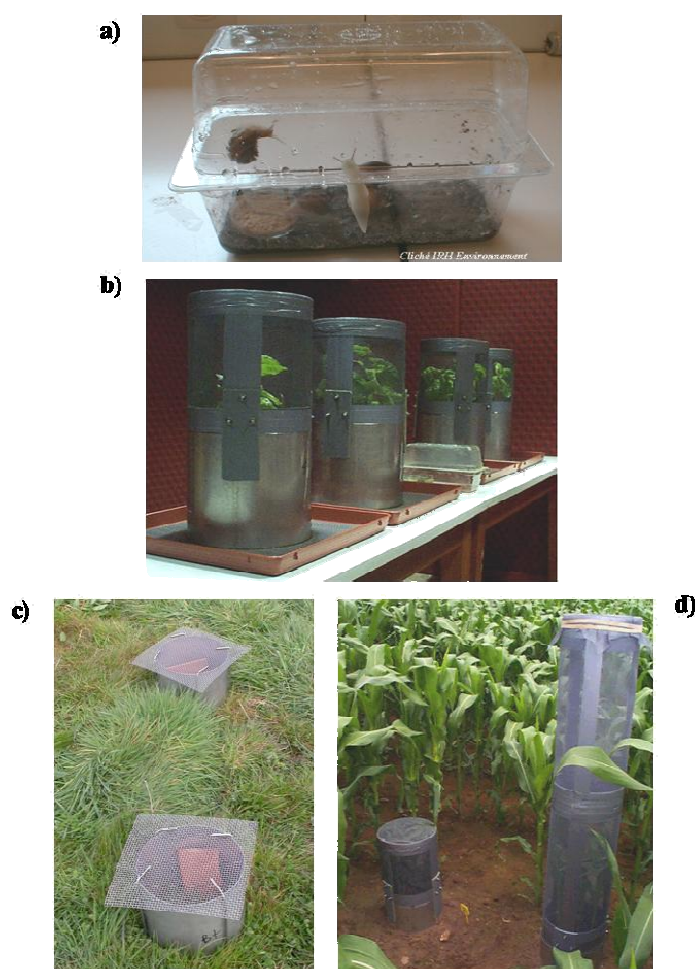


Figure I.3. Dispositifs d'exposition des escargots. a) système "en boîte" ; b) microcosmes maintenus au laboratoire ; c) microcosmes implantés en milieu naturel ; d) microcosmes implantés en agrosystème.

L'approche écotoxicologique distingue deux aspects complémentaires. Le premier concerne la description, l'analyse et la compréhension des phénomènes fondamentaux qui régissent les interactions entre les ETM et les composantes abiotiques et biotiques du sol. Ce type d'approche fondamentale est réalisé en laboratoire, en conditions contrôlées, avec des

bioessais d'accumulation et de toxicité "en boîte" (Figure I.3a, Gomot-de vaufleury, 2000) ou en microcosme, système plus complexe permettant d'intégrer des niveaux trophiques variés (Figure I.3b, Scheifler et al., 2006). Les systèmes simples dits "en boîte" sont aujourd'hui normalisés à des fins d'évaluation des effets sur la croissance suite à l'exposition à un sol contaminé (ISO, 2006). Le second aspect est une autre approche, en conditions réelles, pour évaluer les risques et protéger l'environnement. Elle met également en oeuvre les microcosmes pour l'encagement en nature (*in situ*) d'escargots calibrés issus de l'élevage et destinés à la biosurveillance active de milieux naturels ou d'agrosystèmes (Figure I.3c et d, Scheifler et al., 2003, de Vaufleury, 2006).

Si l'ensemble de ces connaissances constitue des bases sérieuses pour l'utilisation des escargots en évaluation du risque d'exposition aux ETM des sols (de Vaufleury et al., 2006), d'autres recherches sont nécessaires, en particulier pour connaître et comprendre les aspects cinétiques qui actuellement ne sont pas pris en compte dans les procédures d'étude de la qualité des milieux terrestres.

I.3. Bioaccumulation et devenir des éléments traces métalliques chez l'escargot

I.3.1. Sources et voies d'exposition et d'absorption

Une fois libérés dans l'environnement, les ETM sont soumis à des processus de transport et de dispersion complexes à l'intérieur et entre les différents compartiments de la biosphère. La répartition des contaminants à l'intérieur d'un écosystème donné dépend de leurs propriétés intrinsèques ainsi que des caractéristiques biotiques et abiotiques du milieu. Les propriétés physico-chimiques et la stabilité des composés toxiques, la nature du compartiment contaminé et les rythmes d'apports influencent la contamination des milieux et l'exposition des organismes. L'exposition peut être définie comme la coïncidence dans l'espace et dans le temps d'un récepteur et d'un "stresseur" qui entrent en contact et interagissent (Chapman et al., 2003). Dans le contexte de la contamination des milieux, les stresseurs sont les polluants chimiques (dont les ETM), les récepteurs incluent toutes les espèces identifiées au niveau d'un site tandis que le contact et les interactions sont représentés par l'accumulation des contaminants dans les organismes. L'exposition des organismes est généralement exprimée comme une concentration. Cependant, l'importance du facteur temps dans l'accumulation et l'induction d'effets toxiques à l'échelle de l'organisme conduit à exprimer l'exposition comme une dose (Suter II, 1993). L'exposition doit également être

examinée à l'échelle du site ou de la parcelle, considérant la variabilité spatiale de la contamination (Kooistra et al., 2001). L'exposition dépend donc à la fois de la physico-chimie du milieu et de la biologie de l'organisme considéré (van Straalen et van Gestel, 1998).

A l'interface sol-plante-atmosphère, l'escargot intègre plusieurs sources de contaminations accessibles *via* différentes voies d'exposition (Figure I.4) :

- ✓ digestive par ingestion de nourriture (plante mais également particules de sols, Gomot et al., 1989),
- ✓ cutanée par diffusion des polluants du sol à travers l'épithélium du pied (Coourdassier et al., 2002 ; Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2002),
- ✓ respiratoire par inhalation de gaz et/ou de particules atmosphériques (Ismert et al., 2002, Regoli et al., 2006).

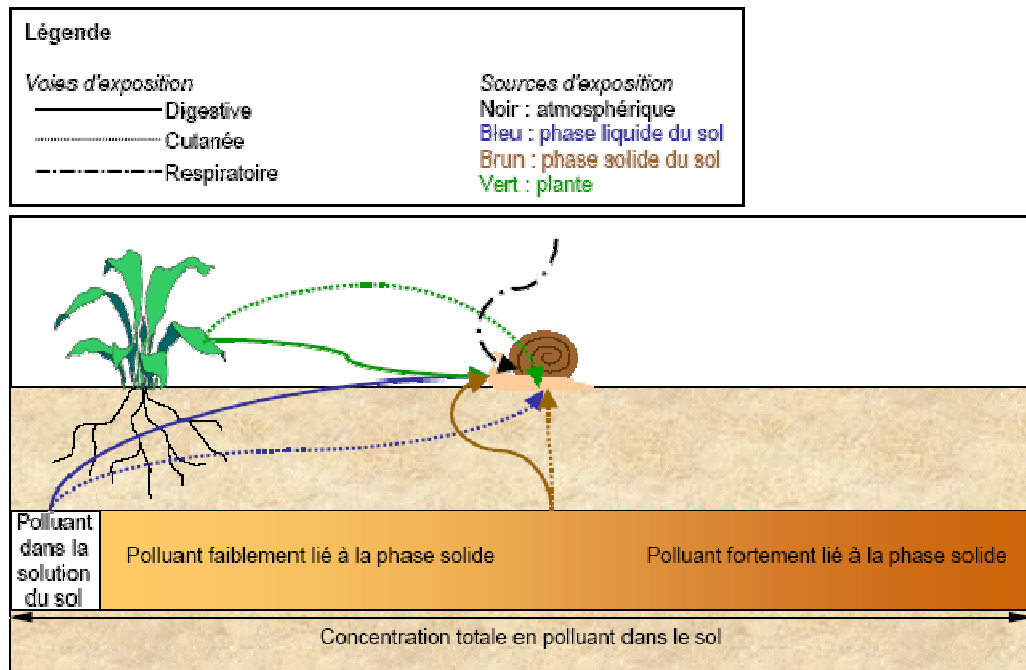


Figure I.4. Voies et sources d'exposition de l'escargot aux polluants (Scheifler, 2002).

L'absorption des ETM par les invertébrés est étroitement liée à la fréquence et à la durée de l'exposition, aux interactions entre le milieu et l'élément considéré, qui conditionnent sa biodisponibilité, et aux caractéristiques des différentes sources d'exposition. Chez de nombreux invertébrés du sol intégrant plusieurs sources de contamination (sol et nourriture), comme les mille-pattes, les collemboles ou les isopodes, l'exposition liée à la phase solide du sol contribue principalement à l'absorption d'ETM par rapport à la nourriture (Descamps et al., 1996 ; Crommentuijn et al., 1997, Vijver et al., 2006b). De même, chez *H.*

aspersa, la contribution du sol à l'accumulation totale des ETM est supérieure à 80% pour le Pb, comprise entre 30 et 60% pour le Zn et entre 2 et 40% pour le Cd (Scheifler et al., 2006). Les taux d'assimilation et la toxicité des ETM dépendent fortement des ligands auxquels ils sont liés dans la nourriture et des mécanismes variés de désorption et d'assimilation des ETM dans la lumière du tube digestif (Hopkin, 1989 ; Berger et al., 1993).

Dans le sol, les concentrations totales en ETM incluent des formes dites non-biodisponibles (*i.e.* fortement liées à la phase solide du sol) et des formes biodisponibles (*i.e.* faiblement liées à la phase solide du sol ou en solution dans l'eau interstitielle). Pour les vers de terre, organismes inféodés au sol, il est généralement admis que les ETM dans la solution du sol reflètent les formes disponibles pour l'accumulation (théorie de la « pore water hypothesis », Janssen et al., 1997b). Chez *Lumbricus rubellus*, les concentrations internes en Cu et Pb sont entièrement attribuées à la voie cutanée et seulement 0-17% et 21-30% des concentrations en Cd et Zn proviennent de l'ingestion de particules de sol (Vijver et al., 2003). Lors de l'exposition au sol comme seule source de contamination, la voie digestive contribue à environ 90% de l'accumulation de Cd chez des *H. aspersa* (Coeurdassier et al., 2002). Bien que l'absorption cutanée soit relativement faible chez l'escargot, elle n'est pas négligeable et plusieurs mécanismes ont été proposés pour expliquer le passage des ions métalliques à travers les membranes biologiques : diffusion passive sous forme libre ou sous forme de complexes organométalliques liposolubles (Ireland, 1982 ; Hopkin, 1989), canaux et pompes ioniques, passage facilité par des transporteurs membranaires (Simkiss et Taylor, 1989 ; Rainbow et Dallinger, 1993), structures épithéliales particulières comme les « channel cells » (Campion, 1961 ; Martin et Deyrup-Olsen, 1986). Ainsi, si la théorie de la « pore water hypothesis » a été appliquée avec succès à de multiples reprises chez les vers de terre, son adaptation à des organismes qui ne sont pas strictement inféodés au sol, comme les escargots, doit être démontrée, d'autant plus qu'une étude, utilisant la technique de dilution isotopique, a permis de mettre en évidence que 16% du Cd total accumulé dans les tissus d'*Helix aspersa* provenait du pool « non-disponible » (Scheifler et al., 2003).

I.3.2. Devenir

L'accumulation dans les organismes est le résultat net des processus d'absorption/assimilation, de distribution, de stockage et d'excrétion (Dallinger, 1993).

Les mollusques gastéropodes sont connus pour leur grande capacité d'accumulation des ETM les plus fréquents, à savoir le Cd, le Cu, le Pb et le Zn. Cette propriété a été mise à profit pour utiliser les escargots comme bioindicateurs de pollution par les ETM (Coughtrey

et Martin, 1977 ; Berger et Dallinger, 1993 ; Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2000 ; Beeby et Richmond, 2002 ; Viard et al., 2004a ; Notten et al., 2005). Dans toutes les espèces étudiées à ce jour, la glande digestive (ou hépatopancréas) contient systématiquement les plus fortes concentrations en Cd, Pb et Zn (Coughtrey et Martin, 1976; Cooke et al., 1979; Dallinger et Wieser, 1984a). Le tube digestif semble également jouer un rôle dans le stockage du Cd, le pied apparaissant plus comme un site d'accumulation transitoire en liaison avec l'absorption cutanée (Dallinger et Wieser, 1984a ; Chabicoovsky et al., 2003). Le Cu, associé à l'hémocyanine, est distribué de manière plus homogène dans le corps entier et s'accumule principalement dans le manteau et le pied (Dallinger et Wieser, 1984a ; Gomot et Pihan, 1997). La coquille des escargots n'est pas un site de stockage important pour le Cd et le Zn. Des escargots (*H. aspersa*), prélevés dans des zones hautement contaminées, présentent des concentrations de l'ordre de $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (Cooke et al., 1979). Seul le Pb a été retrouvé dans la coquille mais à des quantités n'excédant pas 3% des quantités totales accumulées dans l'organisme (Beeby et Richmond, 1989 ; Beeby et al., 2002).

Les fortes capacités d'accumulation des ETM chez les escargots sont liées à l'efficacité des systèmes de détoxification impliquant des structures de séquestration et de compartimentation intracellulaire (métallothionéines (MTs) et granules) mais aussi à leur capacités limitées à excréter certains métaux, conditionnées notamment par la nécessité d'éviter les pertes excessives d'eau (Dallinger et al., 2001). Les escargots possèdent plusieurs isoformes distinctes de MTs, exprimées dans différents tissus où elles accomplissent des fonctions spécifiques à chaque métal (Dallinger et al., 1993, 1997 ; Berger et al., 1993, 1995). Ainsi chez *Helix pomatia*, une isoforme est rapidement induite suite à une exposition au Cd (Berger et al., 1995), liant 85 à 95% de cet ETM dans l'hépatopancréas (Dallinger et al., 1993), alors qu'une seconde isoforme, isolée dans le manteau (Berger et al., 1997), est impliquée dans la liaison et le métabolisme du Cu (Dallinger et al., 2005). L'existence de MTs spécifiques de certains ETM fait de ces molécules des candidats potentiels pour un système de biomarqueurs différentiels basé sur approche isoforme-spécifique (Dallinger et al., 2000, 2004). Une partie du Cu accumulé est également prise en charge par l'hémocyanine et séquestrée dans des granules de pyrophosphate (Coughtrey et Martin, 1976 ; Dallinger, 1993). Dans l'hépatopancréas, le Zn est principalement associé à des granules de pyrophosphate dans les cellules basophiles (Hopkin, 1989). La part restante est fixée à des MTs ou à d'autres protéines cytosoliques de faible poids moléculaire (Dallinger et al., 1993). Bien qu'également stocké dans l'hépatopancréas, le Pb stimule l'activité lysosomale de plusieurs espèces de gastéropodes et s'accumule dans des granules de lipofuscine à l'intérieur des cellules

digestives de l'hépatopancréas (Hopkin, 1989). Il est ensuite lentement excrété dans la lumière des tubules hépatopancréatiques puis du tube digestif après dégénérescence cellulaire, exocytose ou extrusion de vésicules (Dallinger, 1993).

I.3.3. Effets

Les études des effets toxiques des ETM sur les escargots au niveau individuel ont en grande majorité été réalisées en laboratoire. Une large diversité d'effets dose-dépendants a ainsi été mise en évidence à différents niveaux d'organisation biologique.

Les effets biochimiques de l'exposition aux ETM chez les escargots sont peu documentés, à l'exception de l'induction précoce de la synthèse des structures de stockage (MTs et granules) développée plus haut. Une étude récente a démontré que l'exposition *in vitro* au Zn, Cu et Cd provoque une inhibition des activités des nucléotidases dans l'hépatopancréas d'*H. aspersa* mais n'altère pas l'activité des cholinestérases (de Sousa Dahm et al., 2006).

Russell et al. (1981) ont observé les réponses histo- et cytopathologiques de plusieurs organes de *H. aspersa* exposé à des concentrations croissantes de Cd dans la nourriture. Les réactions générales impliquent une hyperplasie des épithéliums aux plus faibles concentrations testées (entre 10 et 50 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) et une destruction cellulaire importante aux fortes concentrations (entre 100 et 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Plus récemment, Chabicoovsky et al. (2004) ont montré qu'une exposition de long terme (supérieure à 40 jours) à de la laitue enrichie à 270 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ provoquait à partir d'une concentration interne de 450 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$, une surcharge des MT dans l'hépatopancréas d'*H. pomatia* à l'origine d'apoptoses cellulaires et d'une mortalité supérieure à 10% chez les individus exposés. Chez la même espèce, Manzl et al. (2004) ont également observé la toxicité aiguë du Cd et du Zn sur les cellules de l'hépatopancréas. A l'échelle de l'organe, des concentrations de 200 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{g}^{-1}$ de nourriture provoquent une inhibition importante du développement du tractus génital chez *H. aspersa* (Gomot-de Vaufleury et Kerhoas, 2000). Beeby et al. (2002) ont montré, en exposant en laboratoire des escargots *H. aspersa* à de la nourriture contaminée au Pb, une diminution de 15 à 25% de la masse de la coquille. Jordaens et al. (2006) n'ont cependant pas trouvé de relation significative entre la pollution des sols par les ETM (Cd, Cr, Pb et Zn) et la solidité et la morphologie des coquilles de populations de l'escargot *Cepea nemoralis* prélevées *in situ*.

Parmi les effets comportementaux, une réduction dose-dépendante de la prise de nourriture a été souvent observée chez des escargots nourris avec des aliments présentant des concentrations élevées en ETM toxiques comme par exemple *H. aspersa* (Russell et al.,

1981 ; Laskowski et Hopkin, 1996a ; Gomot, 1997) et *H. pomatia* (Berger et al., 1993), *H. engaddensis* (Swaileh et Ezzughayyar, 2000) ou *Cepea nemoralis* (Notten et al., 2006).

Les effets physiologiques et écophysiologiques étudiés chez les escargots ont principalement concerné les réponses dose-dépendantes de la croissance et de la reproduction à une exposition aux ETM. Généralement, les effets sont significatifs pour des concentrations relativement élevées en métaux dans la nourriture. Les CE₅₀ 28 jours croissance et reproduction évaluées chez différentes espèces du genre *Helix* sont d'environ 100 µg Cd.g⁻¹ alors qu'elles sont supérieures à 1000 µg.g⁻¹ pour le Cu, le Pb et le Zn. Gomot-de Vaufleury (2000) observe même l'absence d'effet d'un aliment contaminé à 30000 µg Pb.g⁻¹ sur la croissance de *H. aspersa*. D'autres comportements peuvent être modifiés de façon dose-dépendante en réponse à un empoisonnement par des ETM : diminution de l'activité reproductrice, du nombre de pontes et de la fécondité chez *H. aspersa* (Russell et al., 1981 ; Laskowski et Hopkin, 1996a ; Gomot et Kerhoas, 2000). Aucune étude de terrain n'a permis de mettre en évidence des effets toxiques directs des métaux sur des paramètres écophysiologiques sublétaux.

Enfin, très peu d'études se sont intéressées aux effets de la pollution par les ETM sur les caractères biologiques (« life history traits ») individuels d'*H. aspersa* (croissance, fécondité, reproduction et mortalité) dans une approche populationnelle (Coourdassier, 2001 ; Laskowski et Hopin, 1996a). Les principaux résultats soulignent que le coefficient de croissance de la population est plus affecté par un retard de maturité sexuelle que par de fortes inhibitions de fécondité.

Lors de l'exposition à un environnement contaminé, pour qu'un ETM absorbé soit assimilé par un organisme, s'accumule et exerce potentiellement des effets toxiques, il est nécessaire qu'il soit biodisponible. Ce terme, s'il est aujourd'hui très largement utilisé, n'en est cependant pas moins difficile à appréhender et doit être défini avec précision car il présente un caractère fondamental dans les transferts d'ETM.

I.4. Biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sols

Une variable importante à prendre en considération pour évaluer les flux de polluants entrant dans un organisme est la biodisponibilité. Cependant, la biodisponibilité des ETM dans l'environnement est un concept complexe qui dépend de nombreux facteurs chimiques, physiques et biologiques (Phillips et Rainbow, 1993 ; Peijnenburg et al., 1997). Au niveau

international, une définition consensuelle de la biodisponibilité est actuellement en cours de discussion entre chimistes, biologistes animaux ou végétaux ou écotoxicologues (ISO/DIS 17402, 2006), ce qui témoigne de la nécessité de préciser les aspects conceptuels et opérationnels de la biodisponibilité retenus ici.

1.4.1. Le concept de biodisponibilité

Dans cette thèse, le pool biodisponible sera défini comme la part de la quantité totale d'un ETM présent dans un compartiment environnemental spécifique qui, dans un laps de temps donné, est disponible (ou rendue disponible) pour être assimilée par un organisme à partir de son environnement immédiat (exposition cutanée) et/ou par ingestion de nourriture (voie digestive) (Peijnenburg et Jager, 2003).

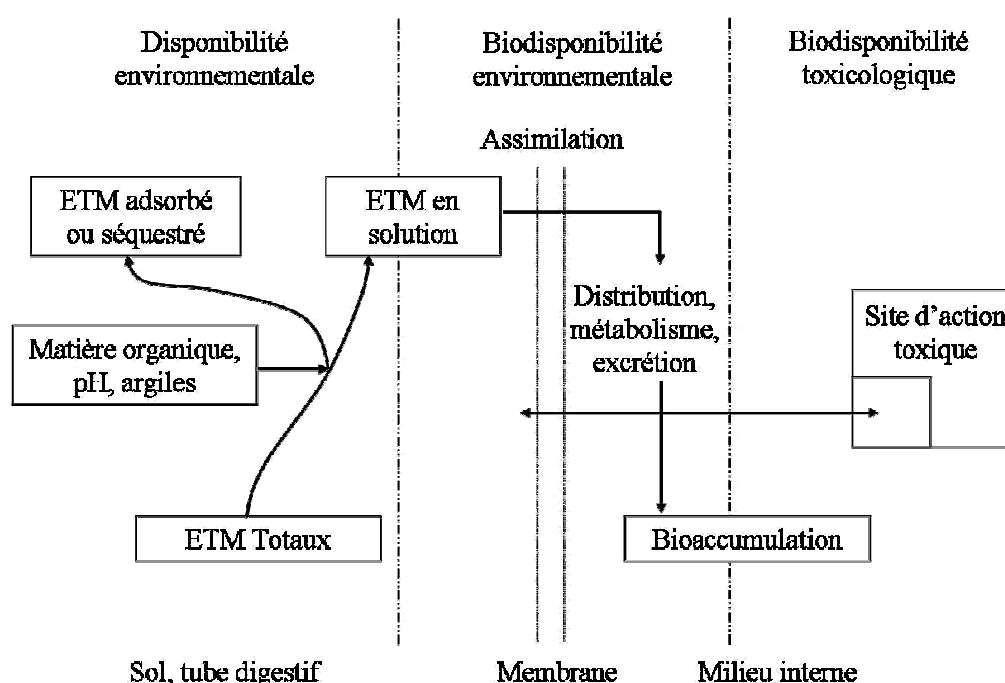


Figure I.5. Principaux processus impliqués dans le concept de biodisponibilité. Adapté de Lanno et al., 2004.

En pratique, des concentrations totales en ETM identiques entre deux sols différents peuvent être toxiques ou non (Sauvé et al., 2000). Ceci illustre la complexité de la biodisponibilité qui doit être abordée comme un concept comportant trois types de processus distincts (Figure I.5) (Hamelink et al., 1994 ; Peijnenburg et al., 1997) :

- ✓ la disponibilité environnementale qui décrit les processus physico-chimiques régissant la partition de la substance étudiée entre la phase solide et la phase liquide du sol,
- ✓ la disponibilité biologique ou biodisponibilité environnementale qui considère

les processus physiologiques spécifiques à l'espèce considérée régissant l'absorption et l'assimilation de la substance,

✓ la biodisponibilité toxicologique qui correspond à la redistribution de la substance dans l'organisme et à ses effets toxiques.

Cette définition met en avant la nécessité d'appréhender la biodisponibilité dans sa dimension cinétique. En effet, la biodisponibilité est susceptible de varier significativement au cours du temps en raison de l'évolution des phénomènes physico-chimiques au niveau du sol et des stades de développement des organismes. De plus, la biodisponibilité est spécifique d'un contaminant donné pour un organisme donné. L'extrapolation des résultats obtenus pour une espèce à d'autres espèces, même taxonomiquement proches, s'avère donc délicate et souligne la nécessité d'étudier des cibles biologiques variées représentant différents niveaux trophiques (Peijnenburg, 2002 ; van Straalen, 2005).

1.4.2. Facteurs influençant la biodisponibilité

Disponibilité environnementale

L'impact des ETM sur l'environnement est étroitement associé à leur forme chimique et à la phase du sol dans laquelle ils se trouvent. Le terme de spéciation est généralement dévolu à la détermination des espèces chimiques dans la solution du sol, principalement en distinguant les formes métalliques libres, les complexes ioniques inorganiques et les complexes fulviques et/ou humiques dissous. Le terme fractionnement sera quant à lui associé à la répartition des ETM entre les différentes phases solides présentes dans la matrice (Figure I.6). La concentration en ETM dans la solution du sol est régulée par des phénomènes d'adsorption/solubilité contrôlés par les conditions environnementales. L'un des principaux facteurs influençant la spéciation des ETM est l'acidité (pH) du sol. Une augmentation du pH modifie la partition phase solide-phase liquide des cations vers la phase solide entraînant généralement une diminution de leur mobilité et de leur disponibilité (Alloway, 1995). Un autre facteur de contrôle est la quantité disponible de sites de sorption, associée à la matière organique et à la capacité d'échange cationique (CEC) d'un sol (Lock et Janssen, 2001 ; Lock et al., 2000) mais aussi la quantité de cations susceptible d'entrer en compétition pour les sites de complexation sur la phase solide du sol (Weltje, 1998). La partition des ETM entre les différentes phases de sorption est supposée à l'équilibre. Cependant, l'appauvrissement de l'une des formes métalliques peut se produire, le plus souvent les ions libres car ils reflètent la

réactivité chimique du métal et sont souvent rapidement absorbés par les organismes (Vijver et al., 2005). La vitesse à laquelle une nouvelle situation d'équilibre se met en place dépend des concentrations totales en ETM dissous, de la concentration et de la nature des ligands présents dans la solution. La libération d'ions libres, désorbés des ligands inorganiques en solution, nécessite seulement quelques minutes alors que la libération des ETM depuis la phase solide vers la solution du sol peut prendre de quelques heures à plusieurs jours.

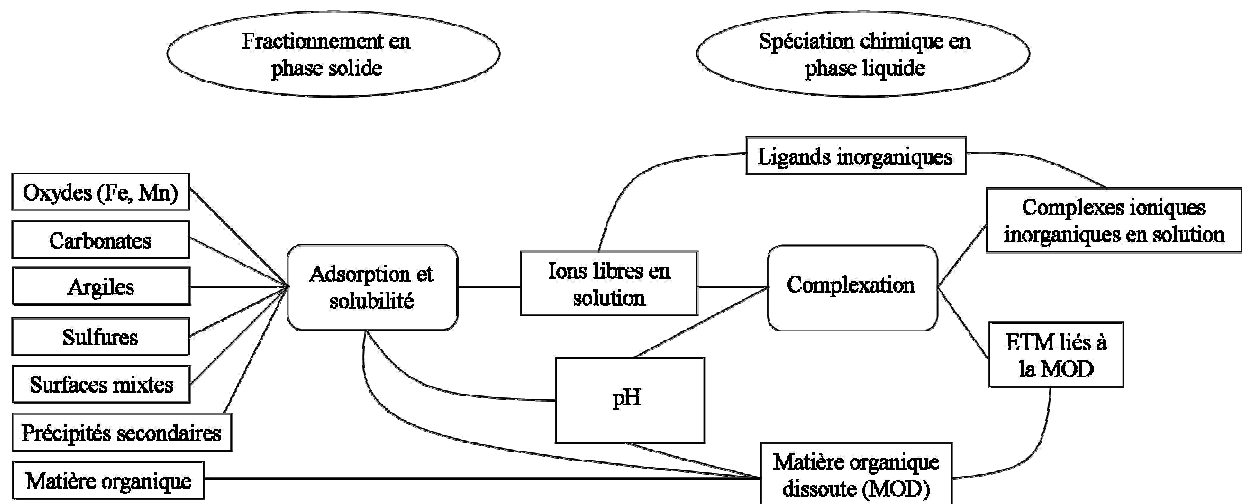


Figure I.6. Représentation des pools métalliques dans le fractionnement en solution et des composants et réactions dans la spéciation chimique en phase liquide. Adapté de Sauvé (2002).

Biodisponibilité environnementale

Le pool métallique biologiquement disponible est celui qui peut réellement être prélevé par les organismes. L'ampleur de l'assimilation d'un ETM dépend des capacités de relargage du sol et des capacités d'assimilation de l'organisme. La forme sous laquelle un ETM peut être absorbé dépend de l'organisme considéré et est influencée par les voies d'absorption possibles. D'un point de vue écologique, deux voies d'absorption principales, ou la combinaison des deux, peuvent être envisagées pour les invertébrés du sol : la voie cutanée et la voie orale. Ces voies d'absorption des ETM et leurs sources associées chez l'escargot ont été décrites précédemment (cf § I.3.1).

La bioaccumulation intègre à la fois les problèmes relatifs à la disponibilité (espèces chimiquement réactives pour l'absorption) et la biodisponibilité (espèces chimiques biodisponibles, voies d'absorption, besoins physiologiques) environnementales des ETM. La mise en évidence de la bioaccumulation de plusieurs ETM a été décrite dans différentes conditions de contamination (expérimentale ou *in situ*, cf § I.3) et le challenge de cette thèse est d'en aborder l'analyse cinétique indispensable à l'interprétation du devenir des ETM dans

les organismes. Le comportement des ETM chez plusieurs espèces d'invertébrés terrestres a été décrit par des modèles cinétiques de premier ordre (Janssen et al., 1991 ; Peijnenburg et al., 1999a, b ; Spurgeon et Hopkin, 1999 ; Vijver et al., 2005, 2006). Sur la base de ces travaux, des adaptations à l'escargot sont proposées en tenant compte (1) de la spécificité du modèle biologique choisi car nous avons retenu des animaux en croissance qui font déjà l'objet du test d'effet standardisé (ISO, 2006) et (2) des sources et voies d'exposition et du comportement des différents ETM. La présentation des modèles cinétiques utilisés sera détaillée en I.5.

Biodisponibilité toxicologique

La biodisponibilité toxicologique correspond au comportement toxicodynamique des ETM à l'intérieur des organismes et s'avère étroitement liée à leur physiologie. Les métaux assimilés sont distribués dans les organismes *via* le système circulatoire et peuvent être séquestrés sous une forme biologiquement disponible (ions libres ou complexés, liés au centre fonctionnel de certaines protéines et enzymes) ou métaboliquement isolés sous des formes non toxiques. Une revue de la spéciation interne des métaux observable au niveau cellulaire chez les invertébrés du sol est donnée par Vijver et al. (2004). Ces informations constituent une base pour interpréter de façon plus précise les relations entre les concentrations internes mesurées et les effets toxiques observés (Chabicoovsky et al., 2004 ; de Vaufleury et al., 2006).

Dans les trois processus caractérisant la biodisponibilité, les ETM peuvent se présenter sous des formes disponibles et non disponibles. Le transfert des ETM à l'interface sol-organisme dépend à la fois de l'espèce métallique considérée, des propriétés du sol et de l'eau interstitielle (régissant la partition des ETM entre les phases solide et liquide du sol) et des caractéristiques spécifiques à chaque organisme (*e.g.* les voies d'absorption, les stratégies de détoxification et d'excrétion). Leur prise en compte dans les méthodes d'évaluation de la biodisponibilité, des transferts et de leurs effets s'avère par conséquent nécessaire.

I.4.3. Estimation de la biodisponibilité : mesure et modélisation

L'ensemble des informations développées précédemment souligne le fait que la biodisponibilité des ETM ne peut être estimée par une seule méthode mais qu'elle nécessite une combinaison de mesures chimiques et biologiques complémentaires comme recommandé par Alexander et al. (2003).

Si les concentrations totales dans le sol sont encore utilisées pour explorer la question de la biodisponibilité des ETM, des méthodes ont été développées pour simuler les pools métalliques disponibles dans les sols. Ainsi la disponibilité chimique peut être déterminée par des extractions simples avec des sels neutres comme le CaCl_2 0,01 M (Houba et al., 1996, 2000 ; Degryse et al., 2003), le NaNO_3 0,1 M ou le NH_4NO_3 1 M (Lebourg et al., 1998 ; Pueyo et al., 2004) ; des acides dilués comme le HCl (Impellitteri et al., 2003) ou le HNO_3 (Tipping et al., 2003) ou des extractants organiques comme le DTPA ou l'EDTA (Manouchehri, 2006). Dans la même optique, des extractions séquentielles sont aussi utilisées (Abollino et al., 2005 ; Basta et Gradwohl, 2000). Les concepts chimiques sous-jacents à la biodisponibilité sont également décrits par les relations (fonctions multivariées) décrivant l'impact des propriétés du sol sur la partition des ETM entre les phases du sol (Lee et al., 1996 ; Janssen et al., 1997a ; Sauvé et al., 2000 ; Impellitteri et al., 2002, 2003 ; Carlon et al., 2004). Les logiciels de spéciation comme WHAM (Tipping, 1994) ou WinHumicV (Gustafsson, 1999) font également partie de la panoplie d'outils utilisables pour estimer et prédire la disponibilité chimique des ETM dans les sols.

L'évaluation de la biodisponibilité environnementale, en tant que fraction réellement prélevée par les organismes, peut être simplement mesurée en analysant le contenu en ETM d'un organisme après exposition à un environnement contaminé durant une période donnée. Le rapport de la concentration interne sur la concentration dans le milieu (substrat ou nourriture) permet de calculer un facteur de bioaccumulation (FBA), reflet des potentiels d'accumulation des ETM dans les organismes. Différentes méthodes ont aussi été développées pour prédire l'absorption des ETM dans les organismes. La première, connue sous le nom de « Free Ion Activity Model » (FIAM, Morel, 1983), est basée sur les mécanismes chimiques sous-jacents aux processus d'absorption (van Leeuwen, 1999 ; Lofts et al., 2005). Si le FIAM ne s'intéresse qu'aux formes métalliques libres en solution, la « pore water hypothesis » considère tous les ETM en solution, incluant les formes dissoutes et complexées à des ligands organiques ou inorganiques. Ce type d'approche apparaît comme un outil pragmatique présentant des capacités prédictives de la bioaccumulation chez plusieurs organismes du sol (van Gestel, 1997 ; Peijnenburg et al., 1999a, b). La prédiction des effets toxiques des ETM est basée sur ces concepts. Ainsi de nombreuses études ont tenté de trouver des corrélations entre les modifications de la solubilité et de la spéciation des ETM dans les sols et leur toxicité pour les organismes, certaines avec succès (Spurgeon et al., 2006 ; van Gestel et Koolhas, 2004) d'autres avec plus de difficultés (Crommentuijn et al., 1997 ; Oste et al., 2001). D'autres techniques dites biomimétiques semblent prometteuses pour l'évaluation

de la biodisponibilité et de la bioaccumulation des ETM. C'est le cas par exemple du gradient de diffusion en gels fins (« diffusive gradients in thin films », DGT) qui simule l'absorption par les organismes (Zhang et Davison, 2000 ; Nowack et al., 2004 ; Kovariková et al., 2005). Cependant, l'ensemble de ces procédures ne considère pas les aspects cinétiques et dynamiques de la bioaccumulation.

I.5. Aspects cinétiques et dynamiques de la biodisponibilité

La biodisponibilité des ETM est à la fois dépendante du métal, de l'organisme cible considérés et de leur interaction en fonction du temps (Rand, 1995). L'accumulation (équilibre entre assimilation et excrétion) relève des aspects toxicocinétiques ; la distribution des ETM aux sites cibles et les effets toxiques induits constituent les aspects toxicodynamiques.

I.5.1. Toxicocinétique

Les études traitant de la bioaccumulation des ETM dans les organismes peuvent être basées sur des observations statiques des concentrations internes après une durée d'exposition donnée à un environnement contaminé. Cependant, ces mesures ne prennent pas en compte les processus dynamiques évoqués précédemment qui, selon la durée d'exposition choisie, peuvent ne pas être en équilibre. La connaissance cinétique du comportement interne des ETM permet, elle, une meilleure estimation des potentiels de bioaccumulation, évitant les sous-estimations (ETM A) ou surestimations (ETM B) des FBA par rapport à l'état d'équilibre (Figure I.7).

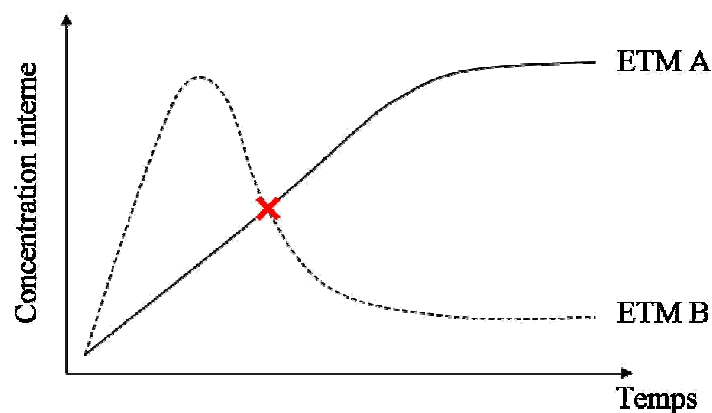


Figure I.7. Cinétiques d'accumulation imaginées pour deux ETM (A et B) dans un organisme exposé à un environnement contaminé. X symbolise la mesure ponctuelle des concentrations internes après un temps d'exposition t.

Ainsi, en association avec les équilibres physico-chimiques dans les sols, il existe un besoin d'étudier les équilibres entre le milieu et les organismes exposés au cours du temps plutôt que de s'intéresser uniquement aux concentrations internes mesurées après un temps donné. Cependant, les études cinétiques d'accumulation ne sont pas connues pour de nombreux invertébrés du sol et notamment chez *H. aspersa* où elles n'ont jamais été décrites.

Généralement, les études cinétiques prennent la forme d'analyses répétées des concentrations internes dans l'organisme après que celui-ci ait été mis en contact avec le milieu d'exposition. L'évolution des concentrations internes en fonction du temps peut alors être décrite par des modèles toxicocinétiques. Les modèles les plus utilisés sont les modèles à compartiment(s) avec des échanges du premier ordre entre les compartiments. Le modèle utilisé au cours de cette thèse est un modèle à un compartiment qui considère le corps de l'organisme comme une seule unité cinétiquement homogène (Figure I.8). Le modèle assume que le polluant absorbé s'équilibre rapidement et de manière homogène dans les différents fluides et tissus.

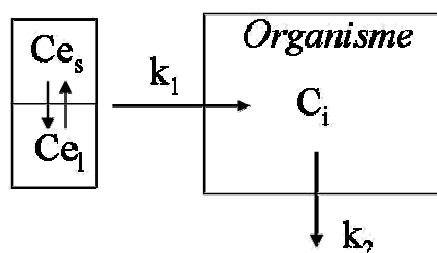


Figure I.8. Représentation schématique d'un modèle à un compartiment. C_i est la concentration interne. C_e est la concentration externe biodisponible dans le sol divisée en un pool métallique lié à la phase solide du sol (C_{e_s}) et un pool métallique soluble (C_{e_l}). k_1 représente le taux d'absorption et k_2 le taux d'excrétion.

Le modèle toxicocinétique retenu et présenté ci-après a été utilisé pour décrire l'accumulation des ETM chez des arthropodes (Janssen et al., 1991 ; Descamps et al., 1996, Bibic et al., 1997, Kramarz, 1999a, b ; Vijver et al., 2005) et des vers (Neuhauser et al., 1995 ; Peijnenburg et al., 1999b ; Spurgeon et Hopkin, 1999 ; Vijver et al., 2005). Si l'ensemble de ces études a utilisé un protocole expérimental globalement similaire et le même modèle, le vocabulaire et les unités employées présentent une grande variabilité. Il nous est donc apparu nécessaire d'établir un postulat de départ qui sera suivi tout au long de ce mémoire de thèse.

Pour décrire les phases expérimentales, les phénomènes et les mécanismes biologiques, les termes suivants seront utilisés : durant la **phase d'exposition**, l'**accumulation** peut avoir lieu et est le résultat de deux mécanismes : l'**absorption** et l'**excrétion**. Durant la **phase de dépuración**, l'**élimination** peut survenir et est le résultat de

l'excrétion. L'ajustement du modèle sur des données exprimées en concentration ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ organisme masse sèche, MS) ou en quantité ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{organisme}^{-1}$ MS) peut également être à l'origine d'une certaine confusion dans la dénomination et les unités des paramètres cinétiques du modèle. Le consensus établi ici est présenté en Tableau I.3.

Tableau I.3. Dénomination et unités des paramètres cinétiques.

Paramètre	Dénomination	Unités	
		pour des données exprimées en concentration	pour des données exprimées en quantité
a	flux d'absorption	$\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}\text{esc MS}\cdot\text{j}^{-1}$	$\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{esc}\cdot\text{j}^{-1}$
k_1	taux d'absorption	$\text{g}_{\text{sol}}\cdot\text{g}^{-1}\text{esc MS}\cdot\text{j}^{-1}$	$\text{g}_{\text{sol}}\cdot\text{esc}\cdot\text{j}^{-1}$
k_2	taux d'excrétion	j^{-1}	j^{-1}

Durant la phase d'exposition au milieu contaminé, l'évolution des concentrations en ETM dans l'escargot (C_{sn} , $\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ escargot MS) en fonction du temps (t , jours) peut être décrite par l'équation de premier ordre suivante :

$$C_{sn}(t) = C_{sn}(0) + \frac{a}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad (1)$$

avec $C_{sn}(0)$, la concentration mesurée dans les escargots à $t=0$ ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc MS). Ce pool originel est considéré comme constant au cours de l'exposition.

Le flux d'absorption (a) peut être décomposé de la façon suivante :

$$a = k_1 \times C_e \quad (2)$$

avec C_e , la concentration externe en ETM biodisponible dans l'environnement ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ sol MS). Comme dans tous les modèles cinétiques de premier ordre, k_1 est considéré comme indépendant de la concentration externe.

Si la valeur numérique du taux absorption k_1 est indépendante de la source d'exposition (phase solide ou liquide du sol), elle peut néanmoins prendre différentes unités ($\text{g sol}\cdot\text{g}^{-1}$ organisme MS $\cdot\text{j}^{-1}$, pour une exposition à la phase solide ou $\text{mL}_{\text{solution}}\cdot\text{g}^{-1}$ organisme MS $\cdot\text{j}^{-1}$ pour une exposition à la phase liquide) (Peijnenburg et al., 1999b). En ce qui concerne les escargots exposés aux ETM du sol, la voie d'exposition étant principalement digestive (Coeurdassier et al., 2002), les taux d'absorption seront déterminés à partir de la concentration totale en ETM dans le sol et seront exprimés en $\text{g}_{\text{sol}}\cdot\text{g}^{-1}\text{esc MS}\cdot\text{j}^{-1}$.

Dans une optique d'étude de la biodisponibilité des ETM des sols, l'attention sera portée sur deux aspects de la courbe d'accumulation : le flux d'absorption (a) pour la phase initiale d'exposition et la concentration à l'équilibre ($C_{sn}(eq.)$, $\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc MS) après une exposition prolongée. Cette dernière peut être estimée à partir de l'équation suivante :

$$C_{sn}(eq.) = C_{sn}(0) + \frac{a}{k_2} \quad (3)$$

A partir de cette concentration à l'équilibre, les FBA peuvent être calculés selon l'équation :

$$FBA = \frac{C_{sn}(eq.) - C_{sn}(0)}{C_e} = \frac{k_1}{k_2} \quad (4)$$

La plupart des expérimentations font suivre la phase d'exposition par une phase de dépuration au début de laquelle les organismes sont transférés dans un milieu non contaminé et analysés dans le temps afin d'observer l'élimination potentielle des ETM précédemment accumulés. Durant cette phase, l'évolution des concentrations internes en fonction du temps a été fréquemment décrite (Janssen et al., 1991 ; Kramarz, 1999a, b ; Spurgeon et Hopkin, 1999) par le modèle suivant :

$$C_{sn}(t) = C_{sn}(0) + \frac{a}{k_2}(1 - e^{-k_2 t}) - \frac{a}{k_2}(1 - e^{-k_2(t-t_c)}) \quad (5)$$

avec t_c , le temps auquel les organismes ont été transférés dans le milieu non contaminé (jours).

La synthèse bibliographique ayant souligné les capacités de stockage des escargots (cf. § I.3.2), nous proposons un autre type de modèle (adapté de Martins et Boaventura, 2002) comportant une fraction inerte ou résiduelle permettant de rendre compte de la mobilité des ETM à l'intérieur de l'organisme vers des pools de stockage aux dynamiques différentes. L'équation suivante a donc été utilisée :

$$C_{sn}(t) = C_{mr} + (C_{mu} - C_{mr}) \times e^{(-k_2(t-t_c))} \quad (6)$$

où C_{mu} est la concentration en ETM à la fin de la phase d'exposition ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc MS), C_{mr} est la concentration en ETM résiduelle dans les escargots à la fin de la phase de dépuration

($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc MS). Quand un état d'équilibre est atteint durant la phase d'exposition, alors $C_{\text{mu}} = C_{\text{sn}}(\text{eq.})$.

Lorsque t tend vers l'infini, C_{sn} tend vers C_{mr} et un facteur d'élimination (FBE) peut être calculé avec l'équation suivante :

$$FBE = \frac{C_{\text{mu}} - C_{\text{mr}}}{C_{\text{mu}}} = 1 - \frac{C_{\text{mr}}}{C_{\text{mu}}} \quad (7)$$

Le FBE peut prendre des valeurs entre 0 (pas d'élimination) et 1 (élimination totale).

Pour l'analyse statistique des cinétiques, Moriarty (1983) recommande l'utilisation des quantités plutôt que des concentrations, ces dernières pouvant être affectées par des changements de masse des organismes (Spacie et Hamelink, 1985). De plus, si les concentrations peuvent caractériser des seuils de toxicité, elles ne sont pas forcément pertinentes pour l'évaluation des charges en ETM transférables dans les réseaux trophiques. C'est pourquoi les cinétiques d'accumulation et d'élimination et leurs paramètres ont également été déterminés sur la base des quantités ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{escargot}^{-1}$). Dans ce cas, les études ont été conduites de la même façon qu'en concentrations, en remplaçant C par Q dans les équations (1), (3), (6) et (7).

L'intérêt respectif de ces unités ainsi que les éléments guidant le choix de l'une ou de l'autre seront traités dans ce mémoire.

La connaissance des cinétiques d'accumulation et d'élimination est importante pour une meilleure compréhension des processus physiologiques contrôlant l'assimilation, la distribution, le stockage, l'élimination et la toxicité des ETM. Une première étape dans cette perspective est l'évaluation des potentiels de bioaccumulation des ETM. L'utilisation classique des FBA dans cette voie est controversée, leur caractère statique étant peu approprié dans l'évaluation des risques environnementaux (Chapman et al., 1996). Aussi, l'*Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) propose de les calculer selon une méthode cinétique comme présentée en Eq. (4) (OECD, 1996). Renforçant les suggestions de Peijnenburg et al. (1997) et McMillen et al. (2003) selon lesquelles les mesures biologiques cinétiques de la bioaccumulation pourraient améliorer les procédures d'évaluation des risques liés à la contamination des sols, van Straalen et al. (2005) suggèrent que les flux d'absorption (a), plutôt que les concentrations internes, sont, en relation avec

l'analyse des effets, de meilleurs indicateurs de la biodisponibilité des ETM. Si l'assimilation est contrôlée par la biodisponibilité de l'ETM dans les sols, l'élimination et le stockage sont contrôlés par l'organisme. La connaissance des mécanismes de distribution, de séquestration et de toxicité constitue donc la seconde étape dans le développement de nouvelles méthodes d'évaluation des risques pour les milieux terrestres (Vijver et al., 2004).

1.5.2. Toxicodynamique

Plusieurs études récentes suggèrent que certains aspects de la toxicité des ETM, en particulier les effets chroniques et sublétaux, dépendent plus de la vitesse à laquelle un ETM entre dans l'organisme que des concentrations internes (Rainbow, 2002 ; van Straalen et al., 2005 ; Rainbow, 2006). A l'intérieur de l'organisme, un pool d'ETM dévolu au fonctionnement métabolique peut être distingué d'un pool en excès des besoins métaboliques pouvant évoluer sous différentes formes (Rainbow, 2002) : des formes libres susceptibles de se lier à des biomolécules clés du métabolisme (comme les enzymes), de perturber leur fonctionnement et donc la physiologie de l'organisme et des formes de détoxification dont les deux principales sont les MT et les granules. Les processus de détoxification ne sont pas instantanés : la liaison aux MT et leur induction est relativement rapide, de l'ordre de quelques heures, alors que la séquestration dans les granules demande plus de temps. Les aspects temporels ne doivent par conséquent pas être négligés lors de l'étude de la bioaccumulation, de la distribution interne et des effets des ETM dans les organismes.

Dans cette optique, les expositions chroniques des organismes et les modifications de leurs caractères biologiques revêtent un caractère important. A l'heure actuelle, très peu de recherches sont conduites dans ce sens et à notre connaissance, en milieu terrestre, une seule étude a suivi dans le temps l'influence de deux ETM (Cd et Cu) sur la survie, la croissance et la maturation sexuelle d'un invertébré du sol, le ver de terre *Lumbricus rubellus* (Spurgeon et al., 2004).

1.6. Définition des objectifs

L'état des lieux qui vient d'être établi montre que si le transfert des ETM est avéré pour un grand nombre d'invertébrés du sol, dont les escargots, il subsiste un manque important de données concernant leurs cinétiques et leurs dynamiques internes. Si, à l'amont de la bioaccumulation, les mécanismes physico-chimiques régissant la disponibilité environnementale des ETM dans les sols ont fait l'objet de nombreuses études, la

compréhension des processus physiologiques conditionnant la biodisponibilité environnementale et toxicologique nécessite autant d'attention. De nombreuses équipes de recherche ont centré leurs travaux sur des invertébrés terrestres répondant clairement aux conditions régnant dans la phase liquide du sol tels que les vers de terre. Si ces études ont permis le développement de concepts et d'outils pour l'évaluation des risques environnementaux liés à la contamination des sols par les ETM, leur simple extrapolation à d'autres groupes taxonomiques, comme l'escargot qui explore le sol et la surface du sol (y compris la végétation), n'est pas possible et doit faire l'objet d'investigations. Comme pour la toxicité, dont l'évaluation tend à utiliser, dans un cadre standardisé, un ensemble d'espèces modèles, l'étude des transferts et l'évaluation de la biodisponibilité doivent elles aussi mettre en œuvre une batterie d'organismes. L'utilisation d'un mollusque gastéropode, l'escargot, dans le présent travail de recherche témoigne de cette volonté. En continuité avec les méthodes existantes (ISO, 2006), des escargots juvéniles ont été choisis comme modèle biologique.

Un autre facteur souvent négligé dans la recherche écotoxicologique actuelle est le temps. La plupart des tests de toxicité actuels reposent sur des durées d'exposition courtes : de 24 à 96 heures pour les tests de toxicité aiguë, généralement 28 jours pour les tests de toxicité subchronique. Si ces tests répondent aux exigences d'une utilisation en routine et s'ils apportent des informations nécessaires à la gestion des risques environnementaux, leur courte durée présente plusieurs inconvénients :

- ✓ l'observation d'effets toxiques nécessite l'exposition à des concentrations souvent élevées,
- ✓ l'équilibre entre l'organisme (concentrations interne) et le milieu (concentrations externes) n'est pas forcément atteint,
- ✓ la dynamique physiologique de l'accumulation est occultée,
- ✓ les résultats ne sont très souvent pas représentatifs des situations observables en milieu "naturel".

La réalisation d'expositions chroniques à des concentrations réalistes au cours desquelles les concentrations internes et les réponses physiologiques sont mesurées au cours du temps et non après une seule durée d'exposition, choisie parfois arbitrairement, doit permettre de pallier, au moins en partie, à ces défauts.

Cette thèse s'inscrit dans cette problématique et a pour objectif général d'améliorer l'évaluation de la bioaccumulation et des effets des ETM et de faire progresser les procédures

d'évaluation de leur biodisponibilité par l'étude des cinétiques de transfert du Cd, du Pb et du Zn du sol vers l'escargot *Helix aspersa*.

Plus spécifiquement, quatre objectifs sont visés :

1. Étudier les cinétiques d'accumulation et d'élimination pour :
 - ✓ connaître les délais nécessaires à l'acquisition d'un état d'équilibre,
 - ✓ savoir si l'accumulation est réversible et si oui dans quelle proportion.

2. Adapter, développer et appliquer des modèles toxicocinétiques sur ces données pour :
 - ✓ estimer les flux d'ETM dans l'organisme,
 - ✓ développer une méthode d'évaluation du potentiel de bioaccumulation des ETM (basée sur les flux et les concentrations à l'équilibre) et de leur biodisponibilité environnementale pour l'escargot.

3. Approfondir les connaissances sur les dynamiques internes des ETM pour :
 - ✓ interpréter les cinétiques observées sur des bases physiologiques,
 - ✓ comprendre l'induction et les cinétiques des effets toxiques liés à l'exposition à un sol contaminé.

4. Évaluer l'influence de facteurs environnementaux (concentration d'exposition, pH, saison) sur le transfert du Cd pour apprécier la sensibilité des escargots à ces variations *in situ* et donc préciser les modalités de leur utilisation en bioindication active.

Chapitre II

Modélisation de l'exposition chronique à un sol contaminé : une approche toxicocinétique avec l'escargot *Helix aspersa*.

Cette expérimentation a fait l'objet d'un article publié en 2006 dans la revue *Environment International* (**32**, 866-875). Les auteurs sont Frédéric Gimbert, Annette de Vaufleury, Francis Douay, Renaud Scheifler, Michaël Coeurdassier et Pierre-Marie Badot.

Résumé :

Pour étendre les possibilités d'utiliser les organismes de la faune du sol afin d'évaluer les potentiels de bioaccumulation des polluants, les cinétiques de transfert du Cd du sol vers l'escargot *Helix aspersa* ont été examinés au laboratoire au cours d'une exposition de long terme (six mois). Durant la phase d'exposition (trois mois), des escargots juvéniles ont été exposés à un sol artificiel graduellement contaminé Cd (ISO 0, 20 et 100 mg Cd.kg⁻¹) et à un sol naturel (ME4) industriellement contaminé à 20 mg Cd.g⁻¹. Pour chaque type de sol, les concentrations internes en Cd atteignent un état d'équilibre dans les viscères, principal organe de stockage du Cd, après deux semaines d'exposition, quelque soit la concentration en Cd dans le sol. Les concentrations à l'équilibre dans les viscères étaient de 0,7 (±0,1), 11,3 (±2,4), 73,3 (±4,8) et 6,3 (±1,3) mg Cd kg⁻¹ masse sèche pour ISO 0, ISO 20, ISO 100 et ME4, respectivement. Au cours de la phase de dépuración (trois mois), entre 0 et 52% du Cd accumulé dans les viscères ont été éliminés par excrétion ou par redistribution dans le pied. Cependant, les processus d'excrétion n'ont pas permis de recouvrer l'état initial. Les données ont été modélisées en intégrant un coefficient de croissance spécifique dans des modèles toxicocinétiques à un compartiment. Cette procédure a permis l'estimation de taux d'absorption pouvant être utilisés comme indicateurs de la biodisponibilité des métaux. Ce paramètre ayant été estimé plus faible chez les escargots exposés au sol ME4, nous avons conclu que la plus faible biodisponibilité du Cd dans ce sol naturel était à l'origine des plus faibles transferts observés, en comparaison au sol ISO 20 présentant pourtant des concentrations totales en Cd identiques. La validation interne a montré que les modèles toxicocinétiques pourraient être appliqués à des fins prédictives, prometteuses pour le développement d'une directive bioaccumulation en milieu terrestre.



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Environment International 32 (2006) 866–875

ENVIRONMENT
INTERNATIONALwww.elsevier.com/locate/envint

Modelling chronic exposure to contaminated soil: A toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*

Frédéric Gimbert^a, Annette de Vaufleury^{a,*}, Francis Douay^b, Renaud Scheifler^a,
Michaël Coeurdassier^a, Pierre-Marie Badot^a

^a University of Franche-Comté, Department of Environmental Biology, EA 3184 MR UsC INRA, Place Leclerc, 25030 Besançon Cedex, France

^b Laboratory Soils and Environment, ISA, 41, rue du Port, 59046 Lille Cedex, France

Received 23 December 2005; accepted 16 May 2006

Available online 7 July 2006

Abstract

To enlarge the possibilities of using organisms of the soil fauna to assess the bioaccumulative potential of chemicals, the kinetic of soil cadmium (Cd) transfer to the terrestrial gastropod *Helix aspersa* was investigated under laboratory conditions during a long-term experiment (6 months). During the exposure phase (3 months), juvenile snails were subjected to three different concentrations of Cd spiked in artificial ISO soil (ISO 0, 20 and 100 mg Cd kg⁻¹) and to a field soil (ME4) industrially contaminated by 20 mg Cd kg⁻¹. For both soils, internal steady-state Cd concentrations were reached in the viscera of the snails, the main storage organ for Cd, after 2 weeks of exposure whatever the Cd concentration in soil. The equilibrium concentrations in the viscera were 0.7 (±0.1), 11.3 (±2.4), 73.3 (±4.8) and 6.3 (±1.3) mg Cd kg⁻¹ dry mass for ISO 0, ISO 20, ISO 100 and ME4, respectively. During the depuration phase (3 months), from 0 to 52% of the accumulated Cd in the viscera were removed by excretion or relocation in the foot. However, the snails were not able to depurate down to initial concentrations. Data were modelled by integrating a specific growth rate constant into one-compartment toxicokinetic models. This allowed the calculation of Cd uptake rates that can be used as indicators of metal bioavailability. Since this parameter was found to be lower for snails exposed to the field soil ME4, we concluded that lower Cd bioavailability in this field soil was responsible of the lower transfer to the snails compared to the ISO 20 soil, even though they were polluted to similar extents. Internal validation showed that the toxicokinetic models could be applied for predictive purposes, promising for the development of a bioaccumulation directive for terrestrial environment.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: Accumulation; Depuration; Bioavailability; Modelling; Long-term exposure

II.1. Introduction

The assessment of metal bioavailability in soils and its effects on organisms is a crucial issue in ecotoxicology and environmental management. Because the relationships between soil concentrations and their subsequent effects differ according to exposure duration (among other factors), it is suggested that the bioavailability and the fluxes entering an organism are more relevant than the internal concentrations to explain metal toxicity (Rainbow, 2002). In addition, van Straalen et al. (2005) recently showed likewise that the rate of uptake, not the internal concentration itself, is a better indicator to quantify bioavailability.

One way to estimate the uptake rate is to measure concentrations or body burdens as a function of time in an organism exposed to a contaminated soil. Compartment models were developed to study accumulation and elimination kinetics and can be applied to evaluate pollutant fluxes within the tissues of organisms (Moriarty and Walker, 1987). A number of studies have used toxicokinetic models to describe the accumulation of metals showing that uptake rates in invertebrates are generally dependent on the metal and its concentration, the soil characteristics and the biological target (Janssen *et al.*, 1991; Peijnenburg *et al.*, 1999; Spurgeon and Hopkin, 1999). Kinetic experiments also allow the steady-state internal concentrations to be determined since this information is required for the evaluation of the bioaccumulative properties of the chemicals (OECD, 1996) and the development of new risk assessment methods for terrestrial environments, as suggested by Peijnenburg *et al.* (1997) and McMillen *et al.* (2003).

Such experiments are typically carried out with saprophagous and detritivorous invertebrates like earthworms, enchytraeids or collembolans and few kinetic data have been reported for other invertebrates of the soil fauna. Only one kinetic study has been performed on a terrestrial gastropod mollusc, the Roman snail *Helix pomatia* (Dallinger and Wieser, 1984). However, the interest of snails, their bioaccumulation and bioindication capacities are well described (Laskowski and Hopkin, 1996; Dallinger *et al.*, 1997). Several studies have demonstrated the existence of dose-effect relations in the terrestrial snail *Helix aspersa* for various contaminants (Gomot-de Vaufleury, 2000; Coeurdassier *et al.*, 2000; de Vaufleury *et al.*, 2006), leading to the standardisation of an ecotoxicological test (ISO 15952, 2006). Based on this standardised design, most of the data available on pollutant accumulation by snails concern a 4-week exposure which represents a compromise between acute and life cycle tests that need to be completed by long-term kinetic experiments.

Our objective was to assess the accumulation and elimination kinetics of cadmium (Cd) in *Helix aspersa* snails exposed to naturally and artificially contaminated soils in a long-term laboratory experiment. The influence of exposure concentration was also investigated. Toxicokinetic parameters (uptake and elimination rates) and steady-state concentration in the snail were estimated using one-compartment models with concentrations as well as body burdens to assess the Cd distribution within the organism and the pollutant loads potentially transferable in the food web.

II.2. Materials and methods

II.2.1. Animals

Juvenile brown garden snails (*Helix aspersa aspersa* Müller) were reared under optimal conditions (extensively described in Gomot-de Vaufleury, 2000) ensuring a complete life cycle in 16 weeks whatever the season. The individuals used for the tests were aged four weeks and weighed 0.82 ± 0.13 g as defined in standard ISO 15952 (2006).

II.2.2. Substrates

The accumulation and elimination kinetics of Cd were assessed in time series studies of 84 days in two substrates: an artificial ISO soil (OECD, 1984) with 0 (ISO 0), 20 (ISO 20) and 100 (ISO 100) mg Cd.kg⁻¹ and a field soil (ME4) industrially contaminated at 20 mg Cd.kg⁻¹. The field soil (silty clay, Alfisol) (Baize et al., 1998) was collected from a site located around a primary smelting works situated in the North of France. Previous studies indicated that soils in the vicinity of the factory contained elevated levels of Cd, lead (Pb) and zinc (Zn) (Sterckeman et al., 2000). The soil was collected from the top 20 cm layer after removal of vegetation (grass) and transferred to the laboratory. Fresh soil aggregates were manually broken up. Then, the soil was air-dried and sieved through a 4 mm mesh. Soil parameters are presented in Table II.1. The artificial ISO soil consisted of a mixture of 70% fine sand, 20% kaolin clay and 10% coarse ground *Sphagnum* peat. The pH was adjusted to 6.0 ± 0.5 with powdered calcium carbonate (CaCO₃, 99.5%, Prolabo). The ISO soil was spiked with Cd as chloride salt (CdCl₂, 99.99%, Sigma Aldrich). Deionised water was added to reach 50±5% of the water holding capacity. The soils were then left to stabilise for one month prior to the experiment.

II.2.3. Exposure modalities

H. aspersa snails were exposed for 84 days to uncontaminated or to Cd contaminated soils as single source of contamination by both dermal and digestive routes. Then, they were transferred to a clean substrate (ISO 0) for the next 84 days. One hundred *H. aspersa* snails were used per treatment, equally divided into ten polystyrene containers (24 x 21 x 8 cm) (ref. E1DBBAC001, Charles River IFFA-CREDO, 69 L'Arbresle). The bottom of the containers was covered with a 1.5 cm layer (180 g dry mass, DM) of dampened substrate. The snails were fed *ad libitum* with Helixal® snail food (Chays Co. Ltd., Valdahon, 25800, France). The diet, which was not contaminated (naturally containing 0.34 mg Cd.kg⁻¹ food), was put in a

Petri dish left on the bottom of the container. The day/night cycle photoperiod was 18/6h and the temperature $20 \pm 2^\circ\text{C}$. The relative humidity was 80 to 95%. Substrate relative humidity was maintained at its initial level by spraying demineralised water. The containers were cleaned and the food was renewed three times a week. Each week, snail faeces were removed and the substrate was mixed.

Table II.1. Physico-chemical characteristics of ISO soil and top layer (0-20 cm) of ME4 soil.

	ME4	ISO 0	ISO 20	ISO 100
Clay ^(a) , %	23.8		13.6	
Silt ^(a) , %	65.4		12.6	
Sand ^(a) , %	10.8		73.8	
Water holding capacity, mL.kg ⁻¹	496.6 ± 4.5		619.1 ± 4.5	
pH _{water} ^(b)	7.80 ± 0.01	5.91 ± 0.02	5.94 ± 0.01	5.89 ± 0.02
pH _{KCl} ^(b)	7.27 ± 0.03	5.48 ± 0.04	5.46 ± 0.03	5.41 ± 0.02
LOI, %	9.06 ± 0.49		11.95 ± 0.80	
Total CaCO ₃ ^(c) , g.kg ⁻¹	96.0		8.7	
Total Ca ^(d) , g. kg ⁻¹	45.9		5.42	
Total Mg ^(d) , g. kg ⁻¹	5.7		1.0	
CEC ^(e) , cmol.kg ⁻¹	16.8		9.5	
Exchangeable Ca ^(f) , cmol.kg ⁻¹	37.6		21.5	
Exchangeable Mg ^(f) , cmol.kg ⁻¹	0.6		1.3	
CaCl ₂ extractable Cd, mg.kg ⁻¹	0.15 ± 0.00	0.0002 ± 0.0000	0.28 ± 0.02	2.39 ± 0.08
Total Cd, mg.kg ⁻¹	20.41 ± 0.16	0.032 ± 0.004	22.14 ± 0.90	105.47 ± 3.14

^(a) NF X 31-107 (AFNOR, 2003)

^(b) NF ISO 10390 (AFNOR, 2005)

^(c) NF ISO 10693 (AFNOR, 1995)

^(d) NF EN ISO 11885 (AFNOR, 1998)

^(e) NF X 31-130 (AFNOR, 1999)

^(f) NF X 31-108 (AFNOR, 2002)

II.2.4. Sampling and analytical procedures

After 0, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 and 84 days of exposure and 2, 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 and 84 days of depuration, five snails from each treatment were randomly sampled in five different containers. The initial density of 72 snails per m² avoided crowding effects during the experiment (Dan and Bailey, 1982; Lucarz and Gomot, 1985). Sampled snails were placed in clean containers for a 48h period of fasting (the faeces were removed after 24h) and then weighed and sacrificed by freezing before analysis. After thawing, the whole soft body was removed from the shell. The foot and the viscera were separated and oven-dried at 60°C

to constant mass. Then, the tissues were analysed by atomic absorption spectrometry, as previously described by Gomot and Pihan (2002).

Soil samples were collected for analysis at the end of the one-month stabilisation period. Soil %LOI (Loss On Ignition) was measured to estimate the organic matter content by heating the dried soils for 12 h at 500°C. Soil extracts were obtained following the extracting conditions described in the original procedure (Houba et al., 1996): after shaking 100 ml of 0.01 M CaCl₂ (99.5%, Prolabo) solution and 10 g DM of soil in an end-over-end shaker for 2 h at 30 rpm at room temperature, the extracts were separated from the solid residue by centrifugation at 3000×g for 10 min. Then, the extracts were acidified with 1 mL 75% HNO₃ (99.99%, Carlo Erba) to prevent adsorption to the polyethylene of the storage vessel and to prevent growth of bacteria. The acidified supernatant was collected in polyethylene bottles and stored at 4°C until metal analysis. Total Cd concentrations were assessed after digestion of 0.5 to 1 g DM of soil in 4 mL 50% HNO₃ (99.99%, Carlo Erba) at 60°C for 48h. Fifteen mL of deionised water were then added before analysis by atomic absorption spectrometry with an air-acetylene flame (Varian 220 FS) or with a graphite oven (Varian 220 Z with Zeeman background correction).

The reliability of the analysis was assessed with standard reference material (TORT-2, lobster hepatopancreas from NRCC-CNRL, Canada, and calcareous loam soil n°141R from BCR, Belgium) and was within 5% of certified values.

II.2.5. Accumulation and elimination modelling and statistical analysis

To describe the experimental phases, the phenomena and the mechanisms, the following terms will be used: during the **exposure phase**, **accumulation** can occur and is the result of two mechanisms, **uptake and excretion**. During the **depuration phase**, **elimination** can occur and is the result of **excretion**.

Previous studies on the accumulation of metals by soil arthropods (Janssen et al., 1991) and earthworms (Posthuma and Notenboom, 1996; Marinussen et al., 1997; Peijnenburg et al., 1999; Spurgeon and Hopkin, 1999) described the uptake kinetics of metals with a one-compartment model, following the generalized formula:

$$\frac{dC_{sn}}{dt} = k_1 C_s - (k_2 + k_g) C_{sn} \quad (1)$$

where t is the time (days), C_{sn} the metal concentration in the snails (mg.kg DM_{sn}⁻¹), C_s the total metal concentration in the soil (mg.kg_s⁻¹), k₁ the uptake rate constant (mg_s.mg DM_{sn}⁻¹

$^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$) and k_2 the excretion rate constant (day^{-1}). Since snails grow during the experiment, a specific growth rate constant, k_g (day^{-1}), obtained by fitting the Gompertz model on growth data (Gimbert et al., submitted), was included in the model.

The model was fitted to the data in its integrated form:

$$C_{sn}(t) = C_{sn}(0) + C_s \times \frac{k_1}{k_2 + k_g} \left(1 - e^{-(k_2 + k_g)t}\right) \quad (2)$$

where $C_{sn}(0)$ was the concentration measured in snails at the beginning of the experiment and was assumed to be a pool of constant magnitude.

We focussed on two different aspects of the accumulation curve: the uptake rate constant (k_1) for the initial exposure phase and the steady-state concentration (C_{ss}) after prolonged exposure estimated according to:

$$C_{sn}(ss) = C_{sn}(0) + \frac{k_1 C_s}{k_2 + k_g} \quad (3)$$

Bioaccumulation factors (BAF) were calculated at steady-state with the following equation:

$$BAF = \frac{C_{sn}(ss) - C_{sn}(0)}{C_s} = \frac{k_1}{k_2 + k_g} \quad (4)$$

During the depuration period, metal concentration varied with time according to the equation:

$$\frac{dC_{sn}}{dt} = -k_2 (C_{sn} - C_{mr}) \quad (5)$$

where C_{mr} is the residual metal concentration in snails ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{DM}_{sn}$) at the end of the depuration period.

Integrating Eq.(5) with the initial conditions of the depuration phase ($t = t_c$ and $C_{sn} = C_{mu}$), it becomes:

$$C_{sn}(t) = C_{mr} + (C_{mu} - C_{mr}) \times e^{(-k_2 \times (t - t_c))} \quad (6)$$

where C_{mu} is the metal concentration at the end of the exposure period ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{DM}_{sn}$), t_c is the time at which animals were transferred to the clean soil and t is the time since the beginning of the experiment. When a steady-state is reached, $C_{mu} = C_{sn}(ss)$.

As t tends to ∞ , C_{sn} tends to C_{mr} and a biological elimination factor (BEF) may be defined with the following equation:

$$BEF = \frac{C_{mu} - C_{mr}}{C_{mu}} = 1 - \frac{C_{mr}}{C_{mu}} \quad (7)$$

The BEF can take values ranging from 0 (no elimination) to 1 (total metal elimination).

For statistical analysis of pollutant kinetics, the use of body burdens is recommended rather than that of tissue concentrations (Moriarty, 1983), since the latter can be affected by rapid changes of the mass of the organism (Spacie and Hamelink, 1985). Moreover, even if concentrations provide information on pollutant fluxes and toxic thresholds, they are not relevant in the assessment of contaminant loads transferable into the food web. Kinetic trends and parameters were therefore also determined on the basis of body burdens. In this case, the accumulation and elimination models were as follows:

$$Q_{sn}(t) = Q_{sn}(0) + \frac{k_1}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad (8)$$

$$Q_{sn}(t) = Q_{mr} + (Q_{mu} - Q_{mr}) \times e^{(-k_2 \times (t - t_c))} \quad (9)$$

where Q_{sn} is the total amount of metal in the snail (μg), t the time (days), $Q_{sn}(0)$ the amount of metal at $t = 0$ (μg), Q_{mr} the residual metal body burden at the end of the depuration period (μg), Q_{mu} the metal body burden at the end of the exposure period (μg), k_1 the uptake rate ($\mu\text{g}\cdot\text{day}^{-1}$), k_2 the excretion rate (day^{-1}) and t_c the time at which snails were transferred to the clean soil (days).

Calculation of BEF with body burdens was conducted in the same way as concentrations (Eq. 7), replacing C by Q .

The accumulation and elimination parameters were estimated by fitting the models with a mixed-effects procedure (nlme, Lindstrom and Bates, 1990) allowing for nested random effects. The within-group errors are allowed to be correlated and/or have unequal variances. Significant differences in modelled parameters between treatments were checked by the Tukey post-hoc multiple comparison test (Pinheiro and Bates, 2000). To validate the

predictive nature of the models, they were internally cross-validated by means of the “leave several out” approach typically using one third of the experimental data set as the validation set (Stone, 1974). The predictive performance of the models can be expressed by Q^2 , the predicted or cross-validated variance. Comparisons of contamination levels in snails at specific time intervals were made using a linear mixed-effects (lme) model followed by the Tukey post-hoc multiple comparison test (Pinheiro and Bates, 2000). All statistics were performed with the free statistics software package R (version 2.0.1) (Ihaka and Gentleman, 1996).

II.3. Results

II.3.1. Accumulation and elimination kinetics in terms of concentrations

Measured soil Cd concentrations in spiked ISO soils indicated good agreement with nominal values (within 10%) (Table II.1) and were used for all calculations.

For snails exposed to the uncontaminated soil, no increase of Cd concentration was observed whatever the snail compartment (Fig. II.1(a) and Fig. II.2(a)). The internal concentrations never exceeded 1 mg Cd.kg^{-1} . In the viscera of snails exposed to the different contaminated soils, similar time dependent patterns of accumulation were found. Whatever the soil type and the soil Cd concentrations, equilibrium was reached within 14 days (Fig. II.1(b,c,d)). However, these steady states differed in the levels of the C_{ss} , ranging from 6.35 to $73.33 \text{ mg Cd.kg}^{-1}$ depending on the type of substrate and the level of soil contamination (Fig. II.1). The C_{ss} was six-fold lower in snails exposed to ISO 20 than in snails exposed to ISO 100. For a similar soil concentration of 20 mg Cd.kg^{-1} , the C_{ss} in snails exposed to ME4 soil was half that in snails exposed to ISO 20. BAFs were clearly concentration and soil dependent with values of 0.51, 0.73 and 0.27 for ISO 20, ISO 100 and ME4, respectively.

As in viscera, an increase of Cd concentrations in the foot was observed in snails exposed to the contaminated soils (Fig. II.2(b,c,d)). While the Cd accumulation was linear over the exposure period in snails exposed to ME4 (Fig. II.2(d)), a C_{ss} was reached, again after 14 days, only in ISO contaminated soils (Fig. II.2(b,c)). Interestingly, at equilibrium, foot BAFs were very similar for snails exposed to ISO20 and ISO100 with values of 0.18 and 0.14, respectively.

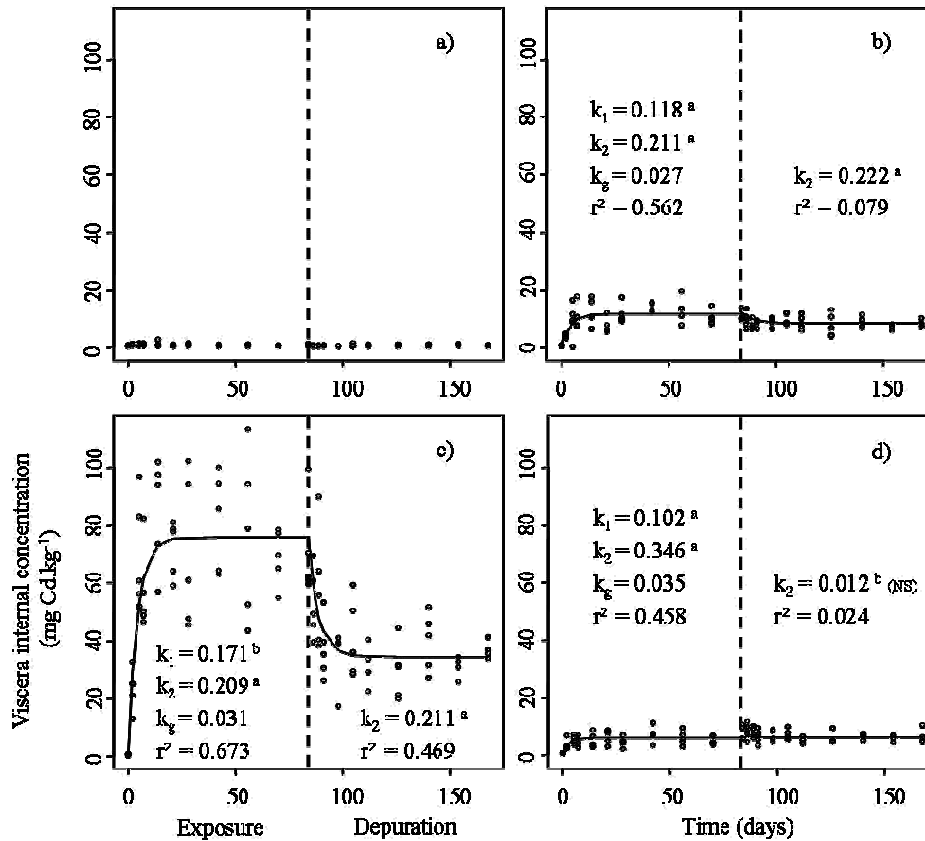


Figure II.1. Cd accumulation and elimination kinetics (concentrations) in the viscera of *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. a) ISO 0, b) ISO 20, c) ISO 100 and d) ME4. k_1 is given in $\text{mg}_s.\text{mg}_{sn}^{-1}.\text{d}^{-1}$, k_2 and k_g in d^{-1} . Each data point represents an individual snail. Parameter estimates that share similar letters are not significantly different ($p > 0.05$). NS = not significant ($p > 0.05$).

During depuration, a marked decrease in Cd concentrations was observed in the viscera of snails exposed to ISO contaminated soils (Fig. II.1(b) and (c)). This elimination was rapid and a second equilibrium in Cd concentrations was reached on ISO soils within 14 days. However, the excretion processes never made it possible to recover the initial state. Indeed, as illustrated by the BEF, only 30 and 55% of the accumulated Cd was released on ISO 20 and ISO 100, respectively, during the depuration period. On the contrary, individuals exposed to ME4 soil did not show any modification of their Cd concentration. No significant excretion occurred ($k_2 = 0.012 \text{ d}^{-1}$, $p = 0.9$) and internal concentrations kept values close to 6 mg Cd.kg^{-1} (Fig. II.1(d)).

In foot, on ISO 20 and ISO 100, a significant (lme, $p = 0.03$ and 0.02 , respectively) increase in Cd concentrations in the first days of the depuration phase was observed. This increase was of about 2 mg Cd.kg^{-1} and 10 mg Cd.kg^{-1} on ISO 20 and ISO 100, respectively, compared to the C_{ss} reached at the end of the exposure period (Fig. II.2(b) and (c)). This phenomenon was followed by a significant excretion which, over the 84 days of the depuration phase and by contrast to the viscera, did not lead to an equilibrium. At the end of

the experiment, residual Cd concentrations in the foot tissues were therefore still high in snails exposed to ISO contaminated soils. For ME4 exposed animals, no variation of internal concentrations occurred.

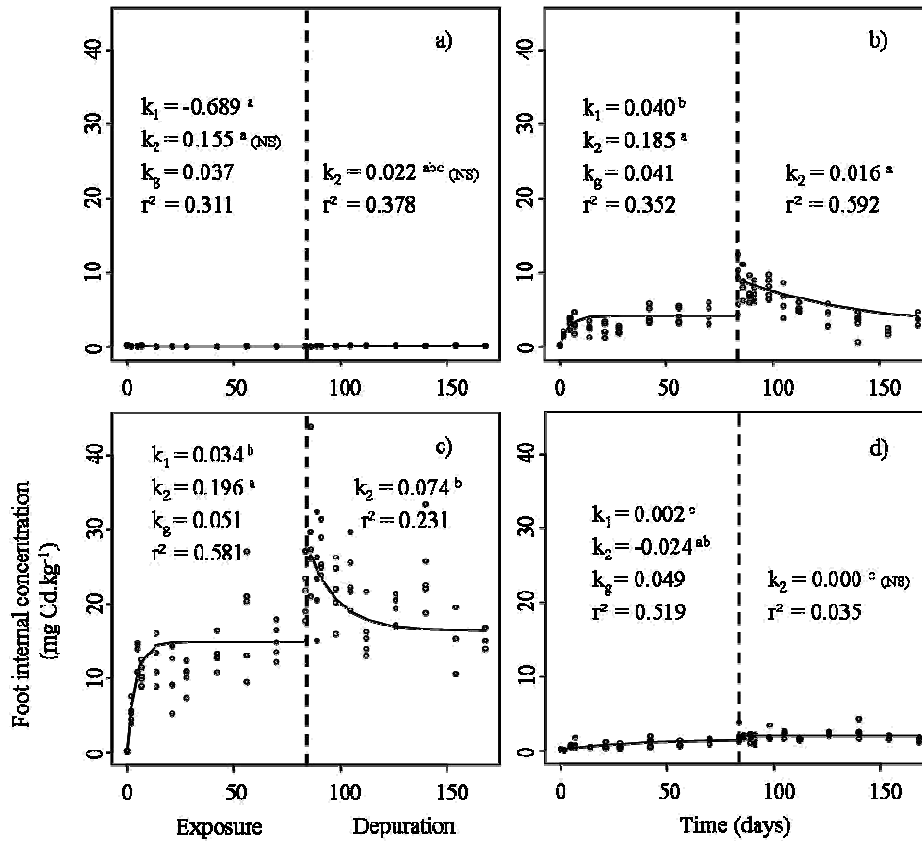


Figure II.2. Cd accumulation and elimination kinetics (concentrations) in the foot of *H. aspersa* snails exposed to different treatments. a) ISO 0, b) ISO 20, c) ISO 100 and d) ME4. k_1 is given in mg_s.mg_{sn}⁻¹.d⁻¹, k_2 and k_g in d⁻¹. Each data point represents an individual snail. Parameter estimates that share similar letters are not significantly different ($p > 0.05$). NS = not significant ($p > 0.05$). Negative values should be considered as zero values.

II.3.2. Accumulation and elimination kinetics in terms of body burdens

No accumulation of Cd was found in snails exposed to the uncontaminated soil (Fig. II.3(a)). In snails exposed to the three polluted soils, however, Cd body burdens increased almost linearly over the exposure period in viscera (Fig. II.3(b,c,d)) as well as in foot (Fig. II.4(b,c,d)). The models adequately described the variations of Cd body burdens over time since differences between measured and calculated values were about 10% on average (Tables II.2 and II.3).

Body burdens did not achieve a steady-state over the exposure duration unlike the situation observed with concentrations. However, in each case, calculation of uptake rates (k_1) gave significant and well-ordered values (ISO 100 > ISO 20 > ME4 > ISO 0), clearly indicating that uptake was related to both exposure concentration (ISO 100 > ISO 20 > ISO 0)

and substrate type (ISO 20 > ME4) (Table II.2). Cd availability was estimated by CaCl₂ extracts removing 2.3, 1.3 and 0.7% of the total Cd content of ISO 100, ISO 20 and ME4 soil samples, respectively (Table II.1).

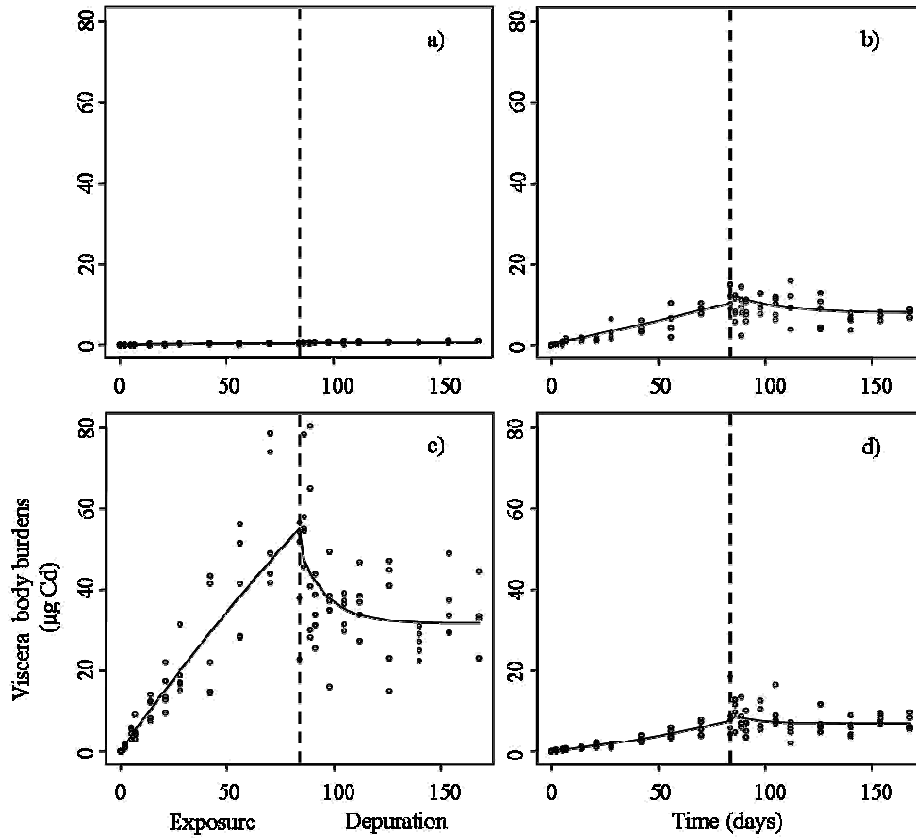


Figure II.3. Cd accumulation and elimination kinetics (body burdens) in the viscera of *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. a) ISO 0, b) ISO 20, c) ISO 100 and d) ME4. Each data point represents an individual snail.

Table II.2. Main characteristics of the accumulation of Cd (body burdens) by *H. aspersa* snails exposed to the different substrates.

		Measured		Modelled				Calculated	
		Q _{sn} (84d) µg Cd	k ₁ ± SE µg Cd.d ⁻¹	p-value	k ₂ ± SE d ⁻¹	p-value	r ²	Q ²	Q _{sn} (84d) µg Cd
Viscera	ISO 0	0.51	0.009±0.001 ^a	0.000	0.016±0.006 ^a	0.005	0.744	0.831	0.44
	ISO 20	12.27	0.151±0.009 ^b	0.000	0.003±0.004 ^b	0.507	0.846	0.856	11.24
	ISO 100	44.62	0.544±0.064 ^c	0.000	-0.002±0.004 ^b	0.627	0.782	0.767	49.78
	ME4	8.88	0.060±0.005 ^d	0.000	-0.009±0.003 ^b	0.009	0.716	0.700	7.55
Foot	ISO 0	0.03	0.000±0.002 ^a	0.973	-0.028±0.581 ^a	0.962	0.722	0.794	0.03
	ISO 20	3.32	0.008±0.002 ^b	0.002	-0.030±0.005 ^a	0.000	0.966	0.881	3.05
	ISO 100	7.45	0.083±0.004 ^c	0.000	-0.001±0.002 ^{ab}	0.639	0.931	0.901	7.27
	ME4	0.77	0.003±0.002 ^a	0.206	-0.023±0.016 ^a	0.159	0.899	0.912	0.78

Values that share similar letters are not significantly different (p>0.05).
Negative values of the excretion rates (k₂) should be considered as zero values.

Accumulated amounts of Cd were about four, six and eleven-fold lower in foot than in viscera at the end of the exposure phase for snails exposed to ISO 20, ISO 100 and ME4, respectively (Table II.2). The parameters modelled showed a clear soil and concentration dependent accumulation with increasing uptake rates on ISO contaminated soils (0.008 and 0.083 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{d}^{-1}$ on ISO 20 and ISO 100, respectively) significantly higher than in snails exposed to the ME4 field soil (0.003 $\mu\text{g Cd}\cdot\text{d}^{-1}$) (Table II.2).

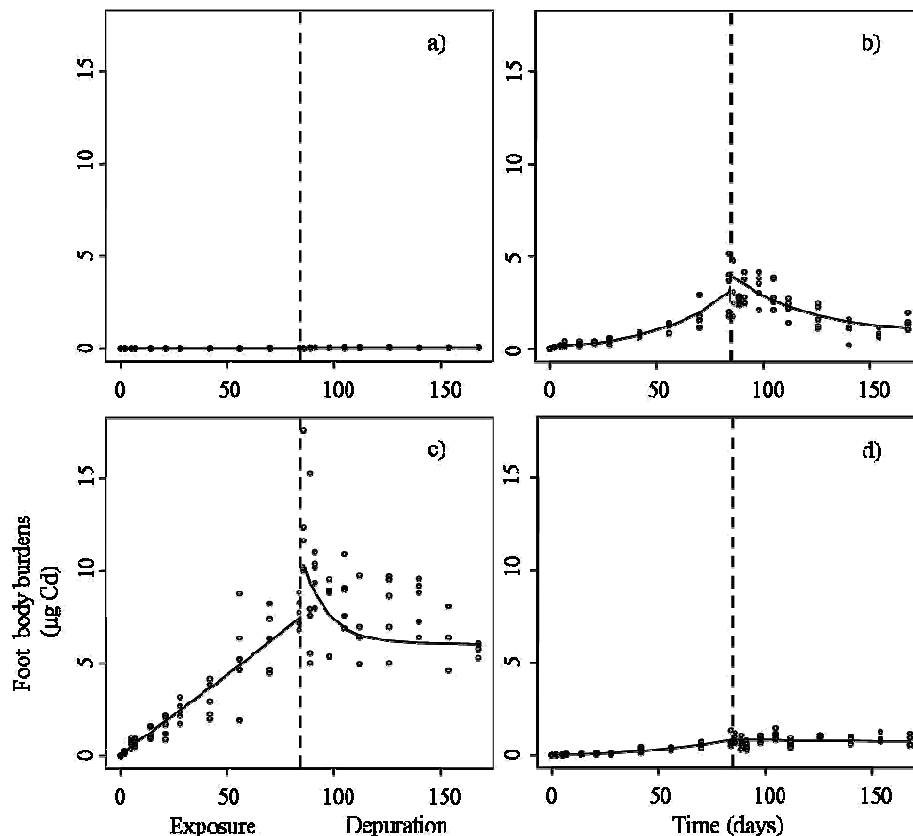


Figure II.4. Cd accumulation and elimination kinetics (body burdens) in the foot of *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. a) ISO 0, b) ISO 20, c) ISO 100 and d) ME4. Each data point represents an individual snail.

During the depuration period, excretion processes led rapidly to a steady-state in viscera body burdens for snails exposed to ISO 20 and ISO 100 (Fig. II.4(b,c)), which removed about 32% and 36%, respectively (Table II.3). Different behaviour was observed in snails previously exposed to the ME4 field soil with no significant removal of Cd ($k_2=0.087\pm 0.090$, $p=0.335$). Therefore, the BEF was not relevant and not calculated (Table II.3).

In foot, significant excretion rates were modelled for snails exposed to the ISO contaminated soils (Table II.3). However, this elimination was not clearly expressed by BEF due to the Cd increase in the first days of the depuration phase (Fig. II.4). In the foot of snails

exposed to ME4, as in the viscera, no significant excretion occurred ($k_2 = -0.008 \pm 0.019 \text{ d}^{-1}$, $p = 0.678$) and body burdens kept values close to $0.8 \mu\text{g Cd}$.

Table II.3. Main characteristics of the elimination of Cd (body burdens) by *H. aspersa* snails exposed to the different substrates.

		Measured		Modelled				Calculated		
		$Q_{sn}(168d)$ $\mu\text{g Cd}$	BEF(168d)	$k_2 \pm SE$ d^{-1}	p-value	$Q_{mr} \pm SE$ $\mu\text{g Cd}$	p-value	r^2	Q^2	BEF
Viscera	ISO 0	0.98	ND	0.001 ± 0.000^a	0.247	0.86 ± 0.05^a	0.000	0.364	0.382	ND
	ISO 20	8.15	0.34	0.045 ± 0.015^b	0.004	7.68 ± 0.57^b	0.000	0.515	0.701	0.32
	ISO 100	33.48	0.25	0.080 ± 0.001^c	0.000	31.68 ± 2.60^c	0.000	0.632	0.648	0.36
	ME4	7.37	ND	0.087 ± 0.090^{abc}	0.335	6.89 ± 0.45^b	0.000	0.064	0.228	ND
Foot	ISO 0	0.05	ND	0.000 ± 0.001^a	0.606	0.06 ± 0.05^a	0.277	0.372	0.364	ND
	ISO 20	0.82	0.75	0.029 ± 0.005^b	0.000	0.73 ± 0.22^b	0.001	0.441	0.470	0.76
	ISO 100	5.76	0.23	0.083 ± 0.000^c	0.000	5.96 ± 0.54^c	0.000	0.123	0.107	0.18
	ME4	0.79	ND	-0.008 ± 0.019^a	0.678	0.86 ± 0.07^b	0.000	0.022	0.098	ND

Values that share similar letters are not significantly different ($p > 0.05$).

ND = not determined.

Negative values of the excretion rates (k_2) should be considered as zero values.

II.4. Discussion

II.4.1. Cadmium accumulation and elimination patterns in *Helix aspersa*

The achievement within 14 days of a steady-state in internal concentrations of both viscera and foot testified to the existence of storage mechanisms and capacities. Such an equilibrium was also reported in the hepatopancreas of adult *H. pomatia* snails after 30 days of feeding with contaminated lettuce (Dallinger and Wieser, 1984). Cd in the hepatopancreas was bound to a Cd-metallothionein (Cd-MT), sequestering 85-95% of the Cd accumulated in this tissue (Dallinger et al., 1997). In the foot of the snails exposed to ISO contaminated soils, equilibrium was reached confirming the storage capacity of this organ as demonstrated by the Cd-MT induction in the muscle cells of the foot of *H. pomatia* (Chabicovsky et al., 2003). Equilibrium and storage capacities are closely associated through the induction of the Cd-MT isoform proportionally to the environmental Cd concentrations in soil or plant material on which snails thrive (Dallinger et al., 2004). This could explain the different levels of the C_{ss} found in snails exposed to the different treatments. Calculation of BAFs also clearly demonstrated the dose-dependent Cd transfer from soil to snail as previously noted by

Coeurdassier et al. (2002). They found, in the same conditions and in agreement with our results, BAFs of 0.90 in viscera and 0.22 in foot of *Helix aspersa* snails after four weeks of exposure to an ISO soil contaminated at 100 mg Cd.kg⁻¹.

For depuration, two different responses were highlighted: a significant excretion in snails exposed to ISO contaminated soils while no modification of the Cd contents was observed in ME4 exposed snails. In snails previously exposed to ISO contaminated soils, the excretion rates modelled with body burdens were higher during the depuration phase than during accumulation, highlighting the presence of easily removable forms of Cd in the tissues. Nevertheless, a large part of the accumulated Cd was stored in the long-term in the organisms, as reflected by the BEFs. In *H. pomatia*, Dallinger and Wieser (1984) did not observe any elimination processes in the hepatopancreas, concluding that Cd was efficiently stored by metallothioneins. Besides excretion, metal redistribution in different organs of the organism could be involved in Cd content changes. Such a process was clearly emphasized in the foot of exposed snails. In the absence of a Cd source in the experimental system, the increase of internal concentrations in foot inevitably involved the other compartment studied, *i.e.* the viscera, since the shell is not a sink for Cd (Laskowski and Hopkin, 1996). This observation leads to the hypothesis that *H. aspersa* has the capacity to relocate this toxic element in different parts of its body. Interestingly, during this phase, excretion rates estimated with body burdens were higher in viscera than in foot, probably by combining both the Cd redistribution from the viscera to the foot and the excretion mechanisms that could involve the gut (Dallinger and Wieser, 1984) and the mucus (Ireland, 1979). Two-compartment models, accounting for a loosely-bound and an inert storage of metals, should help to better describe the typical Cd accumulation in snails, as recently noticed in earthworms (Vijver et al., 2005).

II.4.2. Involvement of kinetic parameters in ecotoxicological studies

In previous kinetic studies of accumulation and elimination of metals in soil invertebrates such as arthropods (Janssen et al., 1991) or earthworms (Spurgeon and Hopkin, 1999), the authors showed that equilibrium concentrations were dependent on excretion rates. In our study, during exposure, modelled excretion rates (k_2) did not show any significant difference between treatments, while C_{ss} varied. Moreover, the snails that reached an equilibrium in their foot (ISO 100 and ISO 20) were those that displayed a positive excretion rate. From these results, we concluded that the C_{ss} was more strongly affected by the uptake rate than the rate of Cd excretion, even though reaching equilibrium was dependent on the excretion rate.

An important variable to assess the fluxes of pollutant entering an organism is bioavailability. However, the bioavailability of contaminants in the environment is a complicated issue which depends on many chemical, physical and biological aspects. Landrum et al. (1994) developed the concept of environmental bioavailability as the fraction of the environmentally available compounds which an organism accumulates when processing a given medium. In the same view, Peijnenburg et al. (1997) proposed that bioavailability should be dealt with as a dynamic process. This means that relevant exposure and uptake routes, chemical fluxes in organisms considered to be at a relevant taxonomic level and their time dependency should be explicitly taken into consideration. It has recently been proposed, on the basis of a case study with an isopod (*Porcellio scaber*), that the bioavailability of contaminants could be estimated from uptake rates into soil invertebrates since sublethal effects were dependent on the rate at which a toxic substance enters the organism, rather than on the concentration inside that organism unless a lethal threshold was reached (van Straalen et al., 2005). Similar observations were also made with *H. aspersa* snails exposed to ISO contaminated soils and for which sublethal effects have been found (Gimbert et al., in prep). Although C_{ss} were different, the growth and reproduction inhibition were similar in snails exposed to ISO 20 and ISO 100 but occurred sooner in ISO 100 snails which exhibited a higher uptake rate (0.151 and $0.544 \mu\text{g Cd}\cdot\text{d}^{-1}$ for ISO 20 and ISO 100, respectively). This uptake indicator of bioavailability implies that bioavailability incorporates not only the characteristics of the chemical but also the behaviour and the physiology of the organism. As an example, Spurgeon and Hopkin (1999) found, in *Eisenia fetida* exposed for 42 days to a $14 \text{ mg Cd}\cdot\text{kg}^{-1}$ -spiked OECD soil, an accumulation rate of $0.029 \mu\text{g Cd}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{worm}^{-1}$. This value is much lower than the one modelled in the whole body of snails exposed to ISO 20 ($0.159 \mu\text{g Cd}\cdot\text{d}^{-1}\cdot\text{snail}^{-1}$). Even if the multi-contamination of their OECD soil could explain in part the weakness of this value, this comparison enhanced the importance of the biological target and emphasised the bioindicative capacities of *H. aspersa* snails. Moreover, we performed chemical extractions as a first attempt to define Cd environmental availability (as defined by Peijnenburg et al., 1997) and to link the latter to Cd bioavailability as recommended by Alexander et al. (2003). The 0.01 M CaCl_2 extractions gave well ordered estimations of Cd availability in the contaminated test soils: $\text{ISO 100} > \text{ISO 20} > \text{ME4}$. Such a classification was also established on the basis of the modelled uptake rates (k_1) found to be significantly different between treatments. From these results, we concluded that the quantity k_1 could be used as an indicator of Cd bioavailability to *H. aspersa* and was in agreement with the chemical estimate of environmental availability provided by CaCl_2 extractions. The

influence of soil properties on metal bioavailability, transfer and toxicity for soil invertebrates has been well established (Crommentuijn et al., 1997; Weltje, 1998; Lock and Janssen, 2001). These works recognized the particular importance of pH, organic matter, ageing and metal interactions in the reduction of metal bioavailability in soils. In relation with the edaphic properties of ME4 (silty clay, alkaline pH, high cation exchange capacity, and old multi-contamination by Cd, Pb and Zn), Cd bioavailability and transfer were found to be lower in this field soil than in the ISO 20 spiked substrate, although they contained similar absolute levels of Cd.

II.4.3. Implications in ecological risk assessment (ERA)

Comprehensive and reliable risk assessment with a view to environmental and consumer health protection should consider all possible pathways of exposure and provide a quantitative estimate for humans and biota. As a first step, one-compartment toxico-kinetic models, used for the first time with snails in this study, provided a good assessment of exposure. Demonstrated by the internally cross-validated variance (Q^2) always close to r^2 , the models proposed revealed a predictive character highly useful in ecological risk assessment by providing long-term information on toxicant fluxes and storage within organisms. Moreover, this experimental method could improve and optimize exposure durations, the number of exposed animals and costs in risk assessment procedures.

As shown in the results section, patterns of accumulation and elimination are not the same when considering Cd tissue concentrations or body burdens. The increase of body mass over the exposure period prevented body burdens and concentration from being used interchangeably. In terms of concentrations, the equilibrium was reached during the exposure phase when the elimination component of the model (excretion *i.e.* k_2 and the growth dilution *i.e.* k_g) compensated the uptake rate (k_1). The situation was different for body burdens due to the increase of the body mass till the end of the growth, masking the excretion processes observed when only the concentration is taken into account. The use of concentrations or body burdens may thus depend on the objectives and perspectives of the study. Toxicity assessment in relation with the accumulation of a pollutant in tissues, or risk assessment, imply the use of concentrations, while body burdens would also inform on the pollutant loads potentially available for higher links in the food web.

Concerning this trophic transfer, amounts of Cd in the foot and viscera of the exposed snails have been shown to be non-negligible even after a prolonged period of depuration. Previous studies have shown the important role of *H. aspersa* snails in the transfer of Cd

along a food chain (Laskowski and Hopkin, 1996). For example, the exposure of natural snail predators (the carabid beetle *Chrysocarabus splendens*) to Cd contaminated snails (representing a total amount of 57 µg of Cd over four weeks) led to 31% of mortality of the individuals (Scheifler et al., 2002a). In the case of the field soil ME4, this amount of Cd is contained in only six snails even after depuration. In these conditions, soil remediation will not necessarily ensure fast ecosystem health recovery.

II.5. Conclusion

Differences in bioavailability are central to understand the variable occurrence of adverse effects caused by metals in the environment. Such variability is closely linked to the medium but above all to the biological target considered (van Straalen et al., 2005). Therefore, mastering the use of uptake rate and bioavailability in risk assessment needs measurements involving a suite of test species. As a first attempt, the proposed models provide elementary information concerning the soil pollutant bioavailability to snails. The resulting toxicokinetic data have allowed us to enlarge the scope of the standard initially proposed to assess growth inhibition (ISO 15952, 2006) following the recommendations of McMillen et al.(2003) to standardise the exposure conditions of organisms and the toxicokinetic models to obtain meaningful and comparable indicators of pollutant bioavailability.

Acknowledgements

We thank Pr. L. Gomot for helpful scientific discussions and critical comments on the manuscript and Christiane Lovy for technical assistance. The authors are also grateful to the three anonymous reviewers for valuable comments on the paper. This work was supported by grants from the Conseil Régional of Franche-Comté, the ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, contracts n°01 75037 and n° 0572 C0058) and the ANR (Agence Nationale de la Recherche, programme STARTT, contract n° ANR-05-ECC0-004).

References

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

- AFNOR. NF ISO 11885 standard. Qualité de l'eau. Dosage de 33 éléments par spectroscopie d'émission atomique avec plasma couplé par induction. AFNOR, Paris; 1998.
- AFNOR. NF X 31-130 standard. Qualité des sols. Méthodes chimiques. Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC) et des cations extractibles. AFNOR, Paris; 1999.
- AFNOR. NF X 31-108 standard. Qualité des sols. Détermination des cations Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , Na^+ extractibles par l'acétate d'ammonium. Méthode par agitation. AFNOR, Paris; 2002.
- AFNOR. NF X 31-107 standard. Qualité du sol. Détermination de la distribution granulométrique des particules du sol. Méthode à la pipette. AFNOR, Paris; 2003.
- AFNOR. NF ISO 10390 standard. Qualité du sol. Détermination du pH. AFNOR, Paris; 2005.
- Alexander, M.; Hughes, J.B.; Chaney, R.L.; Cunningham, S.D.; Harmsen, J.; van Gestel, H. Chemical Measures of Bioavailability. p. 345-362. In Lanno, R. P. (eds.) Contaminated soils: from soil-chemical interactions to ecosystem management. SETAC-publication, 345-362; 2003.
- Baize, D.; Girard, M.C. (coord.); Hodgson, J.M.; Eskenazi, N.R.; Baize, D. (trans.). A Sound Reference Base for Soils: The "Référentiel Pédologique". INRA Editions, Versailles, France; 1998.
- Chabicoovsky, M.; Niederstätter, H.; Thaler, R.; Hödl, E.; Parson, W.; Rossmannith, W.; Dallinger, R. Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicol. Appl. Pharm.* **190**:25-36; 2003.
- Coeurdassier, M.; de Vaufleury, A.; Badot, P.M. Dose-dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in the land snail *Helix aspersa aspersa*. *Environ. Toxicol. Chem.* **19**:2571-2578; 2000.
- Coeurdassier, M.; Gomot-de Vaufleury, A.; Lovy, C.; Badot, P.M. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotox. Environ. Safe.* **53**:425-431; 2002.
- Crommentuijn, T.; Doornekamp, A.; Van Gestel, C.A.M. Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Appl. Soil Ecol.* **5**, 261-271; 1997.
- Dallinger, R. and Wieser, W. Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd, and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **79C**:117-124; 1984.
- Dallinger, R.; Berger, B.; Hunziker, P.E.; Kägi, J.H.R. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature* **388**:237-238; 1997.

- Dallinger, R.; Chabicozsky, M.; Lagg, B.; Schipflinger, R.; Weirich, H.G.; Berger, B. Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**:902-910; 2004.
- Dan, N. and Bailey, S.E.R. Growth, mortality, and feeding rates of the snail *Helix aspersa* at different population densities in the laboratory and depression of activity of helicid snails by other individuals or their mucus. *J. Moll. Stud.*, **48**:257-265; 1982.
- de Vaufleury, A.; Coeurdassier, M.; Pandard, P.; Scheifler, R.; Lovy, C.; Crini, N.; Badot, P.M. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**:797-806; 2006.
- Gimbert, F.; de Vaufleury, A.; Douay, F.; Coeurdassier, M.; Scheifler, R.; Badot, P.M. Modelling chronic exposure to contaminated soil: a toxicodynamic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Submitted*.
- Gomot-de Vaufleury, A. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotox. Environ. Safe.* **46**:41-50; 2000.
- Gomot, A. and Pihan, F. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: metal bioavailability and bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**:820-827; 2002.
- Houba, V.J.G.; Lexmond, T.M.; Novozamsky, I.; van der Lee, J.J. State of the art and future developments in soil analysis for bioavailability assessment. *Sci.Total Environ.* **178**:21-28; 1996.
- Ihaka, R. and Gentleman, R. R: a language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* **5**:299-314; 1996.
- Ireland, M.P. Distribution of essential and toxic metals in the terrestrial gastropod *Arion ater*. *Environ. Pollut.* **20**:271-278; 1979.
- ISO 15952. Soil quality. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland; 2006.
- Janssen, M.P.M.; Bruins, A.; de Vries, T.H.; van Straalen, N.M. Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20**:305-312; 1991.
- Landrum, P.F.; Hayton, W.L.; Lee II, H.L.; McCarty, L.S.; Mackay, D.; McKim, J.M. Synopsis of discussion section on the kinetics behind environmental bioavailability. pp. 203–219. In: Bioavailability—Physical, Chemical, and Biological Interactions. J.R. Hamelink, P.F. Landrum, H.L. Bergman, and W.H. Benson (eds). Lewis Publishers, Boca Raton, FL; 1994.

- Lindstrom, M.J. and Bates, D.M. Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics* **46**:673-687; 1990.
- Laskowski, R. and Hopkin, S.P. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail *Helix aspersa*: implications for predators. *Environ. Pollut.* **91**:89-297; 1996.
- Lock, K. and Janssen, C.R. Effect of clay and organic matter type on the ecotoxicity of zinc and cadmium to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Chemosphere* **44**:1669-1672; 2001.
- Lucarz, A. and Gomot L. Influence de la densité de population sur la croissance diamétrale et pondérale de l'escargot *Helix aspersa* Müller dans différentes conditions d'élevage. *J. Moll. Stud.* **51**:105-115; 1985.
- Marinussen, M.P.J.C; van der Zee, S.E.A.T.M; de Haan, F.A.M. Cu accumulation in the earthworm *Dendrobaena veneta* in a heavy metal (Cu, Pb, Zn) contaminated site compared to Cu accumulation in laboratory experiments. *Environ. Pollut.* **96**:227-233; 1997.
- McMillen, S.J.; Van Gestel, C.A.M.; Lanno, R.P.; Linder, G.L.; Pauwels, S.J.; Stephenson, G.L. Biological measures of bioavailability. In: Lanno, R.P. (Ed.), Contaminated soils: from soil-chemical interactions to ecosystem management. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, pp. 293-343; 2003.
- Moriarty, F. Ecotoxicology. The study of pollutants in ecosystems, Academic Press, London; 1983.
- Moriarty, F. and Walker, C.H. Bioaccumulation in food chains – a rational approach. *Ecotox. Environ. Safe.* **13**:208-215; 1987.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 207: Earthworm acute toxicity tests. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* **1(2)**:1-9, 1984.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 305: Bioconcentration: Flow-through fish test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* **1(3)**:1-23, 1996.
- Peijnenburg, W.J.G.M.; Posthuma, L.; Eijsackers, H.J.P.; Allen, H.E. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotox. Environ. Safe.* **37**:163-172; 1997.
- Peijnenburg, W.J.G.M.; Posthuma, L.; Zweers, P.G.P.C.; Baerselman, R.; de Groot, A.C.; van Veen, R.P.M, Jager, T. Prediction of metal bioavailability in Dutch field soils for the Oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Ecotox. Environ. Safe.* **43**:170-186; 1999.

- Pinheiro, J.C. and Bates, D.M. Mixed-effects models in S and S-PLUS. Springer-Verlag, New-York, USA, 2000.
- Posthuma, L. and Notenboom, J. Toxic effects of heavy metals in three worm species exposed in artificially contaminated soil substrates and contaminated field soils. RIVM report n°719102048, Bilthoven, The Netherlands; 1996.
- Rainbow, P.S. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* **120**:497-507; 2002.
- Scheifler, R.; Gomot-de Vaufleury, A.; Toussaint, M.L.; Badot, P.M. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* **48**:571-579; 2002.
- Spacie, A. and Hamelink, J.L. Bioaccumulation. In: Rand, G.M.; Petrocelli, S.R.; (Eds), Fundamentals of aquatic toxicology, Hemisphere Corp.; Washington; pp. 495-525; 1985.
- Spurgeon, D.J. and Hopkin, S.P. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Appl. Soil Ecol.* **11**:227-243; 1999.
- Sterckeman, T.; Douay, F.; Proix, N.; Fourrier, H. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environ. Pollut.* **107**:377-389; 2000.
- Stone, M. Cross-validatory choice and assessment of statistical predictions. *J. Royal Stat. Soc.* **36**:111-147; 1974.
- van Straalen, N.M.; Donker, M.H.; Vijver, M.G.; van Gestel, C.A.M. Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environ. Pollut.* **136**:409-417; 2005.
- Vijver, M.G.; Vink, J.P.M.; Jager, T.; Wolterbeek, H.T.; van Straalen, N.M.; van Gestel, C.A.M. Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biol. Biochem.* **37**:1843-1851; 2005.
- Weltje, L. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soil: a critical evaluation of data. *Chemosphere* **36**:2643-2660; 1998.

Chapitre III

Réponses à long terme d'escargots exposés à des sols contaminés par du cadmium dans une expérience portant sur trois étapes du cycle biologique.

Cette expérimentation a fait l'objet d'un article publié dans la revue *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Les auteurs sont Frédéric Gimbert, Annette de Vaufleury, Francis Douay, Michaël Coeurdassier, Renaud Scheifler et Pierre-Marie Badot.

Résumé

Des escargots juvéniles ont été exposés durant leur phase de croissance à des sols naturels et artificiels puis transférés sur sol non contaminé pour évaluer les séquelles de l'exposition sur la reproduction des adultes. La modélisation de la croissance a permis de souligner une inhibition de croissance de 5 et 10% après 70 et 84 jours d'exposition aux sols artificiels contaminés à 100 et 20 mg Cd.kg⁻¹. La perturbation de la croissance était accompagnée par une diminution du nombre de pontes et un décalage de quatre semaines dans le cycle de ponte. Bien qu'il soit également contaminé à 20 mg Cd.kg⁻¹, l'exposition au sol naturel n'a pas conduit aux mêmes effets, suggérant une plus faible biodisponibilité du Cd confirmée par les analyses de bioaccumulation. Nous avons démontré qu'une exposition subchronique de 28 jours, comme recommandée par la norme, peut ne pas être suffisante pour mettre en évidence les effets toxiques sublétaux engendrés par l'exposition aux sols contaminés. Dans cette perspective, une procédure expérimentale portant sur le cycle de vie est proposée, permettant une évaluation approfondie de la toxicité à des stades successifs du cycle de vie.



Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment

Frédéric Gimbert^a, Annette de Vaufléury^{a,*}, Francis Douay^b, Michaël Coeurdassier^a,
Renaud Scheifler^a, Pierre-Marie Badot^a

^aDepartment of Environmental Biology, University of Franche-Comté, EA 3184 MR UoC-INRA, Place Lalesse, 25030 Besançon Cedex, France

^bLaboratory Soils and Environment, ISA, 41, rue de Paris, 59046 Lille Cedex, France

Received 7 November 2006; received in revised form 23 April 2007; accepted 23 May 2007

Abstract

Juvenile snails were exposed during their growth period to Cd-contaminated field and artificial soils and then transferred to uncontaminated soil to assess the sequels of previous exposure on adult reproduction. Growth modelling highlighted growth inhibitions of 5% and 10% after 70 and 84 days of exposure to 20 and 100 mg Cd kg⁻¹ in artificial soils, respectively. Growth disruption was accompanied by a decrease in the clutch number and a 4 week-delay in the egg-laying cycle. Although it was also contaminated at 20 mg Cd kg⁻¹, the contaminated field soil did not lead to detectable effects in snails, suggesting a lower Cd bioavailability confirmed by the bioaccumulation analysis. We demonstrated that the 23-day growth test, as advised by the ISO-guideline, may not be sufficient to assess sublethal toxic effects of realistically contaminated soils. For this purpose, a life cycle experimental set-up is proposed, allowing a thorough assessment of toxicity during successive life stages.

© 2007 Published by Elsevier Inc.

Keywords: *Helix aspersa*; Growth; Reproduction; Model; Chronic exposure

III.1. Introduction

The framework for approaching ecological risk assessment (ERA) is based on hazard identification, that is considering the intrinsic properties of the chemical, and risk characterisation, which means comparing exposure and effects while determining the probability of each effect occurring. Moving from hazard identification to risk evaluation implies including the potential for exposure (Tarazona and Vega, 2002). To this end, international standardised procedures using micro-organisms, plants and invertebrates have been developed for terrestrial ERA. Concerning soil invertebrates, these bioassays have been designed to estimate critical effect levels from concentration-response relationships for survival and/or reproduction of adult organisms (ISO, 1998 with *Eisenia fetida*; ISO, 2004 with *Enchytraeus albidus* and ISO, 1999 with *Folsomia candida*).

The impact of chemicals on juveniles may have important consequences for populations living in polluted environments (van Straalen et al., 1989; Kammenga et al.,

1996; Laskowski, 1997). For instance, in snails, Laskowsky and Hopkin (1996a) maintained that the intrinsic growth rate of *Helix aspersa* populations was more affected by delayed sexual maturity than by fecundity inhibition. However, to date there has been little focus within the chemical regulatory framework on the effects of pollutants on juvenile organisms. Spurgeon et al. (2004) proposed a specifically designed test system to assess the responses of juvenile *L. rubellus* exposed to copper (Cu) and cadmium (Cd) contaminated soils and recently, a standardized test was developed with juvenile snails *H. aspersa* specifying a semi-static method for the determination of soil quality by analysing the subchronic effects of contaminants on growth (ISO, 2006). This procedure, even though restricted to a single stage of the life-cycle, constitutes a basis for the long-term six-month experiment we carried out with the terrestrial snail *H. aspersa* exposed to Cd-contaminated soils. Cd fluxes in the snail were studied, highlighting concentration and substrate dependent patterns of accumulation and elimination (Gimbert et al., 2006).

Here the related effects on the snails' fitness are reported. Our objectives were to assess the physiological effects of chronic exposure of *H. aspersa* snails to soils contaminated by environmentally representative Cd concentrations. With this aim, we focused on key life history traits and (i) studied the effects of chronic exposure (12 weeks) to Cd-contaminated artificial or field soils on survival, growth and sexual maturation, (ii) evaluated the impact of this early exposure on the reproductive capacities of *H. aspersa* and (iii) developed a modelling approach to fit the kinetic assessment of growth.

III.2. Materials and Methods

III.2.1. Animals

Juvenile brown garden snails, *Helix aspersa aspersa* Müller, 1774 (also called *Cantareus aspersus aspersus*), aged 4 weeks and weighing 0.82 ± 0.13 g in agreement with the standardised test (ISO, 2006), were used in this experiment. Under optimal (laboratory) conditions, a complete life cycle is ensured in 16 weeks whatever the season (Gomot-de Vaufleury, 2000).

III.2.2. Substrates

Two types of substrate were used, as described in detail in Gimbert et al., 2006: an artificial substrate (OECD, 1984), frequently used in ecotoxicological tests, uncontaminated (ISO 0) or spiked at 20 and 100 mg Cd.kg⁻¹ (ISO 20 and ISO 100) by spraying on CdCl₂

(99.99%, Sigma Aldrich) solutions and characterised by a pH close to 6, a cation exchange capacity (CEC) of 9.5 cmol.kg^{-1} and an organic matter content (estimated on the basis of the loss on ignition, LOI) of 12%; and a field soil (ME4) contaminated at 20 mg Cd.kg^{-1} by industrial deposition. ME4 is a silty clay Alfisol (Baize et al., 1998) characterised by a pH of 7.8, a CEC of $16.8 \text{ cmol.kg}^{-1}$ and an organic matter content of 9%.

III.2.3. Exposure modalities

The snails were exposed to the different soils for 12 weeks *i.e.* their growing phase (exposure phase) at the end of which the now 16-week-old snails were transferred to the uncontaminated ISO substrate for a depuration phase lasting for the next 12 weeks. For each treatment, ten transparent polystyrene containers of 3200 cm^3 (24 x 21 x 8 cm) (ref. E1DBBAC001, Charles River IFFA-CREDO, 69 L'Arbresle) were used. Ten snails were put in each container, the bottom of which was covered with a 1.5 cm layer (180 g dry weight, DW) of substrate (ISO and ME4) dampened with demineralised water at $50 \pm 5\%$ of the field capacity. At the start of the experiment, the density was 72 snails per m^2 . According to Dan and Bailey (1982) and Lucarz and Gomot (1985), this density avoids crowding effects. The snails were fed *ad libitum* with Helixal® snail food (Chays Co. Ltd., Valdahon, 25800, France) renewed three times a week.

III.2.4. Monitoring design

During the exposure and depuration phases, five snails were sampled after 2, 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 and 84 days in five different containers to prevent pseudo-replication. Growth was assessed weekly by weighing the fresh mass of the whole organism and by measuring the shell diameter. The sampled snails were placed in clean containers for a 48h period of fasting (the faeces were removed after 24h) then weighed and frozen. After thawing, the snails were dissected into three parts (shell, foot and viscera) which were also individually weighed. The end of the diametrical growth and the curling over of the shell edge indicate that the adult size has been reached (Lucarz and Gomot, 1985). Monitoring the evolution of the mass of the genital tract allowed the assessment of the sexual maturation of the snails (Gomot-de Vaufleury and Kerhoas, 2000). Pots (4.3 cm in diameter and 7.0 cm high) filled with uncontaminated ISO substrate were placed in all the experimental devices to allow egg laying, once mating had started to occur (adult stage, 12 weeks of experiment). Then, clutches were sampled every day and the effects on reproduction were expressed by the number of clutches, their average mass and the number of eggs per clutch.

III.2.5. Chemical analysis

Total Cd concentrations in soils were assessed after digestion of 0.5 to 1 g DW of substrate in 4 mL 50% HNO₃ (99.99%, Carlo Erba) at 60°C during 48h. Fifteen mL of ultra pure water were then added before analysis by atomic absorption spectrometry with an air-acetylene flame (Varian 220 FS) or with a graphite oven (Varian 220 Z with Zeeman background correction). The measured concentrations were verified by comparison with standard reference material (calcareous loam soil n°141R from BCR, Belgium) and were within 10% of certified values.

III.2.6. Models and statistical analysis

Growth was examined using five different models chosen according to their relevance in ecotoxicological studies and their suitability for a broad range of organisms (microorganisms, plants, animals) (Gamito, 1998; López et al., 2004; Spurgeon et al., 2004; Topal et al., 2004; Yu et al., 2006):

- Restricted growth $W_t = W_{\max} - (W_{\max} - W_0)e^{-k_g t}$

- Logistic growth $W_t = \frac{W_{\max}}{1 + e^{-k_g(t-I)}}$

- Von Bertalanffy $W_t = W_{\max}(1 - e^{-k_g(t-t_0)})$

- Gompertz $W_t = W_{\max} \times e^{(-e^{(-k_g \times (t-I))})}$

- Exponential growth $W_t = W_{\max}(1 - e^{-k_g \times t})$

where W_t is the mass (g) at time t , W_{\max} the upper asymptotic mass (g) (maximal mass reached), W_0 the initial mass (g), k_g the growth constant (d^{-1}), I the time at the inflection point (d) and t_0 the time (d) at which mass would be zero.

The suitability and adequacy of the different growth models was compared using Akaike's information criterion (AIC) (Akaike, 1977). For the same data set, the lower the AIC, the better the model. Generally, it is assumed that a ten-point difference between two AICs is significant (Burnham and Anderson, 2004).

During the exposure phase, the growth parameters were estimated by fitting the models with a non-linear mixed-effects procedure (nlme, Lindstrom and Bates, 1990)

allowing for nested random effects. The within-group errors are allowed to be correlated and/or have unequal variances. The nlme integrated the four treatments as fixed factors and the containers as random effect. Significant differences in modelled parameters between treatments were checked by ANOVA followed by the Tukey post-hoc multiple comparison test (Pinheiro and Bates, 2000). During the depuration phase, growth recovery was assessed using linear mixed-effects (lme) models followed by ANOVA and the Tukey post-hoc multiple comparison test (Pinheiro and Bates, 2000). The same statistical procedure was used to compare the snail fresh mass, clutch mass and egg number at specific time intervals. Standard logistic regression, nlme and multiple comparison tests were used to look for differences in the cumulated number of adults and clutches. All statistical calculations were performed with the free statistics software package R (version 2.4.0) (R Development Core Team, 2005).

III.3. Results

III.3.1. Survival

Survival of control snails was 96% after 168 days. In Cd treatments, a low mortality was also found with 96% still alive in ISO 20 and ISO 100 and 98% in ME4.

III.3.2. Growth

III.3.2.1. Model choice

Snail growth was described by fitting the five models to time series individual fresh mass values for snails exposed to the different treatments for 84 days. Coefficients of correlation (r^2) were greater than 0.81 for all treatments and models indicating that they adequately described snail growth (Table III.1).

Based on AIC comparisons, the Gompertz model appeared statistically the most suitable to describe the snail growth. Moreover, the Gompertz equation adequately described snail growth by highlighting variations in growth velocities (inflection point I) as reflected by the weekly measured growth rates (Fig. III.1). Two clear variations were observed for all treatments after about 14 and 84 days. The first change corresponded to inflection point (I) and the second, from which the growth rate tended to zero, corresponded to the end of growth. The soil contamination effects on the juvenile snail growth will therefore be assessed on the basis of the Gompertz model fits and parameters.

III.3.2.2. Effects of soil contamination on juvenile growth

The Gompertz model was fitted to the individual growth of the snails exposed to the different treatments (Fig. III.1) and showed a good fit for the data with correlation coefficients (r^2) greater than 0.83 in all treatments (Table III.1).

Table III.1. Measured and modelled parameters of the growth of *H. aspersa* snails (whole body) exposed to different treatments. W_{\max} is the maximal mass reached (g), k_g the growth constant (d^{-1}), I the time at the inflection point (d) and t_0 the time (d) at which mass would be zero.

Model	Soils	Modelled parameters				r^2	AIC	Measured mean masses	
		W_{\max} (\pm SE)	k_g (\pm SE)	I (\pm SE)	t_0 (\pm SE)			$W(21)$ (\pm SE)	$W(84)$ (\pm SE)
		g	d^{-1}	d	d			g	g
Logistic growth	ISO 0	9.71 \pm 0.19	0.121 \pm 0.002	19.16 \pm 0.40	-	0.815	1934		
	ISO 20	9.35 \pm 0.17	0.116 \pm 0.003	19.33 \pm 0.49	-	0.814	1937		
	ISO 100	8.92 \pm 0.18	0.122 \pm 0.003	18.31 \pm 0.39	-	0.835	1750		
	ME4	10.22 \pm 0.19	0.108 \pm 0.003	21.33 \pm 0.69	-	0.886	1822		
Von Bertalanffy	ISO 0	18.45 \pm 1.43	0.012 \pm 0.001	-	-3.99 \pm 0.12	0.826	1904		
	ISO 20	16.33 \pm 1.14	0.013 \pm 0.001	-	-3.78 \pm 0.12	0.817	1880		
	ISO 100	12.04 \pm 0.39	0.022 \pm 0.002	-	-2.31 \pm 0.52	0.853	2370		
	ME4	21.82 \pm 1.95	0.010 \pm 0.001	-	-3.20 \pm 0.21	0.867	1965		
Gompertz	ISO 0	10.69 \pm 0.25 ^a	0.059 \pm 0.001 ^a	15.88 \pm 0.46 ^a	-	0.839	1838	4.92 \pm 1.29 ^a	11.27 \pm 2.28 ^a
	ISO 20	10.19 \pm 0.21 ^b	0.059 \pm 0.001 ^a	15.49 \pm 0.47 ^a	-	0.844	1848	4.77 \pm 1.23 ^a	10.41 \pm 2.32 ^a
	ISO 100	9.76 \pm 0.21 ^c	0.061 \pm 0.002 ^a	14.87 \pm 0.40 ^b	-	0.885	1661	4.99 \pm 1.12 ^a	10.06 \pm 1.97 ^b
	ME4	11.39 \pm 0.25 ^d	0.055 \pm 0.002 ^b	17.65 \pm 0.61 ^c	-	0.897	1630	5.11 \pm 1.15 ^a	11.31 \pm 2.18 ^a
Exponential growth	ISO 0	13.12 \pm 0.50	0.023 \pm 0.001	-	-	0.830	2338		
	ISO 20	12.58 \pm 0.46	0.023 \pm 0.001	-	-	0.822	2308		
	ISO 100	11.41 \pm 0.36	0.027 \pm 0.001	-	-	0.847	2172		
	ME4	15.01 \pm 0.71	0.020 \pm 0.002	-	-	0.886	2161		
Restricted growth	ISO 0	18.27 \pm 1.41	0.012 \pm 0.001	-	-	0.832	1904		
	ISO 20	16.23 \pm 1.13	0.014 \pm 0.001	-	-	0.839	1873		
	ISO 100	11.99 \pm 0.48	0.023 \pm 0.002	-	-	0.887	2369		
	ME4	21.64 \pm 1.76	0.010 \pm 0.001	-	-	0.872	1779		

Values that share similar letters are not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$). Measured mean masses (\pm SE) of snails are at the sample interval closest to the inflection point in controls (day 21) and at the end of the exposure period (day 84).

The maximal mass (W_{\max}) reached after 84 days of exposure appeared lower ($p < 0.001$) in snails exposed to ISO 20 and ISO 100 compared to ISO 0. Indeed, for both

concentrations tested on artificial soil, snail mass at the end of the exposure phase was on average 0.5 and 1g, respectively, lower than for controls, *i.e.* a difference of about 5 and 10% (Table III.1). No significant difference was observed in the growth constant (k_g) of individuals exposed to ISO contaminated soils compared to controls. The inflection point (I) was reached more rapidly in snails exposed to ISO 20 and ISO 100 soils thus shortening the period where growth is fastest compared to the control (Table III.1). Although it was as polluted as ISO 20, the ME4 soil did not lead to a growth inhibition but on the opposite this natural soil stimulated the snail growth as underlined by the significantly higher W_{max} and I and lower k_g values compared to those modelled in ISO 0.

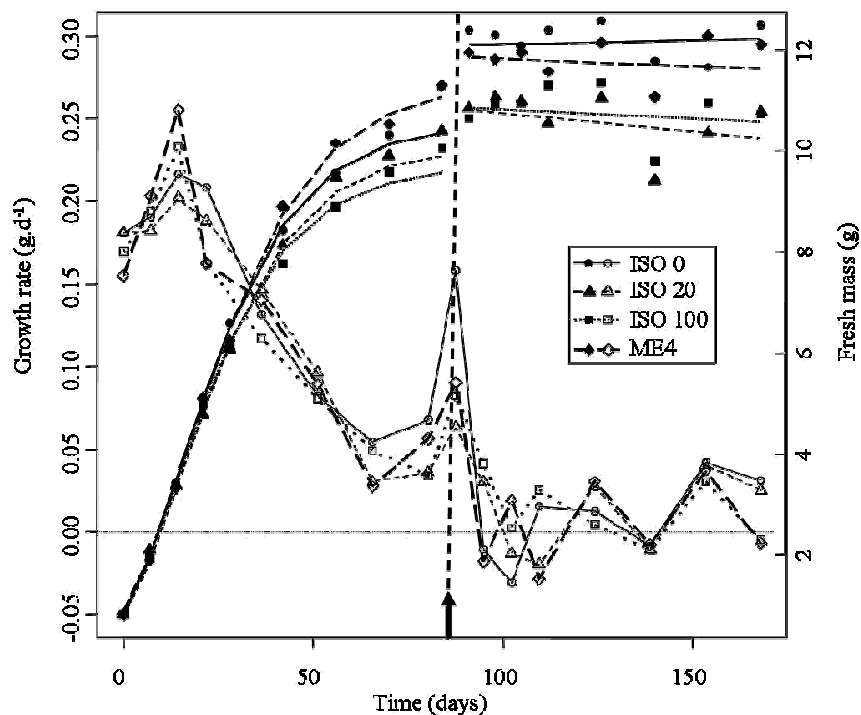


Figure III.1. Fresh mass and growth rate time course of *H. aspersa* snails (whole body) exposed to the different treatments. The arrow indicates the time at which snails were transferred to the uncontaminated substrate. Full black symbols represent the average fresh mass (g) ($n>3$) and refer to the right axis. The associated curves correspond to the Gompertz modelling. Empty symbols represent the average measured growth rate ($n>3$) ($\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$) and refer to the left axis.

Comparison of fresh masses throughout the experiment demonstrated that the minimal time necessary to see significant growth inhibition was 70 ($p=0.028$) and 84 days ($p=0.042$) for ISO soil Cd concentrations of respectively 100 and 20 $\text{mg Cd}\cdot\text{kg}^{-1}$.

To document which parts of the organism were affected by soil Cd exposure, the Gompertz model was fitted separately to the growth of the foot, viscera and shell (Table III.2). The foot fresh mass showed the same temporal pattern between the four treatments tested, with fast growth during the first 49 days followed by stabilisation after 70 days. The

viscera showed a slower growth and shell mass rose steadily till the end of the exposure (data not shown). These time lags are shown in Table III.2 by differences in the position of the inflection point ($I_{\text{shell}} \approx 3 \times I_{\text{viscera}} \approx 4 \times I_{\text{foot}}$) and in the estimates of growth constants ($k_g_{\text{shell}} \approx 0.3 \times k_g_{\text{viscera}} \approx 0.25 \times k_g_{\text{foot}}$).

The maximal fresh masses (W_{max}) of foot and viscera did not differ ($p > 0.05$) on contaminated ISO soils, the only significant decrease was found for final shell masses with a reduction of more than 30% (Table III.2). For the ME4 exposed snails, the viscera and the shell appeared as the compartments implicated in the differences noticed in the whole body masses of the organisms (Fig. III.1, Table III.2).

Table III.2. Parameters of the Gompertz model fitted to the foot, viscera and shell growth data of the *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. W_{max} is the maximal mass reached (g), k_g the growth constant (d^{-1}) and I the time at the inflection point (d).

		Modelled parameters			r^2
		$W_{\text{max}} (\pm \text{SE})$ g	$k_g (\pm \text{SE})$ d^{-1}	$I (\pm \text{SE})$ d	
Foot	ISO 0	2.88±0.26 ^a	0.064±0.006 ^a	13.12±1.70 ^a	0.780
	ISO 20	2.92±0.21 ^a	0.062±0.006 ^a	13.58±1.65 ^a	0.861
	ISO 100	2.66±0.20 ^a	0.079±0.008 ^b	10.59±1.33 ^a	0.745
	ME4	3.08±0.23 ^a	0.065±0.006 ^{ab}	13.73±1.56 ^a	0.839
Viscera	ISO 0	3.27±0.32 ^a	0.055±0.006 ^a	15.63±1.82 ^a	0.774
	ISO 20	3.54±0.46 ^a	0.054±0.007 ^a	14.74±2.74 ^a	0.773
	ISO 100	3.81±0.44 ^{ab}	0.050±0.006 ^a	18.05±1.85 ^a	0.766
	ME4	4.54±0.48 ^b	0.052±0.006 ^a	18.99±2.43 ^a	0.883
Shell	ISO 0	2.27±0.16 ^a	0.019±0.007 ^a	54.26±34.20 ^a	0.706
	ISO 20	1.61±0.37 ^b	0.021±0.005 ^a	52.63±34.34 ^a	0.849
	ISO 100	1.54±0.54 ^b	0.023±0.006 ^a	36.81±15.81 ^a	0.721
	ME4	2.77±0.54 ^c	0.020±0.004 ^a	55.13±17.27 ^a	0.870

Values that share similar letters are not significantly different (ANOVA, $p > 0.05$).

III.3.2.3. Effects of soil contamination on adult growth

At the end of the exposure phase, the snails, then aged 16 weeks old and normally adult, were transferred on uncontaminated substrate. During this 12-week depuration period, snail fresh masses did not significantly vary whatever the treatment ($p = 0.866, 0.111, 0.697$ and 0.712 for ISO 0, ISO 20, ISO 100 and ME4, respectively) (Fig. III.1) demonstrating that

no growth recovery occurred in snails previously exposed to ISO contaminated soils. In the same time, the fresh mass difference observed at 84 days between the snails exposed to ISO 0 and ME4 became blurred. Similar growth trends were observed for the foot, the viscera and the shell (data not shown).

III.3.3. Reproduction

III.3.3.1. Sexual differentiation and maturation

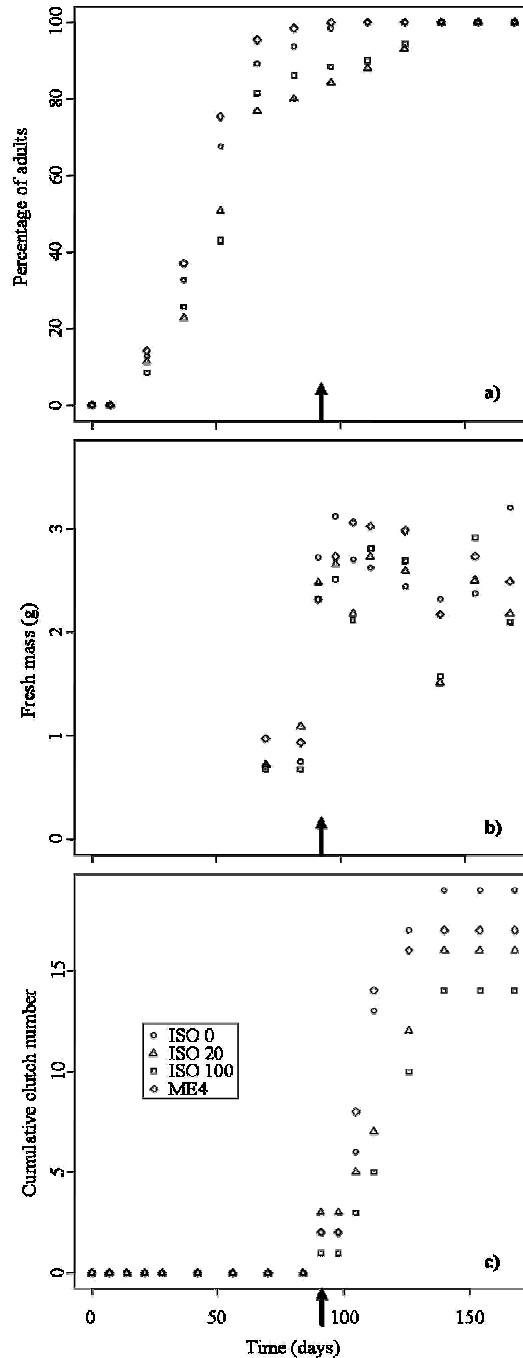


Figure III.2. Sexual differentiation and maturation of *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. a) time course of adult percentages, b) time course of the genital tract fresh mass and c) time course of the cumulative number of clutches.

The first snails showing a lipped shell (adult size) were observed from the 35th day of exposure. Their proportion increased quickly to reach, at the end of the exposure phase, more than 95% in ISO 0 and ME4 treatments (Fig. III.2a) whereas, at the same time, only 80 and 86% of snails exposed to contaminated ISO 20 and ISO 100 soils, respectively, had reached adulthood. This significant difference ($p < 0.001$) emphasized the existence of a delay in shell building in snails exposed to 20 and 100 mg Cd.kg⁻¹ in artificial soil.

No significant differences have been checked in the fresh mass of the genital tract of snails exposed to the contaminated soils ($p = 0.075$). The end of the exposure phase, corresponding to the end of growth, was marked by a dramatic development of the genital tract (Fig. III.2b). Its fresh mass more than doubled between days 84 and 91 before stabilizing in the adult stage (deuration phase). There, the same temporal trends were observed in all treatments ($p = 0.215$), indicating the absence of Cd-related effects on the genital tract development.

III.3.3.2. Reproductive capacities

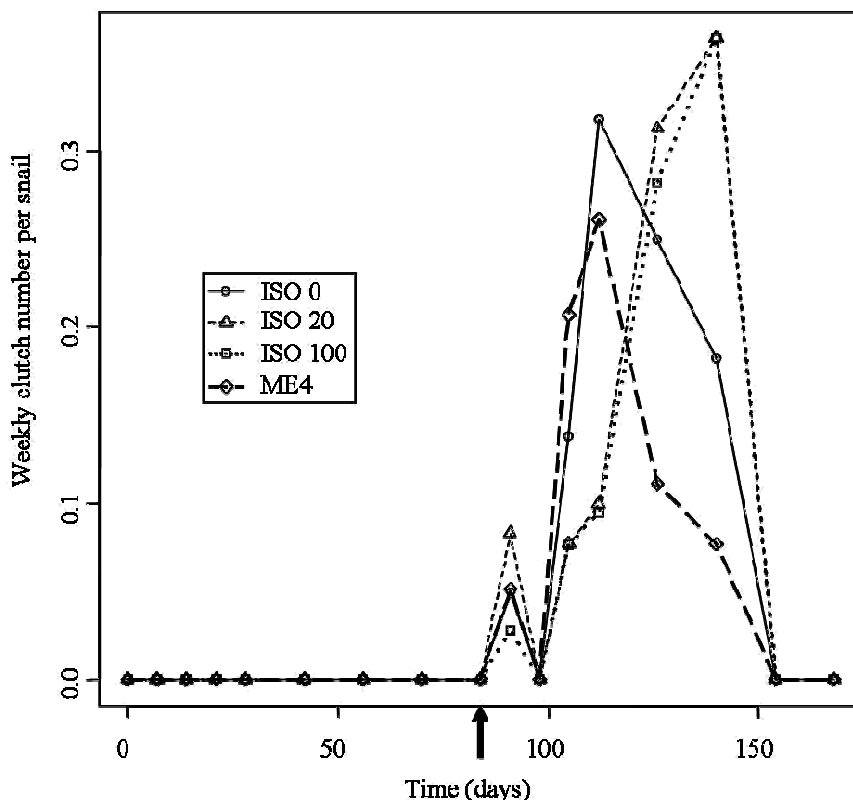


Figure III.3. Time course of the weekly number of clutches per snail in the different treatments.

The laying cycle of snails previously exposed to Cd-contaminated soils showed a similar temporal pattern between treatments with a 49-day intensive laying period. At the end

of this phase, individuals exposed to Cd on ISO 20 and ISO 100 soils had laid less than control and ME4 snails ($p < 0.05$) (Fig. III.2c). On the other hand, clutch fresh mass and the number of eggs per clutch did not differ significantly between treatments ($p = 0.778$ and 0.328 respectively) with an average mass of 4.3 ± 1.1 g per clutch for 126.1 ± 39.2 eggs.

The delay observed in the formation of a lipped shell during the exposure phase was accompanied by a discrepancy in the distribution of the number of clutches per reproducer on contaminated ISO soils (Fig. III.3). While for ISO 0 and ME4, the maximum weekly number of clutches per reproducer was observed during the 112th day of the experiment, it occurred during the 140th day on ISO 20 and ISO 100.

III.4. Discussion

In the biological cycle of organisms, growth and reproduction are fundamental ecophysiological parameters that contribute to the sustainability of populations (Laskowski and Hopkin, 1996a). Although the assessment of Cd toxicity on the above endpoints, considered separately, is not new for snails, the present data give original information on the chronic responses of the same individuals exposed to realistic Cd soil contaminations.

During the experiment, no mortality related to Cd was observed, which confirmed the high tolerance of snails to this metal (Russell *et al.*, 1981; Laskowski and Hopkin, 1996b) and emphasized the pertinence of sublethal toxicity endpoints. The concentrations used, which can occur in polluted ecosystems, caused long-term physiological effects that cannot be assessed by acute toxicity testing. Their evaluation required the development of new assessment criteria provided by accurate tools like modelling. Among the growth models used in the present study, the Gompertz equation appeared statistically and biologically the most suited. It gave the position of the inflection point from which it was possible to quantify variations in growth velocity (Tsoularis and Wallace, 2002). In chronic exposure experiments, the inflection point constitutes a relevant information for growth analysis. This time integrator parameter is complementary to the growth coefficient, a selective value of the growth at a specific date, classically calculated in subchronic toxicity tests (Gomot-de Vaufleury, 2000; Coeurdassier *et al.*, 2002). Based on growth velocities, snail growth has been divided into three phases: an infantile phase (from 0 to 19 days of experiment), a juvenile and pre-adult phase (from 19 to 91 days) and an adult phase beyond 91 days of experiment. Considering that at the beginning of the experiment the snails were 28 days old, these results tally with those of Gomot and Enee (1980) who detailed the existence of three growth phases in *H.*

aspersa from data concerning diametrical growth of shell and sexual differentiation. Although originally applied to mammalian growth (Zullinger et al., 1984), the Gompertz model has also proved to be efficient for microorganisms (Lopez et al., 2004), plants (Tei et al., 1996) and earthworms (Spurgeon et al., 2004) and now for terrestrial snails. Special care was taken during its application to snail growth (according to the recommendations of Begall, 1997), e.g. taking into consideration the whole growth period or estimating growth parameters on individual data and not on average values.

The previous toxicological studies with the same snail species set EC₅₀ values (effective concentration that reduces growth by 50% compared to the control) after 4 weeks of exposure at about 140 mg Cd.kg⁻¹ for food exposure (ISO, 2006) and ranging from 534 to 877 mg Cd.kg⁻¹ for soil exposure (Coourdassier et al., 2002). In our study, at the end of the 12-week exposure phase, snails exposed to ISO 20 and 100 spiked soils showed an average fresh mass significantly lower than controls. Although it contained a similar absolute level of Cd, the ME4 soil sustained the snail well-being and even stimulated their growth in comparison to the ISO controls. In this field soil, the presence of promoting growth factors such as calcium and magnesium (Gomot et al., 1989) likely explained these contrasting results. The 28-day subchronic exposure, as advised by the guideline (ISO, 2006), might therefore not be sufficient to highlight toxic effects. We emphasized that the first phase of growth should not be considered as the single target of Cd exposure and that toxicity can have an impact on further life stages, even if organisms are transferred to clean soil. In agreement with previous experiments carried out with juvenile or adults *Helix engaddensis* dietary contaminated by metals (Swaileh and Ezzughayyar, 2000; Swaileh et al., 2002), the growth monitoring conducted during the depuration phase with snails previously exposed to the Cd-contaminated soils did not highlight a growth recovery. On the contrary, differences with the controls became increasingly noticeable with a growth inhibition of 12% both for snails exposed to ISO 20 and ISO 100. Moreover, although the development of the genital tract was not disrupted by the exposure to the contaminated ISO soils, adverse effects on reproduction processes were revealed by the delay observed in the formation of a shell lip and the disruption of the laying cycle.

As the Cd concentrations accumulated in the snails exposed to ISO contaminated soils (Table III.3) were far below from those able to overburden the detoxification capacities of the Cd-binding metallothioneins and thus able to exert adverse effects on cells (Chabicovsky et al., 2004; Manzl et al., 2004), other explanations have to be investigated to elucidate the snails' physiological disturbance. The energy-dependent processes involved in the metal

distribution, sequestration and excretion may be evoked since they could disrupt the energy allocation to physiological processes such as growth or reproduction (Rainbow and Dallinger, 1993). The shell was the most affected part of the exposed snails with a 30% mass decrease in individuals exposed to Cd on artificial soil and largely participated to the general growth inhibition. The shell consists mainly of calcium carbonate (ca. 97% of its mass) and an organic matrix called chonchiolin (Heller and Magaritz, 1983). The role of calcium (Ca) in the whole body development has been demonstrated in *H. aspersa* (Gomot et al., 1989) and in *Achatina fulica* where the effect of dietary Ca on growth was related to an increase in shell mass and thickness (Ireland, 1991). Moreover, interferences and competition between Ca and Cd and ensuing effects have also been highlighted in a broad range of organisms (Craig et al., 1999; Molnár et al., 2004). In our study, the higher Ca content of the ME4 soil (49.9 mg.kg⁻¹ soil) compared to the ISO soil (5.4 mg.kg⁻¹ soil) may have decreased the Cd-Ca interferences and the induction of adverse effects. Such competitive phenomena have also been highlighted between Ca and lead in the shell mass reduction in juvenile snails (*H. aspersa*) submitted to digestive contamination (Beeby et al., 2002). In the same way, a close association between Ca dynamics and reproductive physiology has been described for several terrestrial gastropods (Tompa and Wilbur, 1977; Fournie and Chetail, 1984). Egg production involves a large deployment of resources including Ca mobilisation from the shell and soft tissues (Tompa, 1980). In snails exposed to the Cd-contaminated ISO soils, the reduction of the Ca reserves, related to the growth inhibition of the shell, led to a 4-week time lag in the laying cycle, possibly to allow for the readjustment of the Ca dynamics necessary for egg production. Such a phenomenon might also explain the absence of growth recovery since it was unlikely related to the direct toxicity of the soil Cd.

It is interesting to note that in addition to the increasing (5 and 10%) mass reduction observed on ISO 20 and ISO 100 contaminated soils, respectively, the kinetic assessment of the growth response allowed emphasis to be placed on the precocity of the growth inhibition in snails exposed to ISO 100, the first significant effects appearing 14 days earlier than on ISO 20. This difference, as the one observed between the evenly polluted ISO 20 and ME4 soils, has to be related to differences in Cd bioavailability in soils as a function of soil physicochemical properties (pH, organic matter, Ca, ageing and metal interactions) (Crommentuijn et al., 1997; Lock and Janssen, 2001, Spurgeon and Hopkin, 1996; Weltje, 1998). Van Straalen et al. (2005) proposed that uptake fluxes could serve as indicators of metal bioavailability for soil invertebrates and as determinants of sublethal effects resulting in

the exposure to contaminated environments. Using data obtained from a toxicokinetic approach (Gimbert et al., 2006), the uptake fluxes (a) were therefore calculated for snails exposed to the different soils and are presented in Table III.3. Based on these data and on the differences between treatments, similar conclusions may be drawn for *H. aspersa* snails, *i.e.* higher the uptake flux, higher the growth inhibition. Effects observed on growth and reproduction have to be related to metal fractions that are available for uptake by organisms and therefore potentially available for disrupting metabolic functions and/or exerting adverse effects (Peijnenburg and Jager, 2003).

Table III.3 Internal concentrations (C_{sn}) and parameter estimates for uptake of Cd in the foot and the viscera of *H. aspersa* snails exposed to the different treatments. Adapted from Gimbert et al., 2006. a is the uptake flux constant ($\mu\text{g Cd.g}_{\text{snail}}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and k_2 is the excretion rate constant (d^{-1}).

		Accumulated concentrations		Modelled parameters				r^2
		$C_{sn}(84\text{d})\pm \text{SE}$	$\text{BAF}_{84\text{d}}$	$a \pm \text{SE}$	p-value	$k_2 \pm \text{SE}$	p-value	
		$\text{mg Cd.kg}_{\text{snail}}^{-1}$		$\mu\text{g Cd.g}_{\text{snail}}^{-1}.\text{d}^{-1}$		d^{-1}		
Whole body	ISO 0	0.43±0.10	13.44	-	-	-	-	-
	ISO 20	10.04±1.09	0.45	1.699±0.309 ^a	<0.001	0.165±0.040 ^a	<0.001	0.660
	ISO 100	57.51±24.07	0.54	10.939±1.280 ^b	<0.001	0.170±0.030 ^a	<0.001	0.640
	ME4	5.48±1.42	0.27	0.452±0.085 ^c	<0.001	0.070±0.026 ^b	0.011	0.512
Viscera	ISO 0	0.71±0.27	22.18	-	-	-	-	-
	ISO 20	11.27±2.39	0.51	2.612±0.465 ^a	<0.001	0.211±0.048 ^a	<0.001	0.562
	ISO 100	73.33±4.80	0.69	18.04±2.64 ^b	<0.001	0.209±0.041 ^a	<0.001	0.673
	ME4	6.35±1.31	0.31	2.082±0.531 ^a	<0.001	0.346±0.105 ^a	0.001	0.458
Foot	ISO 0	0.08±0.02	2.50	-0.022±0.008 ^a	0.011	0.155±0.079 ^a	0.051	0.311
	ISO 20	8.42±3.29	0.38	0.886±0.199 ^b	<0.001	0.185±0.062 ^a	0.003	0.352
	ISO 100	17.42±4.33	0.15	3.586±0.738 ^c	<0.001	0.196±0.060 ^a	0.001	0.581
	ME4	1.98±1.08	0.10	0.041±0.008 ^d	<0.001	-0.024±0.012 ^{ab}	0.047	0.519

Adapted from Gimbert et al., 2006. a is the uptake flux constant ($\mu\text{g Cd.g}_{\text{snail}}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and k_2 is the excretion rate constant (d^{-1}).

Values that share similar letters are not significantly different (ANOVA, $p>0.05$).

Negative values of the parameter estimates should be biologically considered as zero values.

III.5. Conclusion

The present data demonstrate that chronic exposure is necessary in order not to underestimate the toxic effects of contaminated soils on juvenile snails and to detect the consequences on the reproductive potential of adults. They enlarge the choice of endpoints

usable with snails for ERA as well as the scope of the experimental set-up proposed in the ISO test for soil quality assessment (ISO, 2006). Based on this standardised procedure, we showed that a classic 28-day exposure to slightly contaminated soils might be too short to highlight growth disruption and subsequent reproductive disturbances that may occur in adults. Even if the absence of mortality and the subtlety of the measured effects prevented us from estimating EC or LC₅₀ and made it difficult to attempt population level measures of ecotoxicity, the observed responses cannot be neglected when considering the impact of moderate soil contamination by Cd. Proposed by the U.S. Environmental Protection Agency, ecological soil screening levels (Eco-SSL) are concentrations of contaminants in soil that should be protective of ecological receptors that commonly come into contact with soil or ingest biota that live in or on soil. Eco-SSL for invertebrates, expressed by the maximal acceptable Cd concentration (equal to the geometric mean of the NOAEC and the LOAEC), was assessed at 140 mg Cd.kg⁻¹ dry soil (US-EPA, 2003). From our results, it is obvious that this threshold is too high for snails. This highlights the need for and the interest of research on chronic or life cycle exposure at low contamination levels to improve risk assessment procedures.

Acknowledgements

We express gratitude to Pr. L. Gomot for helpful scientific discussions and critical comments about the manuscript and C. Lovy for technical assistance. We also thank the two anonymous reviewers for valuable comments on the paper. This work was supported by grants from the Conseil Régional of Franche-Comté, the ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, contracts n°01 75037 and n° 0572 C0058) and the ANR (Agence Nationale de la Recherche, programme STARTT, contract n° ANR-05-ECC0-004).

References

- Akaike, H., 1977. Canonical correlation analysis of time series and the use of an information criterion. In: Lainiotis, D.G., Mehra, R.K. (Eds). System identification: Advances and Case studies. Academic Press, p. 27-96.
- Baize, D., Girard, M.C. (coord.), Hodgson, J.M., Eskenazi, N.R., Baize, D. (trans.), 1998. A Sound Reference Base for Soils: The "Référentiel Pédologique". INRA Editions, Versailles, France, pp. 324.

- Beeby, A., Richmond, L., Herpé, F., 2002. Lead reduces shell mass in juvenile garden snails (*Helix aspersa*). *Environ. Pollut.* **120**, 283-288.
- Begall, S., 1997. The application of the Gompertz model to describe body growth. *Growth Dev. Aging* **61**, 61-67.
- Burnham, K.P. and Anderson, D.R., 2004. Multimodel inference. Understanding AIC and BIC in model selection. *Sociol. Meth. Res.* **33**, 261-304.
- Chabicoovsky, M., Klepal, W., Dallinger, R., 2004. Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates: programmed cell death and metallothionein overload. *Environ. Toxicol. Chem.* **23**, 648-655.
- Coeurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A., Lovy, C., Badot, P.M., 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotox. Environ. Safe.* **53**, 425-431.
- Craig, A., Hare, L., Tessier A., 1999. Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*. *Aquat. Toxicol.* **44**, 255-262.
- Crommentuijn, T., Doornekamp, A., Van Gestel, C.A.M., 1997. Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Appl. Soil Ecol.* **5**, 261-271.
- Dan, M. and Bailey, S.E.R., 1982. Growth, mortality and feeding rates of the snail *Helix aspersa* at different population densities in the laboratory and the depression of activity in helioid snails by other individuals, or their mucus. *J. Molluscan Stud.* **48**, 257-265.
- Fournie, J. and Chetail, M., 1984. Calcium dynamics in land gastropods. *Amer. Zool.* **24**, 857-870.
- Gamito, S., 1998. Growth models and their use in ecological modelling: an application to a fish population. *Ecol. Model.* **113**, 83-94.
- Gimbert, F., de Vaufleury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Badot, P.M., 2006. Modelling chronic exposure to contaminated soil: a toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environ. Int.* **32**, 866-875.
- Gomot-de Vaufleury, A., 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotox. Env. Safe.* **46**, 41-50.
- Gomot, L. and Enee, J., 1980. Biologie de la reproduction de l'escargot *Helix aspersa* Müller : les phases de croissance et la différenciation sexuelle. *Atti Accademia Fisiocritici Siena*, 73-85.

- Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., Bruckert, S., 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of the route for the stimulating factors. *J. Molluscan Stud.* **55**, 1-7.
- Gomot-de Vaufleury, A. and Kerhoas, I., 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **64**, 434-442.
- Heller, J. and Magaritz, M., 1983. From where do land snails obtain the chemicals to build their shells ? *J. Molluscan Stud.* **49**, 116-121.
- Ireland, M.P., 1991. The effect of dietary calcium on growth, shell thickness and tissue calcium distribution in the snail *Achatina fulica*. *Comp. Biochem. Physiol.* **98A**, 111-116.
- ISO 11267, 1999. Soil quality. Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 11268-2, 1998. Soil quality. Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*). Part 2 : Determination of effects on reproduction. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 16387, 2004. Soil quality. Effects of pollutants on *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.). Determination of effects on reproduction and survival. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 15952, 2006. Soil quality. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- Kammenga, J.E., Busschers, M., Van Straalen, N.M., Jepson, P.C., Bakker, J., 1996. Stress induced fitness reduction is not determined by the most sensitive life-cycle trait. *Funct. Ecol.* **10**, 106-111.
- Laskowski, R., 1997. Estimating fitness costs of pollution in iteroparous invertebrates. In: van Straalen, N.M., Løkke, H. (Eds.). *Ecological Risk Assessment of Contaminants in Soils*. Chapman & Hall, London, UK, pp. 352.
- Laskowski, R. and Hopkin, S.P., 1996a. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotox. Environ. Safe.* **34**, 59-69.
- Laskowski, R. and Hopkin, S.P., 1996b. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail *Helix aspersa*: implications for predators. *Environ. Pollut.* **91**, 289-297.
- Lindstrom, M.J. and Bates, D.M., 1990. Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics* **46**, 673-687.
- Lock, K. and Janssen, C.R., 2001. Effect of clay and organic matter type on the ecotoxicity of zinc and cadmium to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Chemosphere* **44**, 1669-1672.

- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., France, J., 2004. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *Int. J. Food Microbiol.* **96**, 289-300.
- Lucarz, A. and Gomot, L., 1985. Influence de la densité de population sur la croissance diamétrale et pondérale de l'escargot *Helix aspersa* Müller dans différentes conditions d'élevage. *J. Molluscan Stud.* **51**, 105-115.
- Manzl, C., Krumschnabel, G., Schwarzbaum, P.J., Dallinger, R., 2004. Acute toxicity of cadmium and copper in hepatopancreas cells from the Roman snail (*Helix pomatia*). *Comp. Biochem. Physiol.* **138C**, 45-52.
- Molnár, G., Salánki, J., Kiss, T., 2004. Cadmium inhibits GABA-activated ion currents by increasing intracellular calcium level in snail neurons. *Brain Res.* **1008**, 205-211.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 1984. Test No. 207: Earthworm acute toxicity tests. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* **1**, 1-9.
- Peijnenburg, W.J.G.M. and Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotox. Environ. Safe.* **56**, 63-77.
- Pinheiro, J.C. and Bates, D.M., 2000. Mixed-effects models in S and S-PLUS. Springer-Verlag, New-York, USA, pp. 528.
- R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rainbow, P.S. and Dallinger, R., 1993. Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. In: Dallinger, R., Rainbow, P.S., Eds. *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 119-131.
- Russell, L.K., DeHaven, J.I., Botts, R.P., 1981. Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **26**, 634-640.
- Spurgeon, D.J. and Hopkin, S.P., 1996. Effects of variations in the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia* **40**, 80-96.
- Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Kille, P., Morgan, A.J. and Weeks, J. M., 2004. Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecotox. Environ. Safe.* **57**, 54-64.
- Swaileh, K. M. and Ezzughayyar, A., 2000. Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotox. Environ. Safe.* **47**, 253-260.
- Tarazona, J.V. and Vega, M.M., 2002. Hazard and risk assessment of chemicals for terrestrial ecosystems. *Toxicology* **181-182**, 187-191.

- Tei, F., Aikman, D. P., Scaife, A., 1996. Growth of lettuce, onion and red beet. 2. Growth modelling. *Ann. Bot.* **78**, 645-652.
- Tompa, A.S., 1980. Studies on the reproductive biology of gastropods: part III. Calcium provision and the evolution of terrestrial eggs among gastropods. *J. Conchol.* **30**, 145-154.
- Tompa, A.S. and Wilbur, K.M., 1977. Calcium mobilisation during reproduction in snail *Helix aspersa*. *Nature* **270**, 53-54.
- Topal, M., Ozdemir, M., Aksakal, V., Yildiz, N., Dogru, U., 2004. Determination of the best nonlinear function in order to estimate growth in Morkaraman and Awassi lambs. *Small Ruminant Res* **55**, 229-232.
- Tsoularis, A. and Wallace, J., 2002. Analysis of logistic growth models. *Math. Biosci.* **179**, 21-55.
- US-EPA (United States Environmental Protection Agency), 2003. Ecological soil screening levels for cadmium. Interim final. OSWER Directive 92857-65, Washington, DC, USA.
- van Straalen, N.M., Donker, M.H., Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., 2005. Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environ. Pollut.* **136**, 409-417.
- van Straalen, N.M., Schobben, J.H.M., de Goede, R.G.M., 1989. Population consequences of cadmium toxicity in soil microarthropods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **17**, 190-204.
- Weltje, L., 1998. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soil: a critical evaluation of data. *Chemosphere* **36**, 2643-2660.
- Yu, R., Leung, P., Bienfang, P., 2006. Predicting shrimp growth: Artificial neural network versus nonlinear regression models. *Aquac. Eng.* **34**, 26-32.
- Zullinger, E.M., Ricklefs, R.E., Redford, K.H., Mace, G.M., 1984. Fitting sigmoidal equations to mammalian growth curves. *J. Mamm.* **65**, 607-636.

Chapitre IV

Comment la répartition subcellulaire des ETM peut-elle aider à comprendre leurs cinétiques d'accumulation et d'élimination chez les escargots ?

Cette expérimentation a fait l'objet d'un article soumis dans la revue *Environmental Toxicology and Chemistry*. Les auteurs sont Frédéric Gimbert, Martina G. Vijver, Michaël Coeurdassier, Renaud Scheifler, Willie J.G.M Peijnenburg, Pierre-Marie Badot et Annette de Vaufleury.

Résumé

Pour comprendre les cinétiques d'accumulation des métaux dans les organismes vivant dans des sols industriellement contaminés, les toxicocinétiques et le fractionnement subcellulaire ont été étudiées chez l'escargot *Helix aspersa* au cours d'une expérience de long terme (six mois) en laboratoire. Les cinétiques d'accumulation et d'élimination ont été déterminées pour le Cd, le Pb et le Zn dans les viscères et le pied des escargots et décrites par des modèles à un compartiment. Les fractions subcellulaires ont été obtenues par centrifugations séquentielles et analysées en isolant les fractions granulaires, cytosoliques et les débris cellulaires. Les différentes fractions présentaient des capacités de liaison spécifiques aux métaux utiles pour identifier la signification biologique des quantités en métaux atteintes dans les organismes. Le Cd a été principalement retrouvé dans la fraction cytosolique où il était stocké à long terme, non excrété, expliquant ses patterns d'accumulation linéaires. La plupart du Pb a été retrouvée dans la fraction granulaire et les escargots étaient capables d'excréter ces concrétions conduisant à l'acquisition d'un état d'équilibre dans les quantités internes en Pb accumulées. Cependant, des quantités importantes de Pb ont été retrouvées à la fin de la phase de dépuration, retenues dans la fraction des débris cellulaires. Le Zn présentait des affinités à la fois pour les fractions cytosoliques et granulaires, conduisant à des patterns d'accumulation et d'élimination intermédiaires. Parce que les dynamiques des différentes formes de séquestration des métaux ne sont pas identiques, les flux d'absorption et la distribution subcellulaire des métaux permettent une estimation plus précise de l'accumulation des métaux chez l'escargot.

How subcellular partitioning can help to understand heavy metal accumulation and elimination kinetics in snails

Abstract

To understand bioaccumulation kinetics of metals within biota inhabiting industrially contaminated soils, toxicokinetic dynamics and subcellular fractionation were carried out with the terrestrial snail *Helix aspersa* in a long-term laboratory experiment (6 months). Accumulation and elimination kinetics were determined for Cd, Pb and Zn in both viscera and foot of snails and accurately described by one-compartment models. The subcellular fractions were obtained by sequential centrifugations and analysed by isolating metal-rich granules, tissues fragments and cytosolic fractions. Different fractions showed metal-specific binding capacities that might be useful in identifying the biological significance of accumulated metal levels reached in snails. Cd was mainly retrieved from the cytosolic fraction where it was stored in the long term, not excreted, explaining the linear accumulation patterns. Most of the accumulated Pb was found in the granular fraction and snails appeared able to excrete these concretions leading to the achievement of a steady-state in internal Pb body burdens. However, significant levels of Pb were retrieved at the end of the depuration phase, retained in the cell debris fraction. Zinc showed affinities for both cytosolic and granular fraction, leading to intermediate uptake and excretion patterns. The dynamics of the different sequestration forms at the subcellular level support the observed kinetics of metal body burdens and, in association with the determination of uptake fluxes, allow for a precise assessment metal accumulation in snails.

IV.1. Introduction

Bioaccumulation of metals is a complex phenomenon since it is the outcome of several processes: uptake, distribution, storage and excretion [1]. Therefore, bioaccumulation has to be considered as a time-dependent process under the dynamic influence of biological (target organism or organ) and geochemical (physico-chemical properties of the medium and of the metal) factors [2]. Knowledge of accumulation patterns is a prerequisite to better understand the underlying physiological processes explaining why terrestrial invertebrates accumulate different trace metals to different levels [3] and to determine their

bioaccumulation potentials in organisms. In this purpose and due to the dynamic character of bioaccumulation, it was recommended that the bioconcentration factors (BCFs) should be calculated according to the “kinetic method” [4]. This standardised procedure, currently available only for the assessment of the bioaccumulation of chemicals in fishes, applies accumulation kinetic modelling to estimate uptake (k_1) and excretion (k_2) rates, the ratio of which provides the BCF at steady-state. Toxicokinetic models have been applied to a broad range of organisms to describe the bioaccumulation of metals [5-7]. They provide useful physiology-based information concerning pollutant bioavailability and fluxes in organisms [8,9] required in the development of new risk assessment methods for terrestrial environments [10].

Understanding of the physiological processes controlling bioaccumulation relies on the internal fate of metals and the related biological and ecotoxicological significances [11]. Metals taken up by loosely binding (sensitive) fractions may be eliminated from the body, resulting in an accumulation curve reaching steady-state, whereas metals strongly bound to inert (detoxified) fractions may not or slowly be excreted, resulting in linear accumulation patterns [11]. To date, in terrestrial environment, research on metal distribution over the internal fractions has been carried out mainly on annelids [12] while studies with molluscs mainly focus on the storage forms of metals within an organ [13-15]. Despite the recognized interest of terrestrial snails in ecotoxicological research [16-18], little is known about the link between metal internal compartmentalization and its consequence on metal fluxes in snails. We hypothesised here that the biochemical affinity of metals for different ligands can assist in understanding their accumulation, storage and excretion potentials in snails.

In this paper, we aimed to understand the heavy metal accumulation (uptake and elimination) and distribution in the snail *Helix aspersa* exposed to contaminated soil. Long-term toxicokinetic studies combined with internal fractionation analyses were performed to explain the temporal dynamics of cadmium (Cd), lead (Pb) and zinc (Zn) taken up from soil in relation to the biological significance of the metal sequestration forms.

IV.2. Materials and Methods

IV.2.1. Test organisms

Two hundred and thirty juvenile garden snails, *Helix aspersa aspersa* Müller, 1774 (also called *Cantareus aspersus aspersus*), were used in this experiment. They were obtained from our laboratory breeding facility and reared under optimal conditions [19] until the age of

one month, as recommended in standard ISO 15952 [20]. Before the beginning of the experiment, snails were subjected to 48h of fasting to empty their guts.

IV.2.2. Soils

Two different soils were used in this study: a field soil (ME4) contaminated by industrial deposits and an artificial (OECD) control soil.

Table IV.1. Physico-chemical characteristics of the ISO artificial and ME4 field soils.

	ISO	ME4
Clay, %	13.6	23.8
Silt, %	12.6	65.4
Sand, %	73.8	10.8
Water holding capacity, mL.kg ⁻¹	619.1 ± 4.5	496.6 ± 4.5
pH _{water}	5.91 ± 0.02	7.80 ± 0.01
pH _{KCl}	5.48 ± 0.04	7.27 ± 0.03
LOI ^(a) , %	11.95 ± 0.80	9.06 ± 0.49
Total CaCO ₃ , g.kg ⁻¹	8.7	96.0
Total Ca, g. kg ⁻¹	5.42	45.9
Total Mg, g. kg ⁻¹	1.0	5.7
CEC, cmol.kg ⁻¹	9.5	16.8
Exchangeable Ca, cmol.kg ⁻¹	21.5	37.6
Exchangeable Mg, cmol.kg ⁻¹	1.3	0.6
CaCl ₂ extractable Cd ^(b) , mg.kg ⁻¹	< LD	0.41 ± 0.01
CaCl ₂ extractable Pb ^(b) , mg.kg ⁻¹	< LD	0.69 ± 0.10
CaCl ₂ extractable Zn ^(b) , mg.kg ⁻¹	< LD	1.24 ± 0.02
Total Cd, mg.kg ⁻¹	0.032 ± 0.004	20.4 ± 0.2
Total Pb, mg.kg ⁻¹	3.8 ± 0.2	1895.6 ± 227.7
Total Zn, mg.kg ⁻¹	31.2 ± 2.9	1297.9 ± 225.4

^(a) Loss On Ignition (12h at 500°C)

^(b) procedure from Houba et al. (1996) [23]

The ME4 soil is a silty clay alfisol [21] collected in the North of France in a meadow zone located around a primary smelting works. The top 20 cm layer was manually collected after removal of the vegetation and transferred to the laboratory. Once air dried and sieved, the soil was homogenised and stored at room temperature until the experiment. As control soil, the artificial substrate consisted of a mixture of 70% fine sand, 20% kaolin clay and 10% coarse ground *Sphagnum* peat [22]. The soil pH was adjusted to 6.0 ± 0.5 with powdered calcium carbonate (CaCO₃, 99.5%, Prolabo). Demineralised water was added to reach 50 ±

5% of the water holding capacity. The soils were then left to stabilise for one month under experimental conditions (see below) prior to the experiment. Three samples were taken for physicochemical analyses (Table 1).

IV.2.3. Experimental design

IV.2.3.1. Experiment 1: accumulation and elimination kinetics

A 12 weeks accumulation experiment was carried out, in which 100 snails (0.82 ± 0.13 g) were exposed to the field contaminated soil (180 g dry mass, DM) in ten polystyrene containers (24 x 21 x 8 cm) (ref. E1DBBAC001, Charles River IFFA-CREDO, 69 L'Arbresle). Metal burdens in five replicate organisms were analysed after 0, 2, 5, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 and 84 days. Remaining snails were then transferred to the uncontaminated OECD soil for a 12 weeks depuration phase and internal metal body burdens were measured after 86, 89, 91, 98, 105, 112, 126, 140, 154 and 168 days. During the experiment, snails were fed *ad libitum* with uncontaminated Helixal® snail food (Chays Co. Ltd., Valdahon, 25800, France) naturally containing 0.3, 1.3 and 80.0 mg.kg⁻¹ food of Cd, Pb and Zn, respectively. The diet was provided to animals in a Petri dish left on the bottom of the container. In this way, the soil was considered as the single source of contamination by both oral and dermal routes [24]. The containers were cleaned and the food was renewed three times a week. At the same time, snail faeces were removed and the substrate was mixed. The day/night cycle photoperiod was 18/6h and the temperature $20 \pm 2^\circ\text{C}$. The relative humidity was 80 to 95%. Substrate relative humidity was maintained at its initial level by spraying demineralised water.

In parallel, as a reference, 100 snails (0.82 ± 0.13 g) were exposed to uncontaminated OECD soil in the same experimental design and sampled following the same procedure.

IV.2.3.2. Experiment 2: internal metal fractionation

A ten day uptake experiment was carried out, in which 30 snails (1.09 ± 0.10 g) were exposed under the same conditions (diet supplying, cleaning frequency, controlled photoperiod, temperature and relative humidity) as in Experiment 1. Six reference snails were sampled at the beginning of the exposure and the 24 remaining individuals were equally divided into 4 plastic containers, the bottom of which was covered with either contaminated ME4 soil (2 replicates) or uncontaminated OECD soil (2 replicates). After 10 days of

exposure, snails of one container of each modality were sacrificed and snails of the remaining container were transferred to uncontaminated OECD soil for a five-day depuration period.

IV.2.4. Analytical procedures

All sampled snails in both experiments were subjected to 48h of fasting to void their gut, killed by freezing and stored at -80°C until analysis.

After thawing, the whole soft body was removed from the shell and cut in two parts: the viscera (*i.e.* the visceral complex containing the posterior gut, the digestive gland, the kidney, the mantle and a part of the reproductive tract) and the foot (containing the foot *sensu stricto*, the anterior gut and the rest of the genital tract). Both parts were oven-dried at 60°C to constant mass and individually digested in 4 mL 50% HNO₃ (99.99%, Carlo Erba) at 60°C for 48h. Fifteen mL of deionised water were then added before analysis by atomic absorption spectrometry with a graphite oven (Varian 220 Z) with Zeeman background correction. The same analytical procedure was used for 0.3 g dried food (triplicates) and for 0.5 g dried soil (triplicates). The reliability of the analysis was assessed with standard reference material (TORT-2, lobster hepatopancreas from NRCC-CNRL, Canada, and calcareous loam soil n°141R from BCR, Belgium) and was within 10% of certified values.

Subcellular fractions were prepared by differential centrifugations, combined with chemical or heat treatment of some of the fractions as described previously [25]. Snails were thawed, removed from their shell and dissected into three parts: the gut, the foot and the viscera. Six snails exposed and sampled in the same container were combined to prepare a composite sample with ample biomass for tissue homogenization. The samples were homogenized with a tissue homogenizer (Ystral D-7801 Dottingen) fitted with a 7-mm sawtooth blade in 5 ml of ice-cold 0.01 M Tris-HCl buffer (pH 7.5; Fisher Scientific, Houston, TX, USA). Homogenates were centrifuged at 10,000 g for 30 min at 5 °C. The supernatant contained the cytosolic fraction (fraction C). Pellet fractions were boiled in water at 100°C for 2 min and hydrolyzed at 60 to 70°C for 1 h with 0.5 M NaOH (Merck, Darmstadt, Germany). The granules (fraction D) could be separated from tissue fragments, cell membranes and intact cells (fraction E) by centrifugation at 10,000 g for 10 min at 10 °C. For analyses, the dry residues were dissolved in 0.7 M HNO₃ (ultrapure; Sigma-Aldrich, Seelze, Germany). Metal analyses were performed by ICP-MS (Hewlett Packard, HP4500).

IV.2.5. Modelling

For statistical analysis of pollutant kinetics, the use of body burdens rather than tissue concentrations is recommended [26], since the latter can be affected by rapid changes of the mass of the organism [27]. The internal body burdens during the exposure and the depuration phases were therefore analysed in five independent snails for which three measurements were made. Body burdens in the snails (Q_{sn}) were described by applying one-compartment models (see Eqs (1) and (2)).

As observed in numerous saprophytic organisms [5-7] and recently in terrestrial snails [9], the increase of body burdens over time can be described by the following equation:

$$(1) \quad Q_{sn}(t) = Q_{sn}(0) + \frac{a}{k_2} (1 - e^{-k_2 t})$$

where $Q_{sn}(t)$ is the total amount of metal in the snails (μg) at time t (d), k_2 is the excretion rate constant (d^{-1}) and a is the uptake flux constant ($\mu\text{g}_{\text{metal}} \cdot \text{d}^{-1}$), which equals $k_1 \times C_e$ in which k_1 is the uptake rate constant ($\mu\text{g}_{\text{soil}} \cdot \text{d}^{-1}$) and C_e is the bioavailable external concentration in soil ($\mu\text{g}_{\text{metal}} \cdot \text{g}^{-1} \text{DM}$). $Q_{sn}(0)$ is the amount of metal measured in snails at the beginning of the experiment and was assumed to be a pool of constant magnitude.

Once transferred to uncontaminated soil, metal body burdens varied with time according to the equation:

$$(2) \quad Q_{sn}(t) = Q_{mr} + (Q_{mu} - Q_{mr}) \times e^{(-k_2 \times (t - t_c))}$$

where Q_{mr} is the residual amount of metal in snails (μg) at the end of the depuration period, Q_{mu} is the metal body burden at the end of the exposure period (μg), t_c is the time (d) at which animals were transferred to the clean soil and t is the time (d) since the beginning of the experiment.

The accumulation and elimination parameters were estimated by fitting the models with a mixed-effect procedure (nlme, [28]) allowing for nested random effects. The within-group errors are allowed to be correlated and/or have unequal variances. Differences in parameter estimates between metals were judged from the overlap of confidence intervals. Modelling and parameter quantification were performed with the free statistic software package R (version 2.2.1) [29].

IV.3. Results

During both experiments, mortality was low (3% and 0% during experiments 1 and 2, respectively) and snails grew similarly on both contaminated and uncontaminated soils to reach, on average (\pm standard deviation), 13.15 ± 2.08 g and 4.58 ± 1.04 g at the end of the experiments 1 and 2, respectively.

IV.3.1. Accumulation and elimination kinetics (Experiment 1)

For individuals exposed to the uncontaminated soil, no consistent trends of uptake were found for any of the metals neither in the viscera nor in the foot. Body burdens never exceeded 0.9, 4 and 10 μg for Cd, Pb and Zn, respectively, in the viscera and 0.2, 0.4 and 2 μg for Cd, Pb and Zn, respectively, in the foot (data not shown). For snails exposed to the field contaminated soil, the three metals examined in this study exhibited different metabolic patterns of accumulation and elimination (Fig. IV.1). For each metal, these patterns were similar in the viscera and in the foot. However, the accumulated amounts of metal after 12 weeks of exposure were 11, 16 and 17 times higher in the viscera than in the foot for Cd, Pb and Zn, respectively. Burdens accumulated in the shell ranged from 0.002, 0.31 and 0.22 μg at the beginning of the experiment to 0.03, 1.19 and 0.96 μg at the end of the exposure phase for Cd, Pb and Zn, respectively, *i.e.* only 0.4, 4.0 and 0.3% of the total burdens accumulated in the soft tissues (data not shown). The one-compartment models were therefore fitted to the individual data of the viscera and the foot and the estimated parameters are presented in Tables 2 and 3. The models adequately described the metal accumulation and elimination in snails as reflected by the elevated coefficients of determination (r^2) and by the low differences between measured and calculated body burdens at the end of the exposure phase (84 days) and the end of the depuration phase (168 days).

During the exposure phase, Cd body burdens increased rather linearly with exposure time in the exposed snails, reaching after 84 days about 7 and 0.7 μg in the viscera and the foot, respectively (Fig. IV.1(a,b)). The linear shape of the curve indicated absence of excretion as observed in Table 2. The Cd excretion rate constant (k_2) was estimated as a negative value that, without biological reality, has to be considered as being not significantly different from zero. For Pb, a steady-state was achieved in body burdens of both foot and viscera after about 42 days of exposure to the contaminated soil (Fig. IV.1(c,d)). Steady-state body burdens reached values close to 32 and 2 μg Pb in the viscera and the foot, respectively. The body burden of Zn did not achieve a steady state within the exposure duration (Fig.

IV.1(d,e) but the accumulation was not linear due to excretion processes ($k_2 = 0.020 \text{ d}^{-1}$, $p < 0.001$) as estimated by the model (Table 2). For both foot and viscera, uptake and excretion rates were found significantly different for each metal.

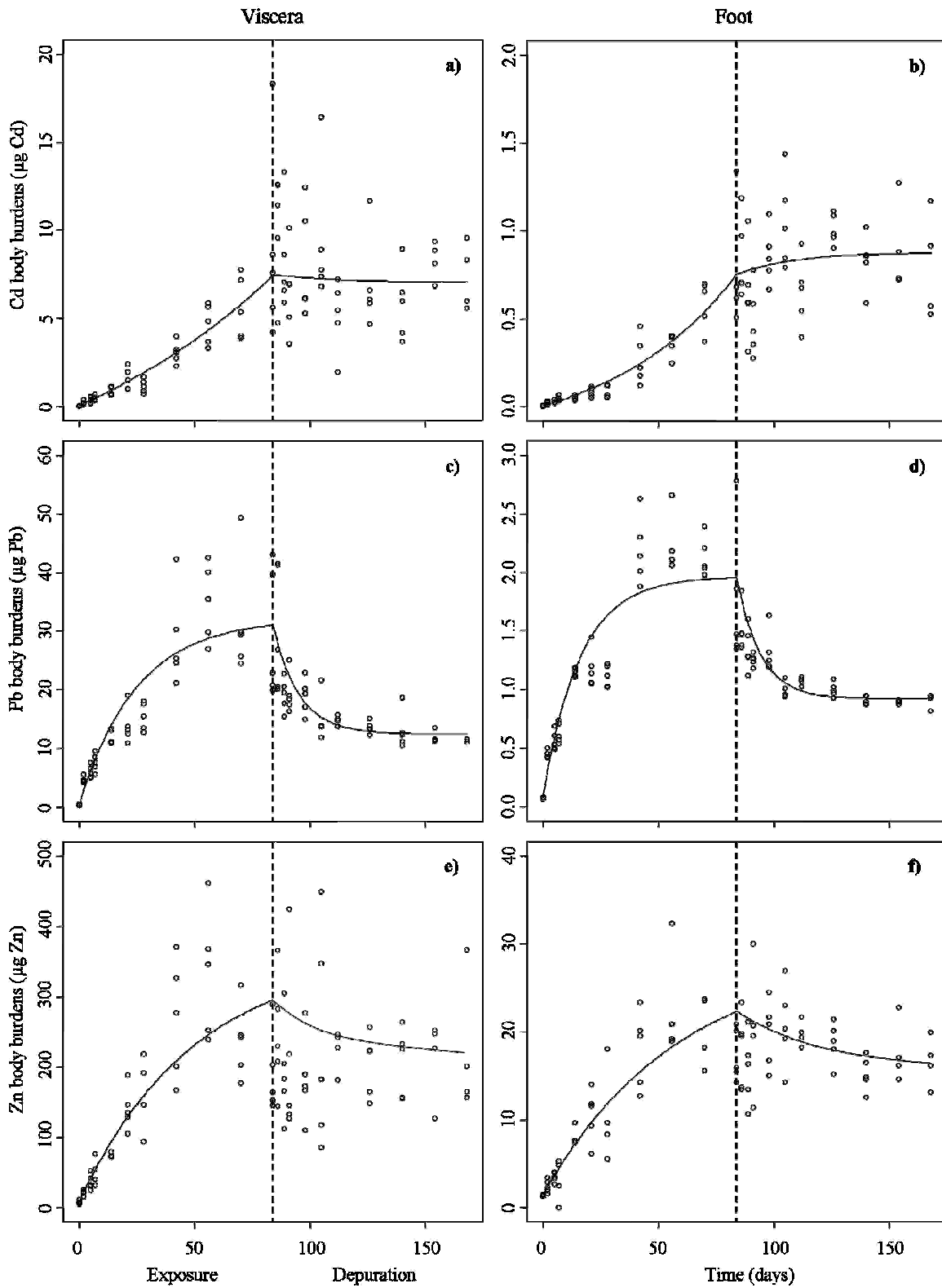


Figure IV.1. Cd, Pb and Zn accumulation and elimination kinetics in the viscera and the foot of *Helix aspersa* snails exposed to the field contaminated soil. Each data point represents an individual snail.

Table IV.2. Estimates for kinetic parameters for Cd, Pb and Zn accumulation in *Helix aspersa* snails exposed to the field contaminated soil.

		Measured		Modelled				r ²	Calculated	
		Qsn(84) ± SE	a	min/max	p-value	k ₂	min/max			p-value
		µg	µg _{metal} .d ⁻¹			d ⁻¹				
Viscera	Cd	8.88 ± 5.56	0.059 ^a	0.049/0.070	<0.001	-0.009 ^a	-0.017/-0.002	0.017	0.716	7.43
	Pb	29.29 ± 11.14	1.273 ^b	1.044/1.502	<0.001	0.040 ^b	0.030/0.051	<0.001	0.773	31.05
	Zn	290.95 ± 59.29	7.069 ^c	5.802/8.336	<0.001	0.020 ^c	0.009/0.030	<0.001	0.680	295.22
Foot	Cd	0.77 ± 2.33	0.004 ^a	0.003/0.005	<0.001	-0.017 ^a	-0.024/-0.011	0.034	0.834	0.75
	Pb	1.77 ± 0.60	0.117 ^b	0.098/0.136	<0.001	0.062 ^b	0.047/0.076	<0.001	0.816	1.95
	Zn	17.33 ± 2.99	0.468 ^c	0.371/0.565	<0.001	0.016 ^c	0.006/0.027	0.004	0.790	22.31

Minimum and maximum values are likelihood-based 95% confidence intervals. For one parameter, within the same snail part, values that share similar letters are not significantly different. Negative values of the excretion rates (k₂) should be biologically considered as zero values.

Table IV.3. Estimates for kinetic parameters for Cd, Pb and Zn elimination from *Helix aspersa* snails previously exposed to the field contaminated soil.

		Measured		Modelled				r ²	
		Qsn(168) (± SE)	k ₂	min/max	p-value	Q _{mr}	min/max		p-value
		µg	d ⁻¹			µg			
Viscera	Cd	7.37 ± 1.91	0.039 ^a	-0.467/0.554	0.884	7.06 ^a	4.98/9.14	<0.001	0.005
	Pb	11.70 ± 0.87	0.090 ^b	0.063/0.118	<0.001	12.49 ^b	11.54/13.44	<0.001	0.548
	Zn	222.25 ± 98.32	0.027 ^a	-0.052/0.107	0.368	210.04 ^c	184.32/235.75	<0.001	0.015
Foot	Cd	0.80 ± 0.31	0.042 ^a	-0.127/0.210	0.638	0.88 ^a	0.69/1.06	<0.001	0.055
	Pb	0.97 ± 0.16	0.097 ^b	0.075/0.120	<0.001	0.92 ^a	0.89/0.95	<0.001	0.534
	Zn	16.62 ± 2.83	0.025 ^a	-0.024/0.075	0.336	15.71 ^b	10.55/20.86	<0.001	0.035

Minimum and maximum values are likelihood-based 95% confidence intervals. For one parameter, within the same snail part, values that share similar letters are not significantly different. Negative values of the excretion rates (k₂) should be biologically considered as zero values.

During the 84 days-period of depuration, Cd was not eliminated from the viscera or the foot and body burdens kept values around 7 and 1 µg Cd, respectively (Fig. IV.1(a,b)). This fate was reflected by the non significant excretion rates estimated by the model both in the viscera (p=0.884) and in the foot (p=0.638) (Table 3). For Pb, body burdens in both viscera and foot decreased during the elimination phase to reach another steady-state after about 42 days of depuration (Fig. IV.1(c,d)). However, the excretion processes (k₂ = 0.090, p<0.001) never made it possible to recover the initial state: only 60% and 53% of the accumulated Pb was released from the viscera and the foot, respectively. For Zn, even if the shape of the curve suggested that elimination occurred (Fig. IV.1(e,f)), no significant

excretion rates were modelled over the duration of the experiment neither in the viscera ($k_2 = 0.027 \text{ d}^{-1}$, $p=0.368$) nor in the foot ($k_2 = 0.025 \text{ d}^{-1}$, $p=0.336$) (Table 3).

IV.3.2. Metal distribution and internal fractionation (Experiment 2)

The partitioning of metals between the tissues of the snails exposed to the ME4 field contaminated soil is depicted in Fig. IV.2. At the beginning of the experiment, the viscera (27% of the total soft tissue dry weight) were found to contain most of the metal body content with 61% of Cd, 42% of Pb and 69% of Zn (Fig. IV.2). Over the exposure phase, the percentage of metal retained in the viscera increased by a factor of 2.1, 1.4 and 1.2 for Pb, Cd and Zn, respectively. The foot (60% of the total soft tissue dry weight) contained initially about 20% of the body content of all the metals, this proportion decreasing with the exposure time. The epithelial cells of the gut (13% of the total soft tissue dry weight) played a substantial role in the Cd and Pb distribution while it accounted for less than 10% in the Zn distribution. During the depuration phase, Cd and Zn distribution remained about the same (Fig. IV.2(a,c)). On the other hand, the Pb proportion shifted from the viscera to the foot and the gut tissue (decrease of 7%) (Fig. IV.2(b)).

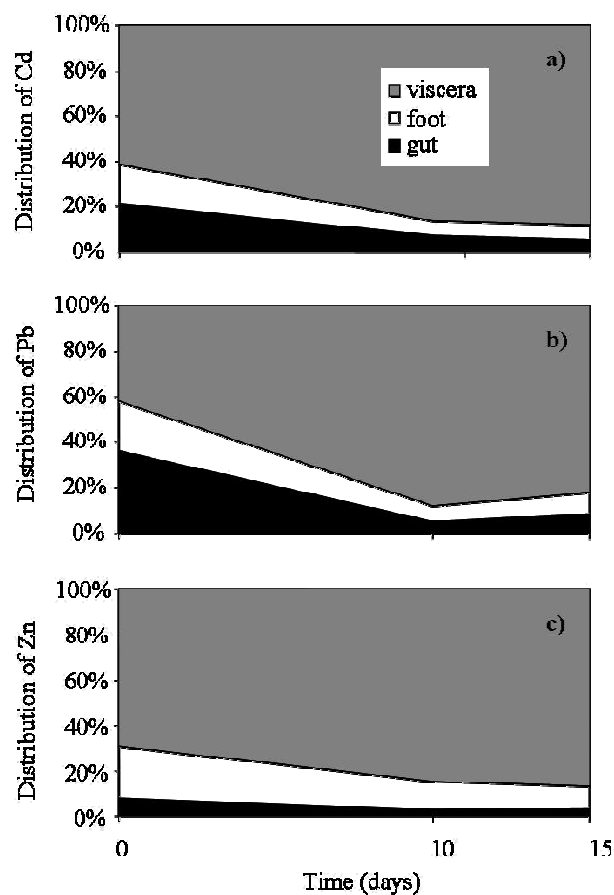


Figure IV.2. Distribution (cumulative percentage) of Cd (a), Pb (b) and Zn (c) in the viscera, the foot and the gut of *Helix aspersa* snails during the exposure (10 days) and the depuration (5 days) phases.

In addition to the metal tissue distribution, Cd, Pb and Zn body burdens were monitored during the accumulation and depuration phases in the different subcellular fractions (C, D and E) of the gut tissue, the foot and the viscera (Fig. IV.3 to IV.5). As no specific patterns of accumulation or elimination were found for OECD-exposed snails, the amounts of metals in the different fractions of the different tissues are not shown in the figures. However, to allow comparison with ME4-exposed snails, we presented (white rectangles in Figs IV.3, IV.4 and IV.5) their proportions related to the total metal content of the tissue.

Cadmium

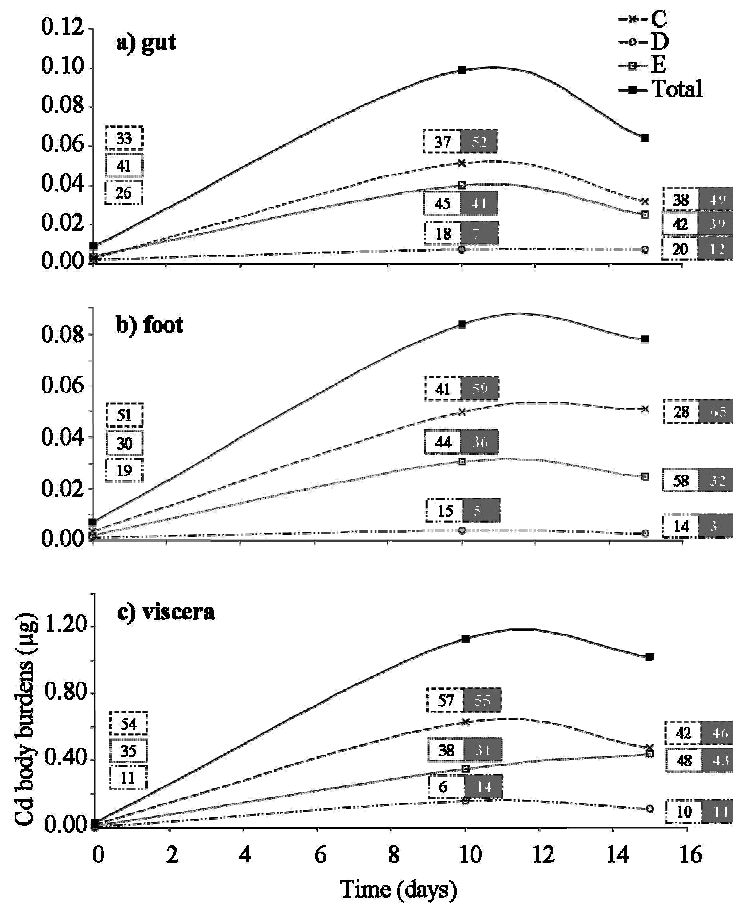


Figure IV.3. Subcellular distribution of Cd in different tissues (a) gut, b) foot and c) viscera) of *Helix aspersa* snails during the exposure to the contaminated field soil (10 days) and the depuration (5 days) phases. C = the cytosolic fraction; D = granular fraction; E = cell debris fraction and Total = the total soft body concentrations obtained by summing all subcellular fractions. Values in the rectangles correspond to the metal proportions (%) present in the different fractions. White rectangles = uncontaminated OECD soil exposed snails; grey rectangles = contaminated field soil exposed snails.

In the gut tissue of snails exposed to the contaminated soil, the cytosol was the main target compartment for the accumulated Cd with +15% in proportion compared to controls

(Fig. IV.3(a)). In the foot, Cd was mainly accumulated in the C fraction with proportions increasing by 18% compared to control (Fig. IV.3(b)). In the viscera, Cd was largely present in the cytosol (55%) as already observed for the foot and the gut tissue. Cd was accumulated in all the subcellular fractions and proportions were close to those observed in controls (Fig. IV.3(c)).

During depuration, in the gut tissue, total Cd body burden slightly decreased, mainly due to losses from the C and D fractions. However, at the end of the depuration phase, Cd proportion retained in the C fraction was still higher in exposed snails than in controls (Fig. IV.3(a)). In the foot, no specific trends of elimination were found for Cd whatever the subcellular compartment (Fig. IV.3(b)). In the viscera, total Cd body burden did not evolve during depuration. The decrease in the cytosolic fraction was compensated by an increase in the E fraction and their proportions still matched up with the controls (Fig. IV.3(c)).

Lead

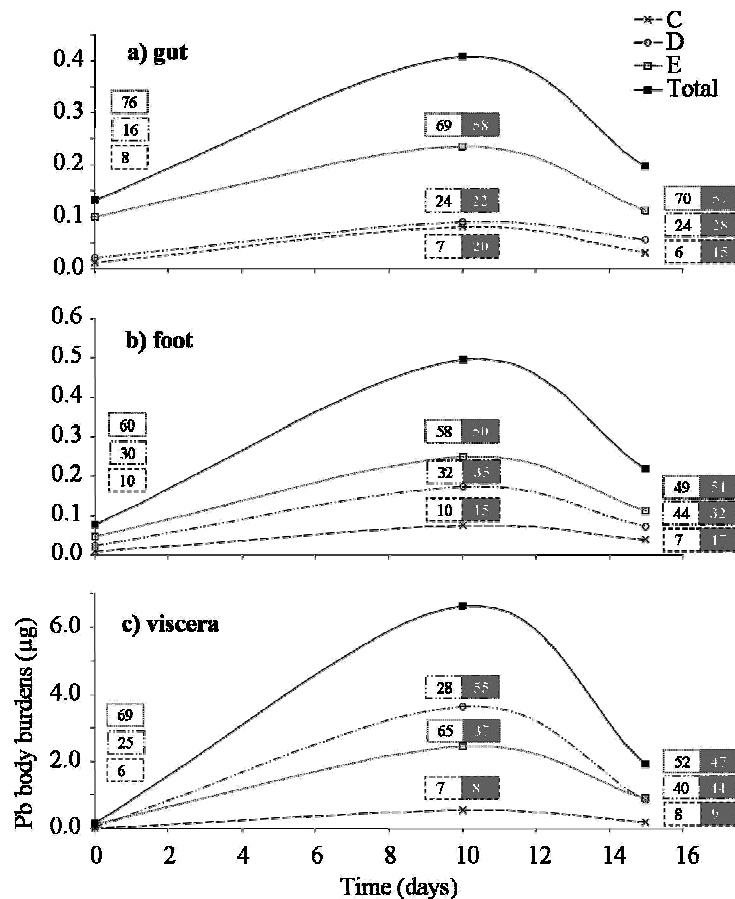


Figure IV.4. Subcellular distribution of Pb in different tissues (a) gut, b) foot and c) viscera) of *Helix aspersa* snails during the exposure to the contaminated field soil (10 days) and the depuration (5 days) phases. C = the cytosolic fraction; D = granular fraction; E = cell debris fraction and Total = the total soft body concentrations obtained by summing all subcellular fractions. Values in the rectangles correspond to the metal proportions (%) present in the different fractions. White rectangles = uncontaminated OECD soil exposed snails; grey rectangles = contaminated field soil exposed snails.

Total Pb body burdens increased in the gut tissue during the accumulation phase. While highly retained in the E fraction, Pb was mainly accumulated in the cytosolic fraction with an increase of 13% in proportion compared to controls (Fig. IV.4(a)). In the foot, no specific subcellular fractions were identified as a sink for the accumulated Pb and proportions remained the same in control and exposed snails (Fig. IV.4(b)). In the viscera, Pb was mostly found in the granular fraction (55%) that appeared as the main target fraction of accumulated Pb with a doubled proportion compared to control (Fig. IV.4(c)).

During the depuration phase, a marked decrease was observed in the total Pb body burden accumulated in the gut tissue and appeared as the outcome of a loss from the C, D and mainly E fractions (Fig. IV.4(a)). In the foot, an important decrease in the Pb body burdens was observed in all the fractions which conserved proportions similar to those exhibited at day 10. A difference had to be noted in comparison with the control snails with -8% in the D fraction and +10% in the C fraction (Fig. IV.4(b)). In the viscera, total Pb body burden dropped off close to its initial level. The amount of Pb trapped in granules reduced by a factor of 3 to reach a final proportion of 44%, corresponding to what was observed in control snails (Fig. IV.4(c)).

Zinc

Proportions of Zn accumulated in the gut tissue did not differ between control and exposed snails: no specific target fractions were identified for the accumulation of this metal in this tissue (Fig. IV.5(a)). In the foot, Zn was mainly retained in the granular fraction with an increase of 11% compared to control (Fig. IV.5(b)). In the viscera, the D and E fractions contained the highest proportions of Zn with 42% and 36%, respectively. Their increase with exposure, compared to control, suggested their affinity for the accumulated Zn (Fig. IV.5(c)).

Zinc body burdens appeared stable during the depuration period and conserved proportions similar to the control (Fig. IV.5(a)). In the foot, even if the total amount of Zn remained almost stable, the granular fraction decreased and proportions became similar to those observed in the non contaminated snails (Fig. IV.5(b)). Total Zn body burdens in the viscera did not change and kept values close to those measured at the end of the exposure phase (about 35 $\mu\text{g Zn}$). The decrease in the D fraction was balanced by an increase in the E fraction leading to a +10% difference in proportion compared to control snails (Fig. IV.5(c)).

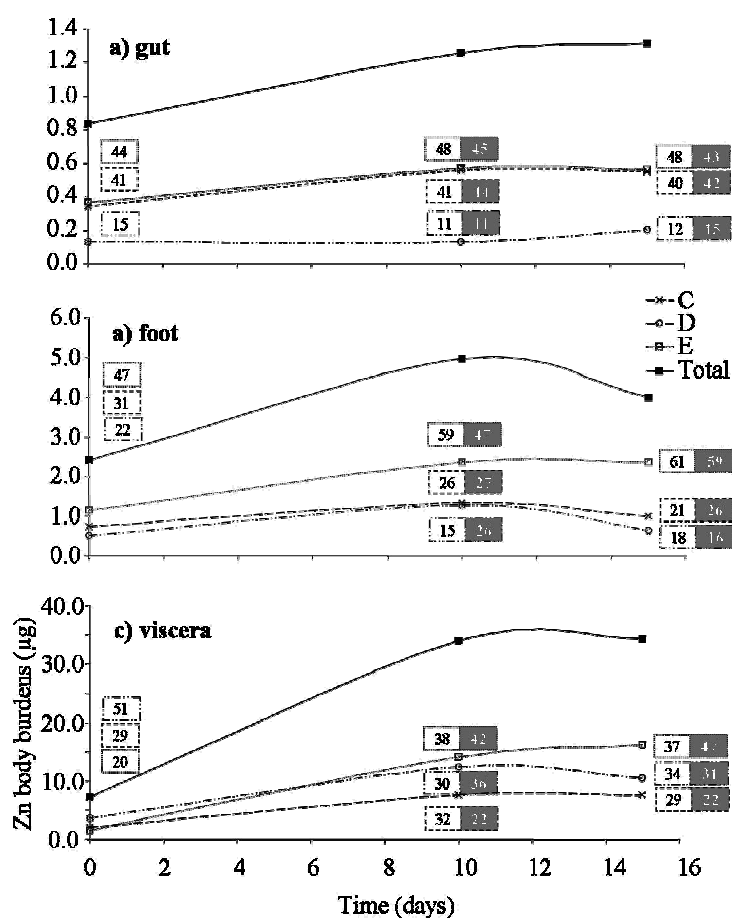


Figure IV.5. Subcellular distribution of Zn in different tissues (a) gut, b) foot and c) viscera) of *Helix aspersa* snails during the exposure to the contaminated field soil (10 days) and the depuration (5 days) phases. C = the cytosolic fraction; D = granular fraction; E = cell debris fraction and Total = the total soft body concentrations obtained by summing all subcellular fractions. Values in the rectangles correspond to the metal proportions (%) present in the different fractions. White rectangles = uncontaminated OECD soil exposed snails; grey rectangles = contaminated field soil exposed snails.

IV.4. Discussion

IV.4.1. The toxicokinetic approach

Most of the accumulation studies carried out with snails have been experiments measuring internal metal concentrations after a defined exposure time, often 28 days as recommended by standardized procedures [16,20,24,30]. In the present work, a long-term experiment was performed over 6 months and metal burdens in snails were monitored at specific time intervals. Significant differences were observed in the uptake fluxes and internal fractionations estimated for each metal. If these differences could be related to differences in Cd, Pb and Zn bioavailability to snails, they also reflect differences in the biological mechanisms of uptake and metabolism for each metal. Once inside the organism, the metal

fate and the achievement of a steady-state are under the dependence of metal specific storage and excretion capacities. We demonstrated here that in *Helix aspersa* snails the steady-state achievement is dependent on the metal considered, as reflected by the different excretion rates modelled for the different metals. The absence of elimination of Cd led to a linear uptake curve, the low elimination of Zn led to a curve tending towards a steady-state (not achieved within the 84 days of exposure) and the high elimination of Pb led to a steady state in body burden after 42 days of exposure. During the depuration phase, similar (in comparison with those of the exposure phase) excretion rates were estimated for Cd and Zn, underlining respectively the absence or the very slow excretion of these metals over the depuration phase duration. In contrast, the Pb excretion rate was higher during the depuration phase than during accumulation, highlighting the presence of easily removable forms of Pb. Nevertheless, a large part of the accumulated Pb (about 40%) was stored in the long-term in the organisms (viscera and foot). For Cd and Zn, similar results were found in the midgut gland of adults *Helix pomatia* snails fed with contaminated lettuce during 32 days and followed by a 50 days period of depuration (uncontaminated lettuce) [31]. The authors did not observe Pb excretion in *H. pomatia* but other researchers had noted a rapid loss of Pb in *Cepaea hortensis* snails [32]. However, quantitative comparison of the uptake and excretion rate constants to literature data is difficult since no toxicokinetic experiments have been carried out with terrestrial gastropods and since sources (food or soil) and routes (oral or dermal) of contamination may change between soil dwelling organisms. However, for instance, Spurgeon and Hopkin [7] found, in *Eisenia fetida* exposed for 42 days to a highly contaminated field soil (44, 3100 and 7310 mg.kg⁻¹ for Cd, Pb and Zn, respectively), uptake fluxes of 0.026, 5.56 and 2.44 µg.d⁻¹ for Cd, Pb and Zn, respectively. From the results of Vijver et al. [33], where adults isopods *Porcellio scaber* were exposed for 14 days to a field contaminated floodplain soil (12.6 and 2223 mg.kg⁻¹ for Cd and Zn, respectively), it was possible to calculate uptake fluxes of 0.03 and 4.55 µg.d⁻¹ for Cd and Zn, respectively. Taking into account the metal levels in soil (as a single source of contamination), these values appeared overall lower than the present ones determined for whole snails (a = 0.063, 1.390 and 7.537 µg.d⁻¹ for Cd, Pb and Zn, respectively). This comparison emphasises that the uptake flux incorporates not only the characteristics of the metal and the soil but also the behaviour and the physiology of the organism.

IV.4.2. Subcellular partitioning for understanding metal trafficking through the body

The measurement of the relative distribution of metal between the viscera, the foot and the gut revealed that the viscera accounted for most of the accumulated metals in the soft tissues with proportions reaching more than 85% after 10 days of exposure to the contaminated soil. The presence of the digestive gland in the viscera explains these results since this organ serves as the main site of metal accumulation in gastropod molluscs [31,34]. The foot and the gut tissue fairly contained the rest of the accumulated Cd and Pb while the role of the gut tissue in the Zn storage was limited (only 4%). The shell did not appear as a sink for the metals studied and their sequestration in this compartment did not affect the soft tissue concentrations in the time frame of the experiment. All these proportions were in agreement with the results of Coughtrey and Martin [34] in *H. aspersa* sampled in a contaminated area and those of Berger and Dallinger [35] in *Arianta arbustorum* after 10 days of exposure to contaminated food.

When a metal first enters the body after uptake either from ingestion or from diffusion through the foot epithelium, it will initially be metabolically available. If uptake goes on, both essential metals in excess of metabolic requirements and non-essential elements must be detoxified either via excretion or via storage in soluble or insoluble forms to prevent their diffusion to tissues where they can interfere with biochemical reactions [3]. During the accumulation phase, Cd was mainly found in the cytosolic fraction whatever the tissue considered. Chabicovsky et al. [14] demonstrated the induction of a cadmium-metallothionein isoform (Cd-MT) in the cytoplasm of all cell types of hepatopancreatic lobuli (calcium, digestive and excretory cells), in the epithelial cells of the gut and in the muscle cells of the foot of *H. pomatia* snails fed with metal-enriched lettuce. It is therefore possible to assume that, within the C fraction, Cd was strongly bound to such proteins, which is in agreement with the absence of toxic effects observed on both growth and reproduction after snail exposure to this contaminated soil [36]. Cytosolic Zn-binding ligands already isolated in snails (Cd-MT and nonmetallothionein components) [15] may explain the substantial proportions of accumulated Zn observed in the C fraction, particularly in the gut tissue (45%). In the foot and the viscera, high proportions of accumulated Zn were found in the granular (D) fraction. The transition from Zn bound to soluble proteins in the cytosol of cell gut to Zn sequestered in granules in the foot and the viscera was in accordance with the intracellular detoxification ways described in invertebrates [37]. The data obtained for Pb suggested that its incorporation in granules differed from that of Zn. In agreement with our results, previous

studies in the digestive gland of *H. pomatia* snails showed that 50-80% of the accumulated Zn was associated with pyrophosphates granules while 90% of the Pb was found to be accumulated in cell debris (lysosomes) and lipofuscin granules [13]. If, during exposure, different reactive ligands may be induced or metabolized, they may also be excreted. The difference between these two processes ultimately determines the final concentration of the metal in the cellular compartments [1]. During the depuration phase, a slight Cd loss was observed only in the gut tissue. Concerning the cytosolic fraction, this release could represent an excretory pathway for Cd via faeces involving the extrusion of residual bodies (lysosomes) to the gut lumen [15,31]. However, this release only represented less than 3% of the total accumulated Cd in the exposed snails and Cd appeared stored in the long-term in organisms. The absence of Cd excretion in the main storage tissues (i.e. the viscera) may be related to the slow Cd-MT turnover and to the high possibilities of re-sequestration to MT [38]. This lack of elimination explains the linear pattern of accumulation observed for Cd and the body burden still elevated, even after a prolonged depuration phase. For Pb, a decrease of the body burden was observed during the depuration phase in all the tissues and subcellular fractions. In the viscera, containing 88% of the accumulated Pb, the elimination concerned mainly the granular fraction, highlighting the snail abilities to excrete these insoluble storage forms, as reported for other terrestrial invertebrates [15,37,39]. This phenomenon appeared to be relatively fast since the granular compartment was almost emptied at the end of the 5 days-depuration phase. However, significant levels of Pb remained in the snails, apparently retained in the cell debris fraction. The existence of a steady-state in body burden during depuration underlined the biphasic elimination of Pb in *H. aspersa* snails. For Zn, no specific trend of elimination was found over the depuration phase duration in total Zn body burdens. However, the interesting balances involving cell debris and granular fractions confirmed the importance of the lysosomal transition between cytosolic and granular Zn observed during the exposure phase. This phenomenon may also explain the very low and slow excretion of Zn which, in contrast with Pb, did not lead to steady-state, neither during exposure nor during depuration.

IV.5. Conclusion

This study provides original information to understand fluxes of three trace metals in snails. Whereas accumulation patterns in foot and viscera have similar shape, the magnitude of accumulation is higher in the viscera that have thus to be preferably analysed to understand accumulation in *Helix aspersa* snails. One-compartment models are suitable to describe the

quite different metal kinetics in snails both for linear (Cd), sub-linear (Zn) and non-linear (Pb) uptake patterns. From the results, it is obvious that distinction into essential or non-essential character of a metal cannot fully explain accumulation or elimination patterns. The cytosolic fraction is responsible for the linear accumulation pattern while the granular fraction is involved in excretion processes leading to non-linear patterns. Based on these results, accumulation and elimination kinetics of metals but also by extension the related biological effects can be explained by the partitioning of metals inside organisms and their internal sequestration and (eco)toxicological significance.

Acknowledgements

The authors thank C. Lovy, N. Crini (LBE) and S. Pison (RIVM) for technical assistance. This work was supported by grants from the Conseil Régional of Franche-Comté, the ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, contracts n°01 75037 and n° 0572 C0058) and the ANR (Agence Nationale de la Recherche, STARTT programme within the national programme ECosphere COntinentale coordinated by the Institut des Sciences de l'Univers of the CNRS, contract n° ANR-05-ECC0-004).

References

1. Rainbow P.S. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ Pollut* 120:497-507.
2. Peijnenburg W.J.G.M., Posthuma L., Eijsackers H.J.P., Allen H.E. 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotox Environ Safe* 37:163-172.
3. Rainbow P.S. 2007. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environ Int* 33:576-582.
4. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) 1996. Test No. 305: Bioconcentration: Flow-through fish test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* 1:1-23.
5. Janssen M.P.M., Bruins A., de Vries T.H., van Straalen N.M. 1991. Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch Environ Contam Toxicol* 20:305-312.

6. Peijnenburg W.J.G.M., Posthuma L., Zweers P.G.P.C., Baerselman R., de Groot A.C., van Veen R.P.M, Jager, T. 1999. Prediction of metal bioavailability in Dutch field soils for the Oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Ecotox Environ Safe* 43:170-186.
7. 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.
8. van Straalen N.M., Donker M.H., Vijver M.G., van Gestel C.A.M. 2005. Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environ Pollut* 136:409-417.
9. Gimbert F., de Vaufleury A., Douay F., Scheifler R., Coeurdassier M., Badot P.M. 2006. Modelling chronic exposure to contaminated soil: a toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environ Int* 32:866-875.
10. McMillen S.J., van Gestel C.A.M., Lanno R.P., Linder G.L., Pauwels S.J., Stephenson G.L. 2003. Biological measures of bioavailability. In: Lanno R.P. (Ed.), Contaminated soils: from soil-chemical interactions to ecosystem management. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, FL, USA, pp 293-343.
11. Vijver M.G., van Gestel C.A.M., Lanno R.P., van Straalen N.M., Peijnenburg W.J.G.M. 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environ Sci Technol* 38:4705 -4712.
12. Vijver M.G., van Gestel C.A.M., van Straalen N.M., Lanno R.P., Peijnenburg W.J.G.M. 2006. Biological significance of metals partitioned to subcellular fractions within earthworms (*Aporrectodea caliginosa*). *Environ Toxicol Chem* 25:807-14.
13. Dallinger R., Wieser W. 1984. Molecular fractionation of Zn, Cu, Cd and Pb in the midgut gland of *Helix pomatia* L. *Comp Biochem Physiol* 79C:125-129.
14. Chabicoovsky M., Niederstätter H., Thaler R., Hödl E., Parson W., Rossmannith W., Dallinger R. 2003. Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicol Appl Pharm* 190:25-36.
15. Dallinger R. 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Dallinger R., Rainbow P.S. (Eds), Ecotoxicology of Metals in Invertebrates. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp 246-289.
16. de Vaufleury A., Coeurdassier M., Pandard P., Scheifler R., Lovy C., Crini N., Badot P.M. 2006. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environ Toxicol Chem* 25:797-806.

17. Regoli F., Gorbi S., Fattorini D., Tedesco S., Notti A., Machella N., Bocchetti R., Benedetti M., Piva F. 2006. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: An integrated approach. *Environ Health Persp* 114:63-69.
18. Beeby A, Richmond L. 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators* 1:261-270.
19. Gomot-de Vaufleury A., 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotox Environ Safe* 46:41-50.
20. ISO 2006. Standard 15952. Soil quality. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
21. Baize D., Girard M.C. (coord.), Hodgson J.M., Eskenazi N.R., Baize D. (trans.) 1998. A Sound Reference Base for Soils: The "Référentiel Pédologique". INRA Editions, Versailles, France.
22. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) 1984. Test No. 207: Earthworm acute toxicity tests. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* 1:1-9.
23. 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. *Sci Total Environ* 178:21-28.
24. Coeurdassier M., Gomot-de Vaufleury A., Lovy C., Badot P.M. 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotox Environ Safe* 53:425-431.
25. Wallace W.G., Lee B.G., Luoma S.N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar Ecol Prog Ser* 249:183–197.
26. Moriarty F 1983. *Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems*, Academic Press, London, UK.
27. Spacie A., Hamelink J.L. 1985. Bioaccumulation. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (Eds), *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Corp., Washington, USA, pp 495-525.
28. Lindstrom M.J., Bates D.M. 1990. Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics* 46:673-687.
29. R Development Core Team 2005. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

30. Gomot A., Pihan F. 2002. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: metal bioavailability and bioaccumulation. *Environ Toxicol Chem* 21:820-827.
31. Dallinger R., Wieser W. 1984. Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd, and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comp Biochem Physiol* 79C:117-124.
32. Williamson P. 1980. Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepaea hortensis* Müller. *Oecologia* 44:213-220.
33. Vijver M.G., Vink J.P.M., Jager T., van Straalen N.M., Wolterbeek H.T., van Gestel C.A.M. 2006. Kinetics of Zn and Cd accumulation in the isopod *Porcellio scaber* exposed to contaminated soil and/or food. *Soil Biol Biochem* 38:1554-1563.
34. Coughtrey P.J., Martin M.H. 1977. The uptake of lead, zinc, cadmium and copper by the pulmonate mollusc, *Helix aspersa* Müller, and its relevance to the monitoring of heavy metal contamination of the environment. *Oecologia* 27:65-74.
35. Berger B., Dallinger R. 1989. Accumulation of cadmium and copper by the terrestrial snail *Arianta arbustorum* L.: kinetics and budgets. *Oecologia* 79:60-65.
36. Gimbert F., de Vaufleury A., Douay F., Coeurdassier M., Scheifler R., Badot P.M. 2007. Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life cycle experiment. *Ecotox Environ Safe*, in press.
37. Hopkin S.P. 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*, Elsevier Applied Science, London, UK.
38. Bebianno M.J., Langston W.S. 1998. Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*. *Talanta* 46:301-313.
39. Simkiss K., Jenkins K.G.A., McLellan J., Wheeler E. 1982. Methods of metal incorporation into intracellular granules. *Experientia* 38:333-335.

*Résultats complémentaires*Comparaison des cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd, Pb et Zn chez *Helix aspersa* : concentrations vs quantités.

En complément des résultats exposés précédemment, nous présentons ici les cinétiques d'accumulation et d'élimination du Cd, du Pb et du Zn exprimées en concentrations ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc. MS) afin d'obtenir une image plus large des répercussions de la croissance des organismes sur les transferts des ETM.

Les concentrations internes dans les escargots exposés au sol témoin (OECD) n'ont jamais excédé 1, 16 et 230 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Cd, Pb and Zn, respectivement dans les viscères et 0,2 , 3 et 46 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de Cd, Pb et Zn respectivement dans le pied.

Les trois ETM étudiés présentent des patterns d'accumulation très contrastés (Figure IV.6). Les concentrations internes en Cd augmentent avec le temps d'exposition : dans les viscères, un état d'équilibre est atteint après environ 14 jours d'exposition au sol contaminé (Figure IV.6(a)) alors que dans le pied, l'accumulation reste linéaire jusqu'à la fin de la phase d'exposition (Figure IV.6(b)). Pour le Pb et le Zn, le comportement interne du Pb et du Zn est similaire dans les viscères et dans le pied avec un pattern d'accumulation caractérisé par une augmentation temporaire des concentrations internes au cours des premiers jours de la phase d'exposition (de 10 à 100 $\mu\text{g Pb}\cdot\text{g}^{-1}$ et de 200 à 600 $\mu\text{g Zn}\cdot\text{g}^{-1}$) et immédiatement suivie par une rapide diminution ramenant, à la fin de la phase d'exposition, les concentrations internes à des valeurs proches de l'état initial.

Pour traduire mathématiquement ces différentes cinétiques deux modèles ont été utilisés, un pour le Cd (Eq. (1), Chapitre II) et un autre pour le Pb et le Zn (Eq. (2), Widianarko et van Straalen, 1996).

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

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

où $C_{sn}(t)$ est la concentration interne dans les escargots ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc. MS) au temps (t), k_2 est le taux d'excrétion (j^{-1}), a est le flux d'absorption ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}\text{esc MS}\cdot\text{j}^{-1}$) qui est égal à $k_1 \cdot C_e$ avec k_1 , le taux d'absorption ($\text{g}_{\text{sol}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc. $\text{MS}\cdot\text{j}^{-1}$) et C_e , la concentration externe en ETM

biodisponible dans le sol ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ sol MS). Comme les escargots ont grandi au cours de la phase d'exposition,

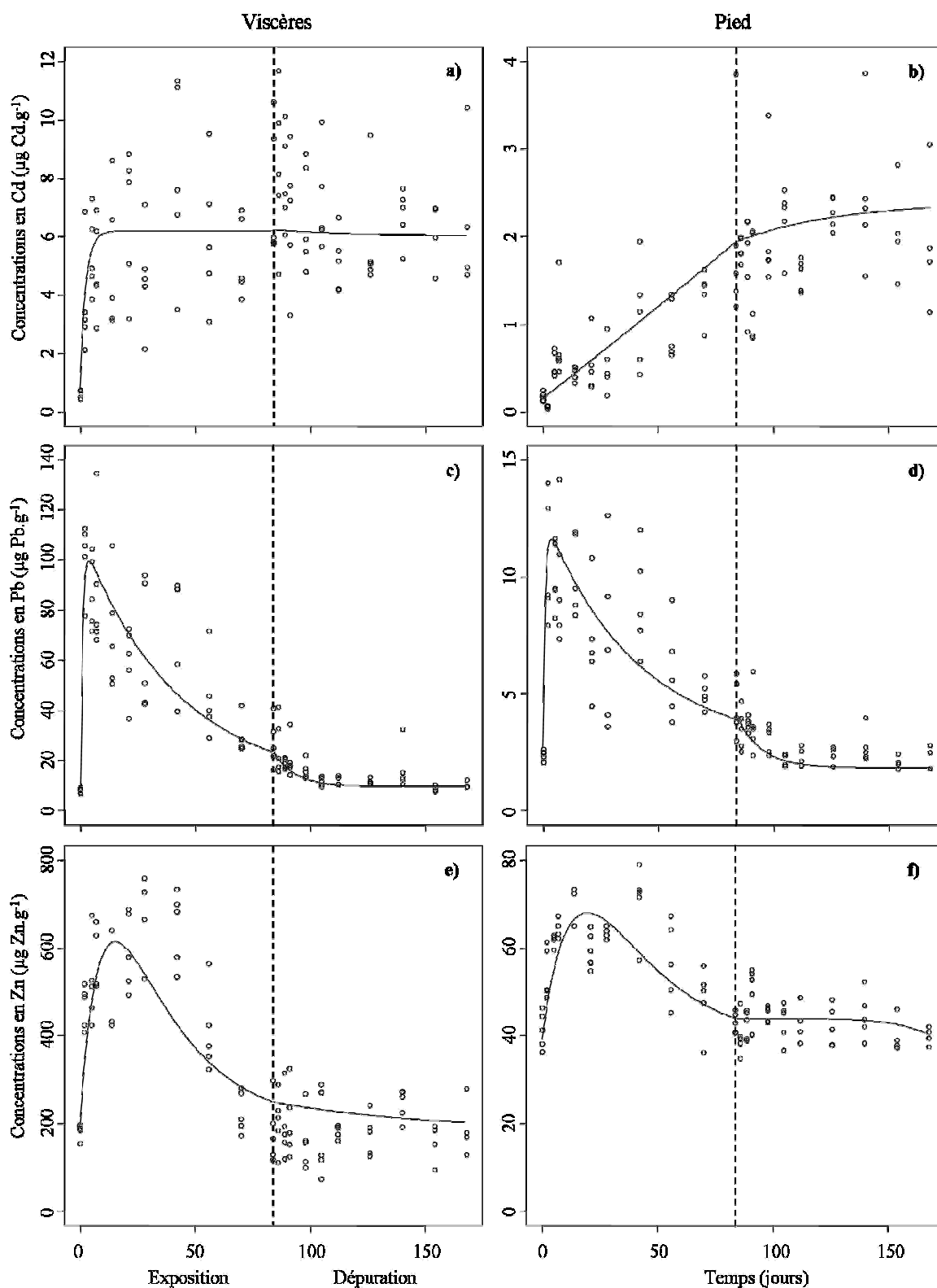


Figure IV.6. Évolution temporelle des concentrations internes en Cd (a, b), du Pb (c, d) et du Zn (d, e) dans les viscères et le pied des escargots exposés au sol contaminé. Chaque point représente un escargot.

un taux de croissance spécifique, k_g (j^{-1}), obtenu à partir de l'ajustement du modèle de Gompertz sur les données de croissance (Chapitre 3), a été inclus dans le modèle. Ce paramètre (évalué sur les masses sèches) est égal à 0,035 et 0,049 j^{-1} respectivement pour les viscères et le pied.

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

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

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

Ces modèles ont été ajustés aux données individuelles d'accumulation et d'élimination. Les paramètres estimés sont donnés dans les Tableaux IV.4 et IV.5.

Tableau IV.4. Estimation des paramètres cinétiques de l'accumulation du Cd, du Pb et du Zn dans les escargots exposés au sol contaminé sur la base de leurs concentrations internes (C_{sn}).

	Mesuré	Estimés par les modèles						r^2	Modélisés	
		$C_{sn}(84) (\pm IC)$ $\mu g \cdot g DM_{sn}^{-1}$	a $\mu g_{ETM} \cdot g^{-1} esc MS \cdot j^{-1}$	min/max	p-value	k_2 d^{-1}	min/max			p-value
Viscera	Cd	6.35 ± 1.31	2.122 ^a	1.076/3.168	0.000	0.354 ^a	0.140/0.568	0.002	0.479	6.07
	Pb	27.03 ± 9.40	133.1 ^b	20.6/245.6	0.028	1.168 ^a	0.077/2.260	0.045	0.502	21.53
	Zn	191.68 ± 71.78	153.8 ^b	136.1/171.6	0.002	0.107 ^{ab}	0.074/0.139	0.001	0.626	240.30
Foot	Cd	1.98 ± 1.08	0.024 ^a	0.010/0.037	0.001	-0.050 ^a	-0.067/-0.033	<0.001	0.572	1.83
	Pb	4.39 ± 1.19	5.522 ^b	4.055/6.989	0.000	0.293 ^b	0.146/0.439	<0.001	0.517	2.90
	Zn	42.95 ± 2.33	53.65 ^c	25.53/81.76	0.015	0.058 ^c	0.043/0.073	<0.001	0.519	45.60

Les valeurs minimum et maximum sont les intervalles de confiance (IC) à 95%. Les valeurs présentant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les valeurs négatives des taux d'excrétion (k_2), bien qu'utilisées pour le calcul des C_{sn} modélisées, n'ont pas de réalité biologique et doivent être considérées comme nulles.

Les modèles décrivent convenablement l'accumulation des ETM dans les escargots comme le montrent les coefficients de détermination (r^2) et les faibles différences entre les concentrations internes mesurées et calculées à la fin de la phase d'exposition. Dans les viscères, le flux d'absorption (a) du Cd est très inférieur à ceux du Pb et du Zn (Tableau IV.4). Le taux d'excrétion (k_2) du Cd n'est pas significativement différent de celui du Pb mais

significativement inférieur à celui du Zn. Dans le pied, les flux d'absorption sont significativement différents entre les trois ETM, la plus faible valeur étant attribuée au Cd et la plus importante au Zn. Dans cet organe, aucun taux d'excrétion n'a été estimé pour le Cd, expliquant son accumulation linéaire (Figure IV.6(b)). Des valeurs positives significatives ont été évaluées pour les autres ETM avec des valeurs de 0,293 et 0,058 j^{-1} pour le Pb et le Zn, respectivement (Tableau IV.4).

Au cours de la phase de dépuración, le Cd n'est pas éliminé des viscères et du pied et les concentrations internes conservent des valeurs proches de 6 et 2 $\mu g Cd.g^{-1}$, respectivement (Figure IV.6(a, b)). Ce comportement est reflété par les taux d'excrétion estimés par le modèle comme non significativement différents de zéro dans les viscères ($p=0,935$) et dans le pied ($p=0,698$) (Tableau IV.5). Les concentrations internes en Pb diminuent significativement ($k_2= 0,109$ et $0,095 d^{-1}$ dans les viscères et le pied, respectivement) pour atteindre de valeurs proche de l'état initial à la fin de la phase de dépuración. Pour le Zn, aucun taux d'excrétion significatif n'a été estimé par le modèle. Les concentrations internes se stabilisent autour de 200 et 40 $\mu g Zn.g^{-1}$ dans les viscères et dans le pied, respectivement (Figure IV.6(d, e))

Tableau IV.5. Estimations des paramètres cinétiques de l'élimination du Cd, du Pb et du Zn des escargots précédemment exposés au sol contaminé.

		Mesurées		Modélisés				r^2	
		$C_{sn}(168) (\pm IC)$ $\mu g.g DM_{sn}^{-1}$	k_2	min/max d^{-1}	p-value	C_{mr} $\mu g.g DM_{sn}^{-1}$	min/max		p-value
Viscera	Cd	6.49 ± 1.55	0.029 ^a	-0.645/0.703	0.935	6.29	4.14/8.43	0.000	0.024
	Pb	10.22 ± 1.24	0.109 ^b	0.042/0.176	0.003	11.83	9.79/13.88	0.000	0.468
	Zn	189.00 ± 63.25	0.018 ^a	-0.405/0.442	0.933	193.57	37.08/350.07	0.022	0.004
Foot	Cd	1.94 ± 0.80	0.022 ^a	-0.880/0.133	0.698	2.26	1.03/3.49	0.001	0.053
	Pb	2.38 ± 0.42	0.095 ^b	0.040/0.150	0.002	2.29	1.95/2.64	0.000	0.479
	Zn	39.93 ± 1.96	-0.074 ^a	-0.291/0.143	0.516	42.96	42.84/43.07	0.000	0.044

Les valeurs minimum et maximum sont les intervalles de confiance (IC) à 95%. Les valeurs présentant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes. Les valeurs négatives des taux d'excrétion (k_2) n'ayant pas de réalité biologique doivent être considérées comme nulles.

La comparaison des Tableaux IV.3 et IV.5 permet de voir qu'à la fois les concentrations et les quantités sont utilisables pour l'estimation des taux d'excrétion durant la phase de dépuración. Par contre, l'augmentation de la masse des animaux et l'effet dilution des concentrations lors de la phase d'exposition empêchent d'utiliser indifféremment l'une ou l'autre des unités. Si la somme de l'excrétion et de la dilution par la croissance est supérieure à l'absorption, alors les concentrations internes diminueront, comme cela a été observé pour

le Pb et le Zn. Si ces processus s'équilibrent, les concentrations internes atteindront un plateau, comme cela fut le cas avec le Cd dans les viscères. Si l'absorption reste supérieure, l'accumulation sera linéaire comme observé, sur la durée d'exposition considérée, pour le Cd dans le pied.

Ainsi les concentrations, en pondérant les quantités accumulées par la masse de l'organisme, peuvent masquer une partie des informations. L'observation de la Figure IV.6(c, d, e et f) pourrait en effet conduire à la conclusion que la majorité du Pb et du Zn accumulée en début d'exposition est éliminée à la fin de la phase d'exposition. Cependant, la Figure IV.1 montre bien que des quantités importantes sont encore présentes dans les organismes même après 84 jours de dépuración. Si les concentrations totales accumulées dans un tissu, et en particulier dans l'hépatopancréas, peuvent être liées à une toxicité (concepts de "Critical Body Residues, CBR, ou de "lethal body concentration", LBC, McCarty et Mackay, 1993 ; van Straalen, 1996 ; Lanno et al., 1998), les quantités, elles, informent sur les charges en ETM transférables dans les réseaux trophiques. Les deux unités sont donc à considérer car elles apportent des images complémentaires des mécanismes physiologiques qui régissent les transferts des ETM dans des organismes en croissance.

Chapitre V

Aspects cinétiques et dynamiques du transfert sol-plante –escargot du cadmium *in situ*.

Cette expérimentation a fait l'objet d'un article accepté pour publication dans la revue *Environmental Pollution*. Les auteurs sont Frédéric Gimbert, Michel Mench, Michaël Coeurdassier, Pierre-Marie Badot et Annette de Vaufleury.

Résumé

L'utilisation pertinente de la bioaccumulation pour l'évaluation de la qualité de l'environnement nécessite de prendre en considération les aspects cinétiques et dynamiques des flux en polluants dans les organismes. Les cinétiques d'accumulation du Cd dans une chaîne alimentaire sol-plante-escargot ont ainsi été étudiées sur le terrain pour différentes contaminations du sol, différents pH et deux saisons. Permettant une évaluation précise et sensible des transferts de Cd à l'escargot, la toxicocinétique apparaît comme un outil intéressant pour l'amélioration des procédures d'évaluation du risque et pour quantifier la biodisponibilité du Cd pour une cible définie. Les escargots se sont avérés suffisamment sensibles à la contamination de l'environnement pour discriminer des contaminations modérées du sol. Le pH du sol n'apparaît pas, aux valeurs étudiées, comme un paramètre modulant le transfert de Cd du sol à l'escargot, alors que la saison, en influençant leur masse, peut modifier les concentrations internes. Ces résultats constituent des informations importantes pour une utilisation rationnelle des escargots en biosurveillance de l'environnement.

Kinetic and dynamic aspects of soil-plant-snail transfer of cadmium in the field.

Abstract

The proper use of bioaccumulation in the assessment of environmental quality involves accounting for chemical fluxes in organisms. Cadmium (Cd) accumulation kinetics in a soil-plant-snail food chain were therefore investigated in the field under different soil contamination (from 0 to 40 mg.kg⁻¹), soil pH (6 and 7) and season. Allowing for an accurate and sensitive assessment of Cd transfer to snails, toxicokinetic appears an interesting tool in the improvement of risk assessment procedures and a way to quantify metal bioavailability for a defined target. On the basis of uptake fluxes, snails proved to be sensitive enough to distinguish moderate soil contaminations. The soil pH did not appear, in the range studied, as a modulating parameter of the Cd transfer from soil to snail whereas the season, by influencing the snail mass, may modify the internal concentrations. The present data specifying a time integrated assessment of environmental factors on metal bioavailability and transfer to terrestrial snails should ensure their rational use in environmental biomonitoring.

V.1. Introduction

Generally, biological indicators can be defined as species which reflect the condition or state of the environment in which they thrive (Spellerberg, 2005). Their use for the assessment of ecosystem quality has a long history in both aquatic (Phillips, 1977) and terrestrial (Eijsackers, 1983) environments. For contaminants such as trace metals, the concept of sentinel species (Goldberg et al., 1983; Beeby, 2001) is based on an expected quantitative or semi-quantitative relationship between the metal concentration in the animal's tissues and the metal detected in the environment. If this relation exists, it is dependent on a cascade of matrix-related, species-related, and metal-related issues that condition the contaminant bioaccessibility and bioavailability (Peijnenburg and Jager, 2003). If a contaminant or element is measured inside an organism, it is bioavailable. In this article, we define the bioavailable pool as the part of the total amount of a chemical present in a specific environmental compartment that, within a given time span, is either available or can be made available for assimilation by organisms, from either the direct surrounding of the organism

and/or by ingestion of food. On the basis of sublethal toxicity of zinc on isopods, van Straalen et al. (2005) suggested likewise that the flux of uptake can be used as an indicator to quantify metal bioavailability for soil invertebrates. It serves this purpose better than the internal concentration that depends not only on uptake but also on elimination and storage capacities, processes which are controlled by the organism, not by the substance in the medium and its bioavailability (van Straalen et al., 2005). The wide application of this indicator goes through its validation on a suite of test species. As a first attempt, toxicokinetic modelling applied to the terrestrial snail *Helix aspersa* provided information concerning the soil cadmium bioavailability assessed by uptake fluxes (Gimbert et al., 2006). Among the soil fauna, these pulmonate gastropods integrate soil and vegetation contamination and have been used for active biomonitoring studies, leading to the development of microcosm devices (Gomot-de Vaufleury and Pihan, 2000; Scheifler et al., 2003). In these experiments, calibrated (origin, age, size) animals were exposed to contaminated environment in microcosms set up in the field. After a defined exposure period (4 weeks), organisms were analyzed to assess metal bioavailability and transfer from soil to snails. However, for its relevant implementation in ecological risk assessment, bioavailability should be handled as a dynamic process accounting for chemical fluxes in organisms and their time dependency (Peijnenburg et al., 1997; McMillen et al., 2003).

This work aimed to study the soil-plant-snail transfer kinetics of cadmium (Cd) in order to estimate uptake fluxes and to characterize the environmental risk represented by Cd-contaminated soils. Furthermore, we investigated the snail sensitivity to the influence of environmental factors such as the Cd concentration in the exposure source (here a series of soils from a long-term field experiment with the same texture and only contaminated by Cd), the soil pH, and the season.

V.2. Materials and Methods

V.2.1. Animals

Five hundred and forty juvenile snails, *Helix aspersa aspersa* Müller, 1774 (also called *Cornu aspersum* or *Cantareus aspersus aspersus*), were used in this experiment. They were obtained from our laboratory breeding and reared under optimal conditions (Gomot-de Vaufleury, 2000) until the age of one month. At this stage, snail fresh mass was 0.93 ± 0.11 g as recommended in the standard ISO 15952 (2006).

V.2.2. Field experimental design

The experiment was carried out on the long-term AGIR field plots managed by the former Agronomy Unit (INRA, Bordeaux, France). Soil (Arenic Udifluent, Baize et al., 1998) was contaminated between 1988 and 1990 with Cd(NO₃)₂ to reach theoretical concentrations of 0, 20 and 40 mg Cd.kg⁻¹ soil, dry mass (DM). Plot soils also presented a natural pH gradient from 6 to 7. As presented in Table V.1, the plot nomenclature considers the soil pH (6 or 7) and the Cd soil contamination (L for low, M for moderate or H for high). Cover vegetation was of grassland type (*Poa trivialis*, *Trifolium pratense*, *Ranunculus repens* and *Holcus lanatus*) with an annual reaping. At the beginning of the experiment (year 14 after the last Cd application in soils), soils were sampled (0-20 cm) with a stainless spade, air-dried, sieved (<2 mm), homogenized and stored at room temperature in clean plastic cans until analyses. At the same time, plant (shoots, i.e. leaves and stems) samples (3 in spring and 1 in autumn) were taken and oven dried (60°C) prior to their analyses.

Three replicate stainless steel microcosms (diameter 0.25 m, 0.25 m high) were randomly placed on each plot (6 m × 3m). Fifteen snails were introduced in each microcosm (in order to be able to collect 2 snails per microcosm at each sampling time, and accounting for possible natural mortality). In the microcosms, snails were exposed to soil contamination by both dermal (diffusion through the foot epithelium) and digestive routes (soil particles and plants) (Coeurdassier et al., 2002; Scheifler et al., 2006). A stainless steel netting (mesh size: 10 mm) was fitted over the microcosm top to avoid snail escape and to protect them against predators. Two exposure periods were realized, in spring and autumn 2004. Two individuals were randomly sampled in each microcosm after 0, 7, 17, 25, 40 and 56 days during spring and after 0, 13, 21, 28 and 49 days during autumn. The initial density of 34 snails.m⁻² avoided crowding effects during the experiment (Dan and Bailey, 1982).

V.2.3. Analytical procedures

Sampled snails were placed in clean containers for a 48h-fasting- period (the faeces were removed after 24h to prevent their ingestion). Then, the snails were weighed, sacrificed by freezing and stored at -70°C until their analysis. After thawing, the whole soft body was removed from the shell and oven-dried at 60°C to constant mass. Then, the tissues were digested in 4 mL 50% HNO₃ (99.9%, Carlo Erba) and analysed by atomic absorption spectrometry, as previously described by Gomot and Pihan (2002).

CaCl₂ soil extracts were obtained following the extracting conditions described by Houba et al. (1996). Total Cd concentrations were assessed in soil and plant samples after

digestion (60°C, 48h) of 0.2 to 0.5 g of dry material in 4 mL 50% HNO₃ (99.9%, Carlo Erba) for soil samples and in 3.4 mL 50% HNO₃ + 0.6 mL 30% H₂O₂ (99.9%, Carlo Erba) for plant samples. Then, 15 mL of deionised water were added before analysis by atomic absorption spectrometry with a graphite furnace (Varian 220 Z with Zeeman background correction).

The analysis reliability was assessed with standard reference materials (TORT-2, lobster hepatopancreas from NRCC-CNRL, Canada; calcareous loam soil n°141R from BCR, Belgium and Ray grass n°281 from BCR, Belgium) and was within 10% of certified values.

V.2.4. Accumulation modelling and statistical analyses

As observed in numerous saprophytic organisms (Janssen et al., 1991; Peijnenburg et al., 1999; Spurgeon and Hopkin, 1999; Vijver et al., 2006) and in terrestrial snails (Gimbert et al., 2006), the increase of internal concentrations with time can be described by a one-compartment model following the equation:

$$C_{sn}(t) = C_{sn}(0) + \frac{a}{k_2} (1 - e^{-k_2 t}) \quad (1)$$

where $C_{sn}(t)$ is the metal concentration in the snails ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1} \text{DM}_{sn}$) at time t (d), k_2 is the excretion rate (d^{-1}) and a is the uptake flux ($\mu\text{g}_{\text{metal}}\cdot\text{g}^{-1} \text{DM}_{sn}\cdot\text{d}^{-1}$), which equals $k_1 \cdot C_e$ in which k_1 is the uptake rate constant ($\mu\text{g}_{\text{soil}}\cdot\text{g}^{-1} \text{DM}_{sn}\cdot\text{d}^{-1}$) and C_e is the bioavailable external concentration (soil and food) ($\mu\text{g}_{\text{metal}}\cdot\text{g}^{-1} \text{DM}$). $C_{sn}(0)$ is the constitutive Cd concentration measured in snails at the beginning of the experiment. First modelling attempts considering this pool as available for elimination demonstrated this pool to be of constant magnitude.

If an equilibrium in internal concentrations is reached after a prolonged exposure, the related steady-state concentration (C_{ss}) may be estimated according to:

$$C_{sn}(ss) = C_{sn}(0) + \frac{a}{k_2} \quad (2)$$

For statistical analysis of contaminant kinetics, the use of body burdens, rather than tissue concentrations, is recommended (Moriarty, 1983), since the latter can be affected by rapid changes of the organism mass (Spacie and Hamelink, 1985). Moreover, information brought by each of these units and the way to use them is not necessarily the same: body burdens will be informative on the contaminant loads (μg) potentially available for higher links in the food web, while concentrations (i.e. amounts of contaminant par mass unit) is well

suitable for toxicity assessment, for instance in touch with critical body residues. Kinetic trends and parameters were therefore also determined on the basis of body burdens. In this case, the accumulation modelling was conducted in the same way as concentrations (Eq. (1)), replacing C by Q (in $\mu\text{g}\cdot\text{snail}^{-1}$). The uptake flux was then expressed in $\mu\text{g}_{\text{metal}}\cdot\text{snail}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$.

The accumulation parameters were estimated by fitting the models with a non linear mixed-effects procedure (nlme, Lindstrom and Bates, 1990) allowing for nested random effects. The within-group errors are allowed to be correlated and/or have unequal variances. The nlme integrates the soil contamination and the soil pH as fixed factors and the microcosms as random effect. For each season, significant differences in modelled parameters between plots were checked by a two-way ANOVA followed by the Tukey post-hoc multiple comparison test (Pinheiro and Bates, 2000). Comparisons of Cd concentrations accumulated in the snails at the end of the experiment (day 56) were made by means of a linear mixed-effects (lme) model (integrating the same fixed and random factors as above) using two-way ANOVA and Tukey post-hoc multiple comparison tests (Pinheiro and Bates, 2000). The same statistical procedure was used to investigate growth and time specific differences in fresh masses of snails exposed to the different plots in spring and autumn. Differences in shoot Cd concentrations for each plant species between plots and the two seasons were checked by ANOVA followed by the Tukey post-hoc multiple comparison test and Wilcoxon signed rank test (Sokal and Rohlf, 1997), respectively. All statistics were performed with the free statistics software package R (version 2.2.1) (R Development Core Team, 2005).

V.3. Results

V.3.1. Soil and plant analysis

Table V.1. Main physico-chemical characteristics of the plot soils.

Plot	pH _{water} ^(a)	Total Cd mg.kg ⁻¹	CaCl ₂ extractable Cd ^(b) mg.kg ⁻¹
7L	7.24 ± 0.05	0.62 ± 0.01	0.02±0.00
7M	7.11 ± 0.03	15.32 ± 0.52	0.40±0.04
7H	7.10 ± 0.04	42.39 ± 2.16	0.98±0.05
6L	6.13 ± 0.04	0.61 ± 0.03	0.02±0.00
6M	5.98 ± 0.09	15.89 ± 0.85	0.49±0.05
6H	6.05 ± 0.06	29.37 ± 0.61	0.79±0.04

^(a) NF ISO 10390 (AFNOR, 2005); ^(b) procedure from Houba et al. (1996)

Results of soil sample analyses are shown in Table V.1. Soil texture was characterized by 67.5% of sand, 15% of silt and 17.5% of clay. Measured total Cd concentrations in plot soils indicated good agreement with nominal values. However, in plot 6H, a 25% difference was observed between the measured (29 mg Cd.kg⁻¹) and the expected concentration (40 mg Cd.kg⁻¹), probably due to underground drainage over time. Cd availability in soil was estimated by CaCl₂ single extracts, removing between 2 and 3% of the soil total Cd concentrations. Analyses revealed a pH gradient between the two plot sets of about 1.1 unit (Table V.1).

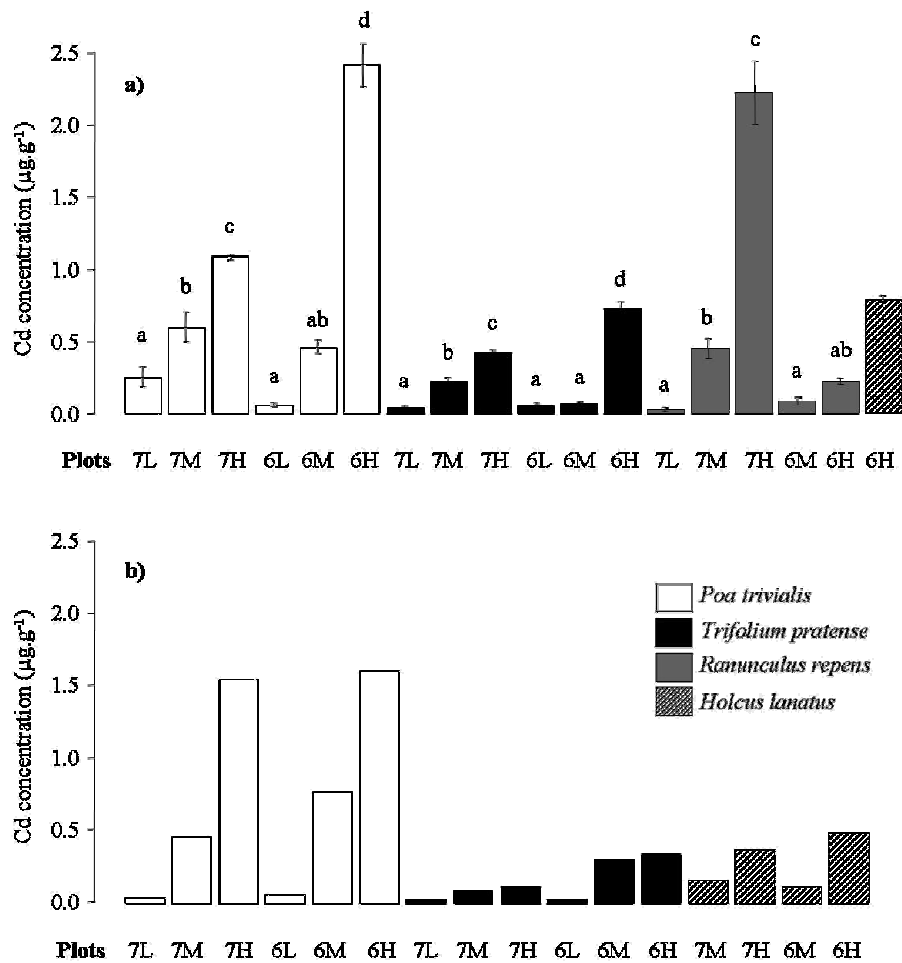


Figure V.1. Cd concentrations in the shoots of the plant species sampled in the different plots in a) spring and b) autumn. For the same species, similar letters indicate the absence of significant difference (p<0.05).

Shoot Cd concentration for plant species are displayed in Fig. V.1(a) (spring sampling) and Fig. V.1(b) (autumn sampling). The shoot Cd concentrations significantly increased with the soil contamination irrespective of the plant species, the soil pH and the season. The pH influence appeared variable in spring with different responses depending on the soil contamination and the plant species. For *Poa trivialis* and *Trifolium pratense*, shoot Cd concentrations increased at pH=6 for the higher soil contamination (plots 7H and 6H) while

opposite responses were observed for *Ranunculus repens* with Cd concentrations significantly lower at pH=6 than at pH=7 (Fig. V.1(a)). In autumn, the soil pH variation did not result in differences in shoot Cd concentrations of *Poa trivialis* and *Holcus lanatus* whereas a more important transfer was observed in *Trifolium pratense* grown in contaminated plots at pH=6 (plots 6H and 6M) compared to pH=7 (plots 7H and 7M) (Fig. V.1(b)). Concerning the season effect, Cd concentration in plants sampled in the different plots in spring and autumn did not differ significantly (Wilcoxon, $p > 0.05$).

V.3.2. Snail mortality and growth

Snail mortality was extremely low (<2%), both during spring and autumn.

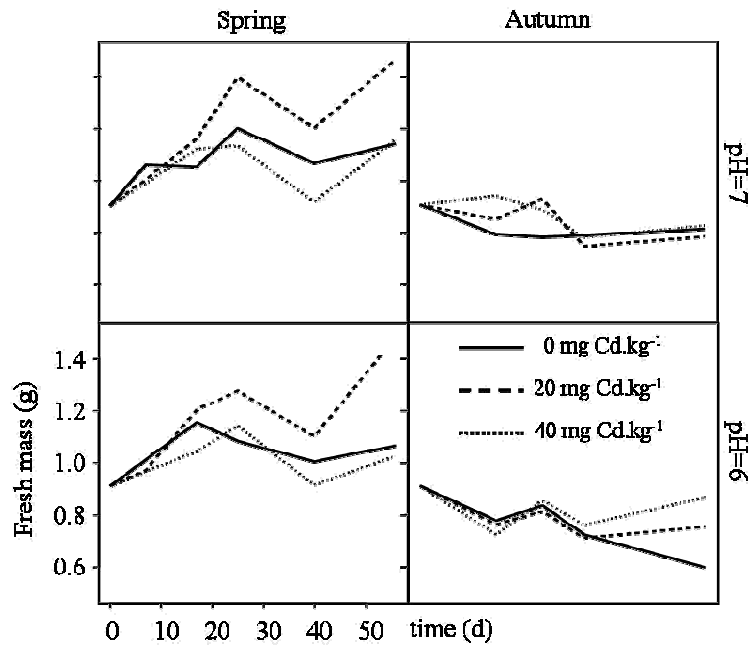


Figure V.2. Average fresh masses (n=6) of the snails exposed to the different treatments (paired soil contamination / soil pH) during spring and autumn.

At the beginning of the exposure periods, snails weighted 0.92 ± 0.12 g (spring) and 0.95 ± 0.10 g (autumn). Growth trends over the exposure periods in the different treatments (paired soil contamination / soil pH) are depicted in Fig. V.2. Repeatability for growth was satisfactory at all sampling dates since no significant differences among the replicate microcosms were found whatever the plot and the season considered (data not shown). Therefore, data from replicate microcosms were added for further statistical analyses. In spring, similar growth patterns were observed for snails exposed at pH=7 and pH=6. In both cases, only snails exposed to the intermediate soil concentration (about 20 mg Cd.kg^{-1} soil) showed a significant growth with, at the end of the experiment, an average mass gain of about

58±16% (p=0.001) and 56±13% (p<0.001) at pH=7 and pH=6, respectively. In autumn, at similar exposure duration, the fresh masses of snails were lower than those measured in spring no matter the soil contamination and the soil pH (p<0.05) (Fig. V.2). Moreover, a significant decrease in the fresh masses was observed for snails exposed to 20 and 40 mg Cd.kg⁻¹ soil (-18±9%, p=0.044 and -23±8%, p=0.009, respectively) at pH=7 and for snails exposed to 0 and 20 mg Cd.kg⁻¹ soil (-22±8%, p=0.007 and -39±9%, p<0.001, respectively) at pH=6.

V.3.3. Accumulation kinetics

As for growth, the repeatability among the triplicate microcosms was good for each plot and each season since overall no significant differences were observed in the accumulated Cd levels (data not shown). Therefore, at each sampling date, data from replicate microcosms were used as a single data set for further statistical treatments.

V.3.3.1. In terms of concentrations

The internal Cd concentrations measured in snails exposed in spring and autumn to the different plots and the related accumulation curves are showed in Fig. V.3(a). The parameter estimates of the accumulation curves are presented in Table V.2. The one-compartment model adequately described the Cd accumulation in snails as reflected by the elevated coefficient of determination (r²) and by the low differences between the measured and calculated internal concentrations at the end of exposure.

A Cd transfer was observed in snails whatever the soil contamination, the soil pH or the season (Fig. V.3(a)). This transfer was reflected by the significant uptake fluxes (a) estimated by the model (Table V.2). The linear shape of the accumulation curve testified to the absence of excretion as suggested by the non significant excretion rate (k₂) values estimated by the model irrespective of the soil contamination, the pH or the season. The steady-state was therefore not reached and the equilibrium concentrations not calculated. For the same soil pH conditions, significant differences were observed between the uptake fluxes, with increasing values according to the soil contamination, especially at soil pH=7 (Table V.2). No significant differences were observed at soil pH=6 between uptake flux of snails exposed to moderate (plot 6M) and high (plot 6H) Cd concentration in soil in spring (a=0.200±0.022 and 0.242±0.026 µg.g⁻¹.d⁻¹, respectively) and in autumn (a=0.247±0.032 and 0.280±0.037 µg.g⁻¹.d⁻¹, respectively). In spring, the soil pH did not influence the Cd transfer to snails since, for the same soil contamination, no significant differences were observed

(Table V.2). In autumn, a significant difference was observed in the uptake fluxes between soil pHs only at the higher exposure concentration (plots 7H and 6H) with a value about three times higher at pH=7 ($a=0.750\pm 0.117 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). However, since the soil contamination was higher in plot 7H (42.4 versus 29.4 mg Cd.kg⁻¹ soil in plot 6H, Table V.1), it was difficult to distinguish a clear effect of soil pH on the Cd transfer from soil to snail. A plot to plot comparison of the uptake fluxes between spring and autumn allowed to conclude on a season effect on the Cd transfer to snails at soil pH=7 since significant differences were observed, whatever the soil contamination, in the uptake fluxes estimated from two to three times higher in autumn (Table V.2). However, at soil pH=6, although the uptake fluxes were higher in autumn compared to those modelled in spring, no significant differences were found.

Table V.2. Main characteristics of the Cd accumulation (concentrations) in *H. aspersa* snails exposed to the different plots.

Season	Plot	Measured	Modelled				r ²	Calculated
		C _{sn} (56d) ± SE μg.g ⁻¹	a ± SE μg.g ⁻¹ .d ⁻¹	p-value	k ₂ ± SE d ⁻¹	p-value		C _{sn} (56d) μg.g ⁻¹
Spring	7L	1.64 ± 0.38 ^a	0.022 ± 0.003 ^a	<0.001	0.009 ± 0.016 ^a	0.580	0.808	1.41
	7M	12.42 ± 7.87 ^b	0.168 ± 0.018 ^b	<0.001	-0.007 ± 0.009 ^a	0.433	0.775	11.96
	7H	16.45 ± 4.87 ^b	0.258 ± 0.028 ^c	<0.001	-0.004 ± 0.010 ^a	0.647	0.764	16.63
	6L	2.12 ± 0.54 ^a	0.030 ± 0.004 ^a	<0.001	0.003 ± 0.013 ^a	0.806	0.761	1.99
	6M	12.10 ± 1.98 ^b	0.200 ± 0.022 ^b	<0.001	0.004 ± 0.010 ^a	0.678	0.672	10.47
	6H	12.28 ± 3.77 ^b	0.242 ± 0.026 ^{bc}	<0.001	0.010 ± 0.011 ^a	0.364	0.579	10.82
Autumn	7L	3.62 ± 0.57 ^{a,*}	0.075 ± 0.009 ^{a,*}	<0.001	0.011 ± 0.012 ^a	0.393	0.632	3.55
	7M	12.25 ± 2.57 ^b	0.314 ± 0.042 ^{b,*}	<0.001	0.020 ± 0.020 ^a	0.331	0.698	11.00
	7H	25.59 ± 1.34 ^{c,*}	0.750 ± 0.117 ^{c,*}	<0.001	0.028 ± 0.029 ^a	0.347	0.763	21.62
	6L	2.37 ± 0.20 ^a	0.056 ± 0.027 ^a	<0.001	0.038 ± 0.021 ^a	0.073	0.506	1.72
	6M	11.46 ± 3.14 ^b	0.247 ± 0.032 ^b	<0.001	0.012 ± 0.014 ^a	0.414	0.655	10.49
	6H	11.66 ± 0.66 ^b	0.280 ± 0.037 ^b	<0.001	0.017 ± 0.014 ^a	0.237	0.799	10.53

Values that share similar letters within a season are not significantly different ($p>0.05$). Asterisk (*) symbolizes significant difference for a treatment between the two seasons ($p<0.05$). Negative values of the excretion rates (k_2) should be biologically considered as zero values.

V.3.3.2. In terms of body burdens

The internal Cd body burdens measured in snails exposed in spring and autumn to the different plots and their accumulation curves are depicted in Fig. V.3(b)). The related accumulation parameters are presented in Table V.3. The fitting goodness can be judged on the basis of the high coefficient of determination (r^2) and the small relative differences between the measured and calculated internal body burdens at the end of the experiment.

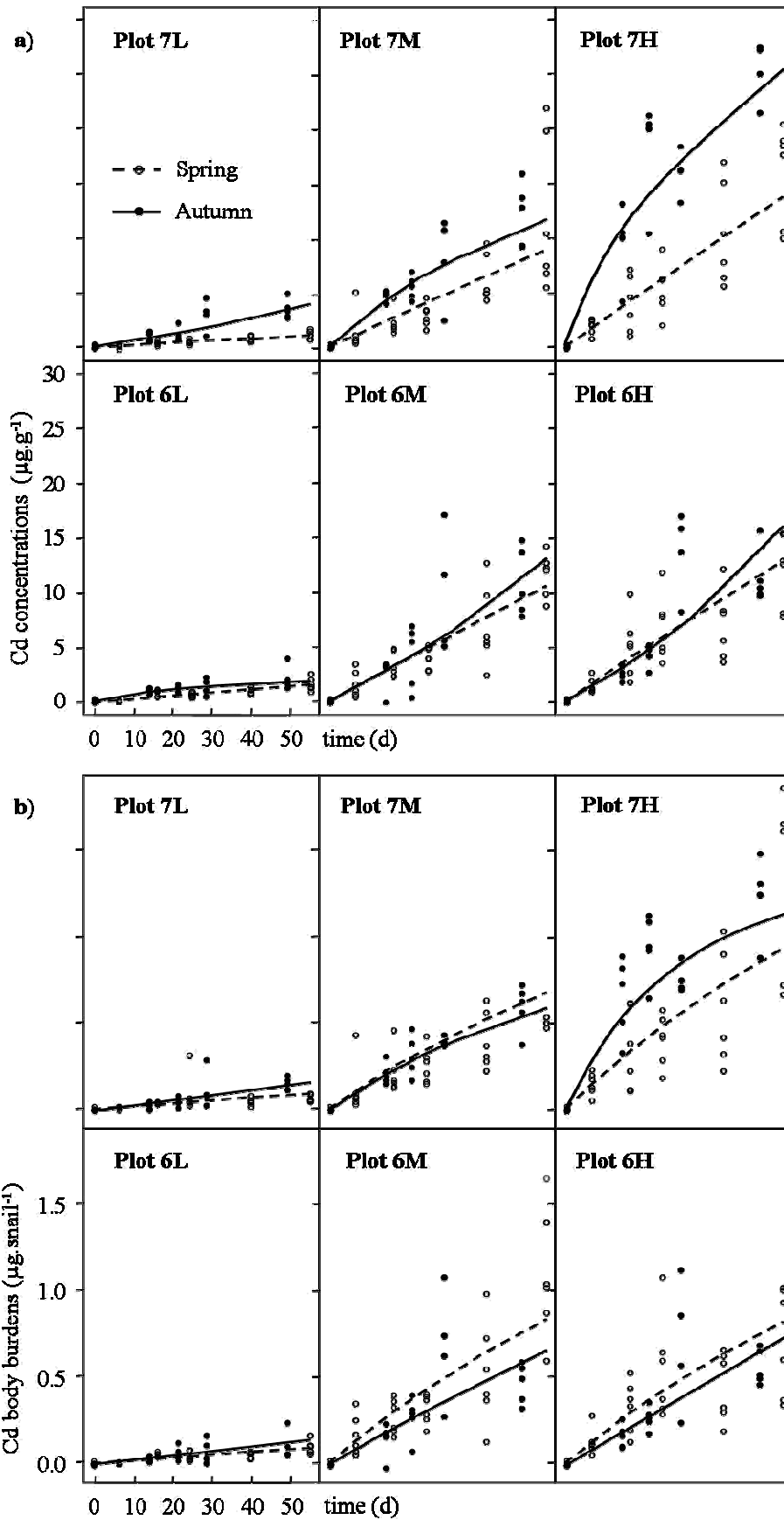


Figure V.3. Cd accumulation kinetics expressed in a) concentrations and b) body burdens in the soft tissues of *H. aspersa* snails exposed to the different plots during spring (continuous line, full circles) and autumn (dotted line, empty circles). Each data point represents an individual snail.

Table V.3. Main characteristics of the Cd accumulation (body burdens) in *H. aspersa* snails exposed to the different plots.

Season	Plot	Measured	Modelled				r ²	Calculated
		Q _{sn} (56d) μg.snail ⁻¹	a ± SE μg.snail ⁻¹ .d ⁻¹	p-value	k ₂ ± SE d ⁻¹	p-value		Q _{sn} (56d) μg.snail ⁻¹
Spring	7L	0.10 ± 0.02 ^a	0.002 ± 0.000 ^a	<0.001	0.045 ± 0.032 ^a	0.166	0.676	0.08
	7M	1.11 ± 0.96 ^b	0.016 ± 0.002 ^b	<0.001	-0.005 ± 0.012 ^a	0.661	0.733	1.07
	7H	1.33 ± 0.47 ^b	0.022 ± 0.003 ^c	<0.001	-0.000 ± 0.013 ^a	0.979	0.629	1.28
	6L	0.13 ± 0.04 ^a	0.002 ± 0.000 ^a	<0.001	0.012 ± 0.021 ^a	0.566	0.645	0.12
	6M	1.33 ± 0.42 ^b	0.019 ± 0.003 ^{bc}	<0.001	0.007 ± 0.014 ^a	0.628	0.670	0.92
	6H	0.75 ± 0.35 ^b	0.019 ± 0.003 ^{bc}	<0.001	0.025 ± 0.017 ^a	0.142	0.511	0.61
Autumn	7L	0.17 ± 0.05 ^a	0.003 ± 0.000 ^a	<0.001	0.016 ± 0.014 ^a	0.251	0.554	0.14
	7M	0.62 ± 0.08 ^b	0.015 ± 0.002 ^b	<0.001	0.017 ± 0.022 ^a	0.434	0.879	0.57
	7H	1.23 ± 0.63 ^b	0.041 ± 0.020 ^c	0.021	0.031 ± 0.020 ^a	0.227	0.831	1.12
	6L	0.09 ± 0.05 ^a	0.002 ± 0.000 ^a	<0.001	0.014 ± 0.019 ^a	0.477	0.683	0.11
	6M	0.52 ± 0.11 ^{b,*}	0.014 ± 0.002 ^b	<0.001	0.004 ± 0.019 ^a	0.838	0.484	0.73
	6H	0.52 ± 0.19 ^b	0.015 ± 0.002 ^b	<0.001	-0.001 ± 0.018 ^a	0.956	0.532	0.69

Values that share similar letters within a season are not significantly different (p>0.05). Asterisk (*) symbolizes significant difference for a treatment between the two seasons (p<0.05).

Negative values of the excretion rates (k₂) should be biologically considered as zero values.

Similarly to when Cd content was expressed as body concentration, no steady-state was reached and the accumulation curves remained linear over the exposure period (Fig. V.3(b)). Uptake fluxes took therefore positive and significant values whereas excretion rates appeared not significantly different from zero (p>0.05) (Table V.3). For each season, significant differences were determined in the uptake fluxes of snails exposed to the different plots, underlining the soil contamination dependence of the accumulation. However, contrarily to what was observed at soil pH=7, uptake fluxes were not able to discriminate transfer differences when snails were exposed to 20 and 40 mg Cd.kg⁻¹ soil at soil pH=6, nor in spring, neither in autumn. Although the soil pH did not influence the Cd accumulation in spring, a significantly higher uptake flux was modelled in autumn for snails exposed to the higher Cd soil concentration at soil pH=7 (a=0.041±0.020 μg.snail⁻¹.d⁻¹ versus 0.015±0.002 μg.snail⁻¹.d⁻¹ at pH=6) (Table V.3). However, similarly to what was found in concentrations, the difference in contamination between plots 7H and 6H (Table V.1) did not allow to draw general conclusions of the effects of pH on Cd uptake. The great difference compared with the results obtained with concentrations concerned the season effect. When modelled with body burdens, uptake fluxes in spring did not differ from those of autumn (Table V.3).

V.4. Discussion

V.4.1. Cd transfer and accumulation in plants and snails

A clear transfer of Cd was observed in the soil-plant-snail food chain studied in this in situ experiment, showing that the soil Cd was available to plants and that Cd in soil and plants was available to snails. Shoot Cd concentrations of the different plant species were in agreement with previous results obtained from plants grown on uncontaminated and contaminated field soils (Dudka et al., 1996; Liu et al., 2006). Comparisons of the Cd concentrations between plots showed a Cd transfer from soil to plant shoots depending on the soil contamination but not significantly influenced by the season. For high soil contamination, Cd concentrations accumulated in plants were generally higher at pH=6 than at pH=7. These results are in agreement with previous works which recognized the particular importance of soil pH in the Cd solubility and bioavailability in soil and its transfer to plants (McLaughlin, 2001; Kabata-Pendias, 2004). In our study, a 1 unit pH decrease appeared sufficient to induce a more important transfer of Cd from soil to plant shoots grown on a soil contaminated by Cd at environmentally realistic concentrations.

Terrestrial gastropods are polyphagous herbivores. Among the plants making up the snail food, *Poacea* (*Poa trivialis*, *Holcus lanatus*) constitute an important part (Chevalier et al., 2001) but others works reported the palatability of *Trifolium pratense* for *Helix pomatia* snails (Ledergerber et al., 1998). The Cd transfer to snails was soil and plant contamination dependent, internal concentrations increasing with environmental contamination. Cadmium concentrations measured in snails at the end of the experiment were in the same range as mean values reported in autochthonous snails sampled in polluted areas (Menta and Parisi, 2001; Beeby and Richmond, 2002; Notten et al., 2005). In our study, the contribution of each plant species in the snail diet was not investigated. However, the soil contamination dependent correlation between the Cd concentrations in the plant shoots and in the snail soft body supported the literature data. The Cd bioaccumulation was linear over the exposure duration, no matter the soil contamination, the soil pH and the season. This curve shape has to be related to the absence of elimination *sensu largo*, including excretion out of the body and growth dilution due to the increase of the body mass. In the present work, the absence of excretion (as reflected by the non significant excretion rates (k_2) estimated by the model) and the very limited growth of snails could not lead to the achievement of a steady-state, since this last is under the dependence of elimination processes (Gimbert et al., 2006). Similar linear accumulation patterns were reported for Cd in the whole body of adult *H. pomatia* snails

(Dallinger and Wieser, 1984) and juvenile *H. aspersa* snails with a limited growth (Scheifler et al., 2006), both fed with contaminated lettuce for several weeks. In our work, Cd accumulation in snails was represented by the uptake flux (a) obtained from the one-compartment model fit, allowing statistical, time-integrated and accurate comparisons of the Cd accumulation patterns in snails exposed to different treatments. The soil-snail transfer appeared thus clearly dependent on the environmental (soil and plants) contamination and snails were able to discriminate the soil contamination even at realistic concentrations (i.e. 20 and 40 mg Cd.kg⁻¹ soil) irrespective of the soil pH or the season. The soil pH, in the range studied, did not modify the Cd uptake fluxes in snails. Typically, the pH of the gut of an organism is well-regulated, so there will be no effect of soil pH on the digestive uptake from the soil solid phase. However, soil pH will affect the partitioning of metal and, therefore, the metal concentration available for cutaneous exposure from soil solution (Peijnenburg and Jager, 2003). The modification of the soil water partitioning in response to the soil acidic conditions, may have been sufficient to lead to the higher accumulation observed in plants at soil pH=6 but was too weak to be reflected in the accumulation patterns of snails for which contaminations routes are different. Indeed, the absence of correlation between the plant and snail contaminations at soil pH=6 highlights the importance of the soil contribution in the Cd bioaccumulation in *H. aspersa* snails, as previously noticed by Scheifler et al. (2006). Further experiments, investigating a wider range of pH, are needed to assess the soil pH influence on metal bioaccumulation in snails. Among the multiple factors influencing *in situ* metal bioaccumulation in terrestrial organisms, data concerning the season effect are very scarce. In the present study, a more important transfer of Cd was observed whatever the soil contamination in snails exposed during autumn compared to spring, as reflected by the higher uptake fluxes modelled on concentration data. Although differences in plant palatability for snails (composition, digestibility) between the two seasons may be evoked to explain this phenomenon, they however failed to explain why this season effect was not found when body burdens were used instead of concentrations. This paradox has to be related to the snail mass which, at similar exposure duration, was lower in autumn than in spring. From these results, we concluded that the season might not directly influence the Cd transfer from soil to snail (for instance by modifying Cd availability in soil and plants to snail) but that it indirectly worked on internal Cd concentrations by modifying the organism mass.

V.4.2. Effects on snail mortality and growth

The elevated Cd concentrations accumulated did not induce mortality in snails exposed to the different plots, irrespective of the environmental contamination, the soil pH, and the season. This absence of lethal effect at the environmentally realistic concentrations studied here was in agreement with previous studies showing the high tolerance of *H. aspersa* snails to Cd (Russell et al., 1981). Concerning growth, the exposure concentrations and the Cd levels reached within snails were far from those able to exert adverse effects on growth (Coeurdassier et al., 2002; de Vaufléury et al., 2006). The low or non growth of snails has therefore to be related to practical and environmental factors. The practical aspect covered the experiment duration that considered only the very first (and non exponential) part of the complete growth period of *H. aspersa* snails lasting, in the field, from two to four years (Potts, 1975). Environmental factors might also explain the differences in the growth patterns between spring and autumn. Firstly, in field conditions, most growth is restricted to the spring (Potts, 1975). Secondly, previous studies reported that snail diets vary in quality and quantity according to various factors such as the food availability and quality (texture, calcium and nitrogen contents), the season and the soil properties (calcium bioavailability) (Hatzioannou et al., 1994; Iglesias and Castillejo, 1999). Finally, while the main climatic variables (temperature, precipitation, relative humidity, evaporation) were in the same range between the two seasons (data not shown), the photoperiod decreased in autumn, potentially affecting the snail activity (Bailey, 1981; Gomot-de Vaufléury., 2001). In contrast, a growth stimulation was observed in spring, irrespective of the soil pH, in snails exposed to 20 mg Cd.kg⁻¹ (plots 7M and 6M). This particular phenomenon may correspond to an hormesis effect as already observed in *H. aspersa* snails fed with lightly Cd-contaminated diet (Gomot, 1997) or exposed to moderately contaminated substrates (Coeurdassier et al., 2002) leading to low internal concentrations (< 40 mg Cd.kg⁻¹).

V.4.3. Involvement of kinetic parameters in ecotoxicological studies

The bioaccumulation potential could have been assessed using bioaccumulation factors (BAFs) calculated via the ratio of concentration in the snail to concentration in the diet (Williamson, 1979). However, in microcosms, snails were contaminated by the soil Cd not only via the diet composed by the plants species grown on the plots (indirect pathway), but also via soil particle ingestion and Cd diffusion through the moist foot (direct pathway) (Dallinger et al., 2001; Gomot and Pihan, 2002). Calculation of such BAFs based on food only would therefore not be relevant since soil contribution in Cd bioaccumulation in snails

may reach 40% (Scheifler et al., 2006). Moreover, time is an important variable to take into consideration for bioaccumulation assessment purposes (Peijnenburg et al., 1997) that the punctual calculation of BAFs does not account for. The use of modelling allows to characterize the bioaccumulation via an indicator (the uptake flux, a) integrating both the exposure duration and the contamination sources. The comparison of uptake fluxes may reveal differences among treatments where the comparison of accumulated concentrations or static ratios such as BAFs failed to (Tables V.2 and V.3). Uptake fluxes may also be used, in a specifically designed experiment, to predict the contribution of both contamination sources (soil and diet), as demonstrated with isopods (*Porcellio scaber*) exposed to contaminated soil and/or food (Vijver et al., 2006).

Behind bioaccumulation, and for a similar exposure, an important variable influencing the fluxes of contaminant entering an organism is the environmental bioavailability (Landrum et al., 1994). In line with this concept, Peijnenburg et al. (1997) proposed that bioavailability should be handled as a dynamic process and, as recommended by recent studies, could be estimated from uptake fluxes into soil invertebrates (van Straalen et al., 2005; Gimbert et al., 2006). The pertinence of the modelled uptake fluxes compared to the internal concentrations, their correlation (data not shown) both with the 0.01 M CaCl₂ extractions, performed to define soil Cd environmental availability in view of Cd bioavailability assessment (as recommended by Alexander et al., 2003) and with the plant concentrations ($r^2=0.908$, $p=0.002$ and $r^2=0.303$, $p=0.018$, respectively) allowed us to confirm the relevance of uptake fluxes in the assessment of Cd bioavailability and transfer to snails, even in field conditions.

V.4.4. Relevance in ecological risk assessment

Comprehensive and reliable risk assessment for environmental health protection should consider all possible pathways of exposure and provide a quantitative estimate for humans and biota (Tarazona and Vega, 2002). In the present work, a one-compartment toxicokinetic model was applied for the first time in a field experiment and provided a good assessment of transfer (exposure and bioavailability). Allowing for an accurate assessment of Cd transfer to snails and reducing the potential misinterpretations based on punctual data, toxicokinetic appears as an interesting tool in the improvement of risk assessment procedures and a way to approach and quantify metal bioavailability for a specific biological target. *H. aspersa* snails proved to be sensitive enough to discriminate environmental soil contaminations. These results contribute to fill the need to establish the scale of ambient differences that a sentinel can detect and the extent to which it quantifies the pollution signal

(Beeby, 2001). Even though passive sentinels (autochthonous *H. aspersa*) are not shown to reflect the quantitative differences between polluted sites (Beeby and Richmond, 2002), with a possible genetic adaptation to metal exposure (Newman et al., 1994), we demonstrated that active biomonitoring using standard lab-reared snails was successful to quantify the environmental contamination and its spatial variations.

The interpretation of the season impact, based on uptake fluxes, may lead to draw different conclusions when concentrations or body burdens are considered. In this particular case, the variation of body masses prevented body burdens and concentration from being used interchangeably. This raises the question of the unit choice in ecotoxicological studies with risk assessment purposes. The use of body burdens, rather than actual concentrations, appeared more appropriate for metal transfer assessment purposes. Similar recommendations were proposed by Moriarty (1983) and Spacie and Hamelink (1985) for contaminant kinetic analyses. Body burdens will thereby be informative on the contaminant loads potentially available for higher links in the food web. Snails can play an important role in the trophic transfer of metals and the predator intoxication, as demonstrated for instance with adult *Chrysocarabus splendens* carabid beetles fed with contaminated snails (Scheifler et al., 2002). On the other hand, concentrations (i.e. amounts of contaminant per mass unit) reveal their interest in toxicity assessment, especially in touch with critical body residues (CBRs), i.e. internal chemical concentrations associated with sublethal or lethal endpoints (Lanno et al., 1998; de Vaufleury et al., 2006). Since sublethal effects were dependent on the rate at which a toxic substance enters the organism, rather than on the concentration inside that organism (van Straalen et al., 2005), toxicokinetics and the related uptake fluxes also found to be useful in this ecotoxicological field.

V.5. Conclusion

In this study, we clarified the *H. aspersa* snail abilities to reveal, at the interface soil-plant-atmosphere, the environment contamination by a metal (Cd). The bioaccumulation potential of a chemical in a specified organism is classically expressed by static internal concentrations or BAFs which give only punctual information and do not integrate the time course of internal concentrations. The present toxicokinetic approach, original in the field, meets these requirements. It brings complementary information concerning uptake fluxes that should not be neglected in ecological risk assessment, since they can help to assess potential sublethal effects on growth and reproduction (van Straalen et al., 2005; Gimbert et al., 2007).

We also document the impacts of environmental factors, as the soil pH or the season, on the soil-plant-snail transfer of Cd which constitute important information to ensure a rational use of terrestrial snails in environmental biomonitoring.

Acknowledgements

The authors express gratitude to Pr P. Giraudoux, to Dr R. Scheifler and to Pr. L. Gomot for useful scientific discussions. We also thank the four anonymous reviewers for valuable comments on the paper. This work was supported by grants from the Conseil Régional of Franche-Comté and the ADEME (Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie, contract n°01 75037).

References

- AFNOR, 2005. NF ISO 10390. Qualité du sol. Détermination du pH. AFNOR, Paris, France.
- Alexander, M., Hughes, J.B., Chaney, R.L., Cunningham, S.D., Harmsen, J., van Gestel, H., 2003. Chemical Measures of Bioavailability. In: Lanno, R. P. (Ed.) Contaminated soils: from soil-chemical interactions to ecosystem management. SETAC-publication, pp. 345-362.
- Bailey, S.E.R., 1981. Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *J. Comp. Physiol.* **142**, 89-94.
- Baize, D., Girard, M.C. (coord.), Hodgson, J.M., Eskenazi, N.R., Baize, D. (trans.), 1998. A Sound Reference Base for Soils: The "Référentiel Pédologique". INRA Editions, Versailles, France, 324 pp.
- Beeby, A., 2001. What do sentinels stand for? *Environ. Pollut.* **112**, 285-298.
- Beeby, A., Richmond, L., 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecol. Indicat.* **1**, 261-270.
- Chevalier, L., Desbuquois, C., Le Lannic, J., Charrier, M., 2001. *Poaceae* in the natural diet of the snails *Helix aspersa* Müller (*Gastropoda, Pulmonata*). *C.R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie / Life Sciences* **324**, 979-987.
- Coeurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A., Lovy, C., Badot, P.M., 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotox. Environ. Safe.* **53**, 425-431.

- Dallinger, R., Berger, B., Triebkorn-Köhler, R., Köhler, H., 2001. Soil biology and ecotoxicology. In: Barker, G.M., Ed. The biology of terrestrial molluscs. CAB international, Oxon, Wallingford, UK. pp. 489-525.
- Dallinger, R., Wieser, W., 1984. Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd, and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comp. Biochem. Physiol.* **79**, 117-124.
- Dan, M., Bailey, S.E.R., 1982. Growth, mortality and feeding rates of the snail *Helix aspersa* at different population densities in the laboratory and the depression of activity if helioid snails by other individuals, or their mucus. *J. Moll. Stud.* **48**, 257-265.
- de Vaufleury, A., Coeurdassier, M., Pandard, P., Scheifler, R., Lovy, C., Crini, N., Badot, P.M., 2006. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, 797-806.
- Dudka, S., Piotrowska, M., Terelak, H., 1996. Transfer of cadmium, lead and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. *Environ. Pollut.* **94**, 181-188.
- Eijsackers, H., 1983. Soil fauna and soil microflora as possible indicators of soil pollution. *Environ. Monit. Assess.* **3**, 307-316.
- Gimbert, F., de Vaufleury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Badot, P.M., 2006. Modelling chronic exposure to contaminated soil: a toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environ. Int.* **32**, 866-875.
- Gimbert, F., de Vaufleury, A., Douay, F., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Badot, P.M., 2007. Long-term responses of snails exposed to cadmium-contaminated soils in a partial life-cycle experiment. *Ecotox. Environ. Safe.*, **in press**.
- Goldberg, E.D., Koide, M., Hodge, V., Flegal, A.R., Martin, J., 1983. US Mussel Watch: 1977-1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuarine and Coastal Shelf Science* **16**, 69-93.
- Gomot, A., 1997. Dose-dependent effect of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **33**, 209-216.
- Gomot-de Vaufleury, A., 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotox. Environ. Safe.* **46**, 41-50.
- Gomot-de Vaufleury, A., 2001. Regulation of growth and reproduction. In: Barker, G.M., Ed. The biology of terrestrial molluscs. CAB international, Oxon, Wallingford, UK. pp. 331-355.
- Gomot-de Vaufleury, A., Pihan, F., 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere* **40**, 275-285.

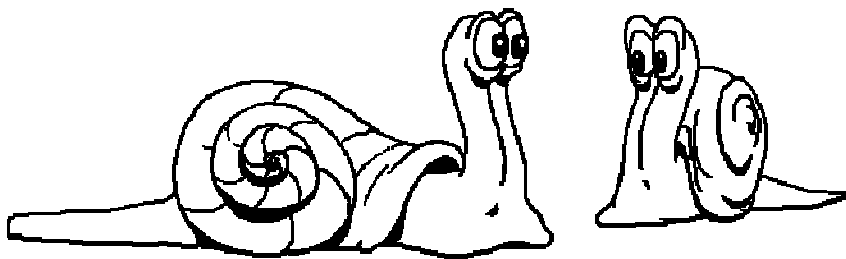
- Gomot-de Vaufleury, A., Pihan, F., 2002. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: metal bioavailability and bioaccumulation. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 820-827.
- Hatzioannou, M., Eleuthariadis, N., Lazaridou-Dimitriadou, M., 1994. Food preferences and dietary overlap by terrestrial snails in Logos area (Edessa, Macedonia, northern Greece). *J. Moll. Stud.* **60**, 331-341.
- 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. *Sci. Total Environ.* **178**, 21-28.
- Iglesias, J., Catilejo, J., 1999. Field observations of feeding of the land snail *Helix aspersa* Müller. *J. Moll. Stud.* **65**, 411-423.
- ISO, 2006. Standard 15952. Soil quality. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- Janssen, M.P.M., Bruins, A., de Vries, T.H., van Straalen, N.M., 1991. Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Arch. Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 305-312.
- Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-plant transfer of trace elements – an environmental issue. *Geoderma* **122**, 143-149.
- Landrum, P.F., Hayton, W.L., Lee II, H.L., McCarty, L.S., Mackay, D., McKim, J.M., 1994. Synopsis of discussion section on the kinetics behind environmental bioavailability. In: Hamelink, J.R. Landrum, P.F. Bergman, H.L., Benson, W.H. (Eds). Bioavailability. Physical, chemical and biological interactions. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 203–219.
- Lanno, R., Leblanc, S., Knight, B., Tymowski, R., Fitzgerald, D.G., 1998. Application of body residues as a tool in the assessment of soil toxicity. In: Sheppard, S., Bembridge, J., Holmstrup, M., Posthuma, L. (Eds). Advances in Earthworm Ecotoxicology. SETAC Press, Pensacola, FL, USA, pp. 41-53.
- Ledergerber, S., Leadley, P.W., Stöcklin, J., Baur, B., 1998. Feeding behaviour of juvenile snails (*Helix pomatia*) to four plant species grown at elevated atmospheric CO₂. *Acta Oecologia* **19**, 89-95.
- Lindstrom, M.J., Bates, D.M., 1990. Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics* **46**, 673-687.

- Liu, Y.G., Zhang, H.Z., Zeng, G.M., Huang, B.R., Li, X., 2006. Heavy metal accumulation in plants on Mn mine tailings. *Pedosphere* **16**, 131-136.
- McLaughlin, M.J., 2001. Bioavailability of metals to terrestrial plants. In: Allen, H.E. (Ed.), *Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems. Importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes and plants*. SETAC Press, Pensacola, FL, USA, pp. 39-68.
- McMillen, S.J., van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Linder, G.L., Pauwels, S.J., Stephenson, G.L., 2003. Biological measures of bioavailability. In: Lanno, R.P. (Ed.), *Contaminated soils: from soil-chemical interactions to ecosystem management*. SETAC Press, Pensacola, FL, USA, pp. 293-343.
- Menta, C., Parisi, V., 2001. Metal concentrations in *Helix pomatia*, *Helix aspersa* and *Arion ater*: a comparative study. *Environ. Pollut.* **115**, 205-208.
- Moriarty, F., 1983. *Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems*, Academic Press, London, 233 pp.
- Newman, M.C., Mulvey, M., Beeby, A., Hurst, R.W., Richmond, L., 1994. Snail (*Helix aspersa*) exposure history and possible adaptation to lead as reflected in shell composition. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **27**, 346-351.
- Notten, M.J.M, Oosthoek, A.J.P, Rozema, J., Aerts, R., 2005. Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environ. Pollut.* **138**, 178-190.
- Peijnenburg W.J.G.M., Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotox. Environ. Safe.* **56**, 63-77.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., Eijsackers, H.J.P., Allen, H.E., 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotox. Environ. Safe.* **37**, 163-172.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., Zweers, P.G.P.C., Baerselman, R., de Groot, A.C., van Veen, R.P.M, Jager, T., 1999. Prediction of metal bioavailability in Dutch field soils for the Oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Ecotox. Environ. Safe.* **43**, 170-186.
- Phillips, D.J.H., 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. A review. *Environ. Pollut.* **13**, 281-317.
- Pinheiro, J.C., Bates, D.M., 2000. *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. Springer-Verlag, New-York, USA, 528 pp.
- Potts, D.C., 1975. Persistence and extinction of local populations of the garden snail *Helix aspersa* in unfavourable environments. *Oecologia* **21**, 313-334.

- R Development Core Team, 2005. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Russell, L.K., DeHaven, J.I., Botts, R.P., 1981. Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **26**, 634-640.
- Scheifler, R., Ben Brahim, M., Gomot-de Vaufleury, A., Carnus, J.M., Badot, P.M., 2003. A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails. *Environ. Pollut.* **122**, 343-350.
- Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A., Toussaint, M.L., Badot, P.M., 2002. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* **48**:571-579.
- Scheifler, R., de Vaufleury, A., Coeurdassier, M., Crini, N., Badot, P.M., 2006. Transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: a microcosm study. *Environ. Toxicol. Chem.* **25**, 815-822.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1997. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W.H. Freeman, NY, USA, 880 pp.
- Spacie, A., Hamelink, J.L., 1985. Bioaccumulation. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (Eds), Fundamentals of aquatic toxicology. Hemisphere Corp., Washington, pp. 495-525.
- Spellerberg I.F., 2005. Monitoring ecological change. Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge, England, 410 pp.
- 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.
- Tarazona, J.V., Vega, M.M., 2002. Hazard and risk assessment of chemicals for terrestrial ecosystems. *Toxicology* **181-182**, 187-191.
- van Straalen, N.M., Donker, M.H., Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., 2005. Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environ. Pollut.* **136**, 409-417.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Jager, T., van Straalen, N.M., Wolterbeek, H.T., van Gestel, C.A.M., 2006. Kinetics of Zn and Cd accumulation in the isopod *Porcellio scaber* exposed to contaminated soil and/or food. *Soil Biol. Biochem.* **38**, 1554-1563.
- Williamson, P., 1979. Comparison of metal levels in invertebrate detritivores and their natural diets: concentrations factors reassessed. *Oecologia* **44**, 75-79.

Chapitre VI

Discussion générale et perspectives



Chapitre VI

Discussion générale et perspectives

L'approche pluridisciplinaire mise en œuvre au cours du présent travail de recherche a permis d'étudier les transferts des ETM depuis le sol, réceptacle majeur des pollutions dans les écosystèmes terrestres, vers un consommateur primaire, l'escargot *Helix aspersa*. Si plusieurs thèses de doctorat se sont déjà intéressées à l'escargot, à ses capacités de bioindication (Coeurdassier, 2001 ; Pihan, 2001 ; Viard-La Rocca, 2004) et à sa place dans les réseaux trophiques (Scheifler, 2002 ; Notten, 2005), aucune ne s'est focalisée sur l'intégration du facteur temps dans l'analyse du transfert et des effets des ETM qui constitue l'originalité principale du travail présenté ici.

Les résultats des chapitres précédents soulèvent, en réponse aux objectifs fixés dans le Chapitre I, quatre axes majeurs de discussion concernant les apports des cinétiques d'accumulation et d'élimination, leur interprétation toxicodynamique, leur contribution au développement d'une méthode d'évaluation de la biodisponibilité environnementale et enfin, des recommandations et des perspectives visant à améliorer l'évaluation des transferts des ETM.

VI.1. Apports des cinétiques d'accumulation et d'élimination

VI.1.1. Cinétiques d'accumulation

Jusqu'à présent, l'évaluation de l'accumulation des ETM chez *H. aspersa* reposait sur la mesure des concentrations internes après une durée d'exposition donnée, généralement 28 jours (Coeurdassier et al., 2000 ; Gomot-de Vaufleury et Pihan, 2002 ; Scheifler et al., 2002b). Si ce type d'approche à moyen terme a permis d'évaluer les capacités d'accumulation d'*H. aspersa*, l'intensité du transfert des ETM depuis l'environnement (nourriture et/ou sol) et d'estimer, dans une première approche, leur biodisponibilité, aucune information sur leur comportement cinétique n'était disponible. Quelle est donc la représentativité de cette durée d'exposition pour la caractérisation du transfert sol-escargot de trois ETM contaminant fréquemment les sols ? Les résultats présentés dans les Chapitres II, IV et V permettent de répondre à cette question et au problème soulevé dans la Figure I.7. L'un des intérêts de suivre l'évolution des concentrations internes dans le temps est de déterminer la durée d'exposition nécessaire pour atteindre un état d'équilibre entre le milieu et l'organisme. Ce n'est qu'à cette condition que les estimations des potentiels de bioaccumulation fourniront

une information pertinente en accord avec les aspects dynamiques de l'accumulation développés en Chapitre I (Peijnenburg et al., 1999b). Les concentrations internes en Cd dans les escargots exposés au laboratoire à des sols contaminés atteignent un état d'équilibre après environ 14 jours d'exposition. Par contre, les patterns d'accumulation particuliers observés pour le Pb et le Zn (Chapitre IV, résultats complémentaires) montrent qu'une exposition de 28 jours pourrait conduire à une évaluation erronée des potentiels d'accumulation de ces ETM, l'équilibre interne n'étant pas atteint même après 84 jours d'exposition au sol contaminé. Il est cependant important de noter que ces cinétiques et les équilibres potentiels, exprimés en concentrations, sont sous l'influence de la croissance des organismes et donc d'une dilution par l'augmentation de masse. Ceci est particulièrement visible si l'on compare les données exprimées en concentrations ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{g}^{-1}$ esc.) et les données exprimées en quantités ($\mu\text{g}_{\text{ETM}}\cdot\text{esc.}^{-1}$) (Chapitre IV, résultats complémentaires). Dans le cas d'organismes en croissance, l'utilisation des quantités totales accumulées permet de s'affranchir des variations de masse. Le Cd présente une accumulation linéaire, sur la durée d'exposition considérée (84 jours), les quantités internes en Pb atteignent un état d'équilibre après environ 42 jours d'exposition au sol contaminé et le Zn augmente quasi-linéairement, laissant entrevoir l'existence d'un état d'équilibre mais non atteint au cours de la phase d'exposition étudiée (Chapitre IV). Dans tous les cas, une durée d'exposition subchronique de 28 jours s'avère trop courte pour atteindre, dans les conditions d'exposition standard (ISO, 2006), un état d'équilibre dans les quantités internes accumulées. En conditions non contrôlées, l'accumulation du Cd dans les escargots exposés durant 56 jours sur le terrain, s'avère également linéaire, aussi bien en concentrations qu'en quantités (car il n'y a pas de croissance des individus) (Chapitre V). En fonction de l'unité choisie, le calcul des FBA statiques, classiquement déterminés après 28 jours d'exposition par le rapport de la concentration interne sur la concentration d'exposition, peut prêter à confusion dans l'interprétation des potentiels de bioaccumulation de ces ETM (Tableau VI.1).

FBA 28 jours		
	Concentrations	Quantités
Cd	=	<
Pb	>	<
Zn	>	<

Tableau VI.1. Sous-estimation (<) et sur-estimation (>), par rapport à l'état d'équilibre, des potentiels de bioaccumulation du Cd, du Pb et du Zn par les FBA statiques 28 jours dans les escargots juvéniles exposés à un sol contaminé (ME4).

Les expositions subchroniques ont pour vocation de répondre, dans des délais compatibles avec des procédures de routine, aux exigences d'évaluation de la bioaccumulation et/ou de la toxicité de substances. Des durées d'exposition supérieures à trois mois ne sont pas conciliables avec cette demande. Il est donc utile de considérer, sur la base de ces résultats, un moyen susceptible de réduire les durées d'exposition des organismes, tout en conservant l'objectif d'obtenir des valeurs d'état d'équilibre et de potentiels de bioaccumulation fiables. Les modèles toxicocinétiques peuvent être utilisés dans cette voie (Wen et al., 1999 ; Walker et al., 2005). En effet, comme exposé dans le Chapitre I, le modèle toxicocinétique de premier ordre à un compartiment permet, suite à l'ajustement aux données, d'estimer des flux en ETM entrant (flux d'absorption, a) et sortant (taux d'excrétion, k_2) de l'organisme. Leur rapport détermine la quantité ou concentration interne à l'équilibre. En divisant le flux d'absorption par la concentration externe en ETM biodisponible (C_e), un taux d'absorption (k_1) peut être calculé. Le rapport taux d'absorption sur taux d'excrétion permet alors d'estimer un FBA dit cinétique (OECD, 1996).

Si les quantités internes à l'équilibre chez l'escargot *H. aspersa* en croissance ne sont pas quantifiables pour le Cd lors d'une exposition de trois mois à de faibles concentrations du fait de l'estimation de taux d'excrétion non significatifs (aussi bien en conditions contrôlées en laboratoire, Chapitre II, qu'en conditions naturelles *in situ*, Chapitre V), cela est tout à fait possible pour le Pb et le Zn (Chapitre IV). Le tableau VI.2 présente les estimations des quantités à l'équilibre ($Q_{eq.}$) calculées à partir des flux d'absorption et d'excrétion obtenus en ajustant les modèles toxicocinétiques aux données d'accumulation des escargots exposés au sol ME4.

	ETM	a $\mu\text{g}_{\text{ETM.esc.}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$	k_2 j^{-1}	$Q_{eq.}$ $\mu\text{g}_{\text{ETM.esc.}}^{-1}$
	Cd	0,059 ^a	-0,009 ^a	-
Viscères	Pb	1,273 ^b	0,040 ^b	31,82
	Zn	7,069 ^c	0,020 ^c	353,45
	Cd	0,004 ^a	-0,017 ^a	-
Pied	Pb	0,117 ^b	0,062 ^b	1,88
	Zn	0,468 ^c	0,016 ^c	30,37

Tableau VI.2. Paramètres cinétiques et estimation des quantités à l'équilibre du Cd, Pb et Zn accumulés dans l'escargot *H. aspersa* exposé en laboratoire au sol ME4. Les valeurs présentant des lettres identiques ne sont pas significativement différentes ($p > 0,05$).

Si les quantités à l'équilibre renseignent sur les charges en ETM transférables dans les réseaux trophiques, les concentrations à l'équilibre, obtenues par une démarche similaire et témoignant d'un équilibre entre absorption et élimination (cette dernière résultant de l'excrétion et de la dilution par la croissance), sont étroitement associées aux effets toxiques des ETM difficilement ou lentement régulés (Peijnenburg et al., 1997). Si cet équilibre est modifié par une augmentation du flux d'absorption (liée à une modification de l'exposition ou de la biodisponibilité), l'excès d'ETM libre dans l'organisme est susceptible d'engendrer une perturbation des processus physiologiques (Rainbow, 2006).

Les concentrations à l'équilibre déterminées, le potentiel de bioaccumulation de l'ETM considéré peut être évalué par l'estimation du FBA cinétique dont le calcul intègre le taux d'absorption (k_1). Son estimation doit être basée sur la concentration externe biodisponible (Peijnenburg et al., 1999b). Comme développé dans le chapitre I, la biodisponibilité des ETM pour les organismes du sol dépend de nombreux facteurs dont la voie et la source d'exposition (Peijnenburg et Jager, 2003). Ces facteurs sont bien définis chez certains organismes, comme les vers de terre chez lesquels l'exposition cutanée et la phase liquide du sol contribuent très largement à la bioaccumulation des ETM (Vijver et al., 2003). Ainsi, il est généralement admis que le pool biodisponible des ETM pour ces organismes est convenablement décrit par une extraction chimique simple au CaCl_2 (Oste et al., 2001 ; Becquer et al., 2005 ; Hobbelen et al., 2006). Pour d'autres organismes, aux voies et sources d'exposition multiples (digestive et cutanée) comme les isopodes ou les escargots, aucune méthode d'extraction chimique simple n'a, à l'heure actuelle, permis d'obtenir une estimation fiable du pool biodisponible pour ces organismes (Koster et al., 2005). La première approche en laboratoire (Chapitre II) a ainsi utilisé les concentrations totales en Cd dans le sol pour déterminer les taux d'absorption et ce afin d'obtenir des FBA cinétiques comparables avec ceux obtenus en conditions similaires par la méthode statique 28 jours (Coeurdassier et al., 2002). L'équilibre dans les concentrations internes en Cd étant atteint dans les deux expérimentations, les FBA cinétiques et statiques ont des valeurs très proches. Dans l'approche *in situ* (Chapitre V), l'existence de sources de contamination multiples (sol et plantes) empêche l'estimation des taux d'absorption et le calcul des FBA cinétiques.

VI.1.2. Cinétiques d'élimination

Si les escargots sont capables d'accumuler les ETM à des niveaux plus ou moins importants selon l'élément considéré et suivant des cinétiques diverses, très peu

d'informations étaient disponibles concernant le caractère réversible ou non de l'accumulation. A notre connaissance, une seule étude a examiné les capacités d'excrétion du Cd, du Cu, du Pb et du Zn de l'escargot *H. pomatia* précédemment exposé à de la laitue contaminée (Dallinger et Wieser, 1984a). Durant les 50 jours de la phase de dépuración, aucune élimination nette de ces ETM n'a été observée. Les sources de contamination étant susceptibles de modifier l'accumulation et l'élimination des ETM par les organismes (Rainbow, 2002), il était utile de connaître, lors d'une contamination par le sol uniquement, le comportement des ETM après transfert sur sol non contaminé (Chapitres II et IV). Pour le Cd, deux réponses différentes ont été observées : pour les escargots exposés au sol ME4 et ayant accumulé peu de Cd, aucune excrétion n'a été mise en évidence. Pour les escargots exposés aux sols artificiels contaminés (ISO 20 et ISO 100) et ayant accumulé le Cd à des niveaux relativement élevés, une élimination significative a été observée, consistant d'une part en l'excrétion de formes libres du Cd et d'autre part en la redistribution du métal des viscères au pied. Cependant, une part importante du Cd accumulé reste stockée à la fois dans le pied et les viscères des escargots. Concernant le Pb, environ 60% des quantités accumulées au cours de la phase d'exposition sont rapidement excrétés (42 jours), après quoi un état d'équilibre s'établit, soulignant des capacités de stockage à long terme. Le Zn, enfin, est faiblement excrété, n'entraînant pas, au cours des 84 jours de la phase de dépuración, de diminution significative des quantités accumulées. L'utilisation d'un modèle toxicocinétique comportant une fraction résiduelle a permis de mettre clairement en évidence l'élimination biphasique et les capacités particulières de stockage d'*H. aspersa* par rapport à d'autres espèces comme *H. pomatia* ou *Arianta arbustorum* (Berger et al., 1993). Cependant, comprendre la représentativité biologique et écotoxicologique des différents compartiments identifiés nécessite des connaissances approfondies sur la toxicodynamique des ETM à l'intérieur de l'organisme.

VI.2. Les dynamiques internes de la bioaccumulation : toxicodynamique

Pour comprendre les processus physiologiques sous-jacents aux cinétiques d'accumulation et d'élimination des ETM, il est nécessaire de connaître les mécanismes de séquestration internes et leur signification biologique et écotoxicologique (Vijver et al., 2004). Si un certain nombre d'études a été mené, souvent séparément, sur les formes de stockage des ETM, leur induction et leur fonction chez l'escargot (Howard et al., 1981 ; Simkiss et al., 1982 ; Dallinger et Berger, 1993 ; Dallinger et al., 2000 ; Chabicovsky et al., 2003), peu de

travaux ont tenté d'utiliser ces connaissances pour mieux comprendre les dynamiques internes des ETM et leurs patterns d'accumulation et d'élimination (Rainbow, 2002).

VI.2.1. Distribution, stockage et excrétion

Une fois assimilés, les ETM sont pris en charge par le système circulatoire hémolymphatique et sont distribués dans l'organisme. Sur la base des résultats du chapitre IV, un modèle physiologique général des échanges de métaux à l'intérieur du corps de l'escargot est proposé en Figure VI.1.

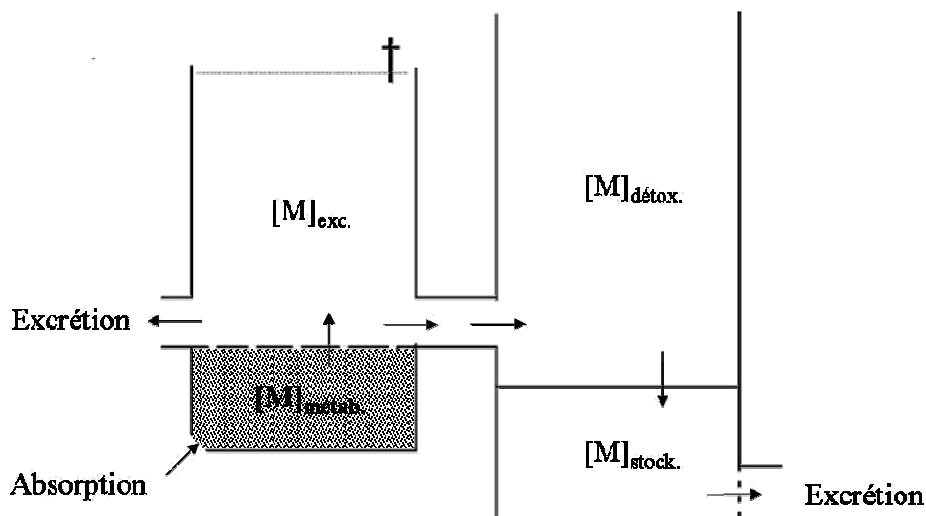


Figure VI.1. Schéma généralisé montrant les différents compartiments dans lesquels les ETM peuvent être présents et s'accumuler à l'intérieur d'un escargot (modifié de Rainbow, 2002). $[M]_{\text{métab.}}$ est le pool de métal métaboliquement disponible ; $[M]_{\text{exc.}}$ est le pool de métal en excès par rapport aux besoins métaboliques ; $[M]_{\text{stock.}}$ est le pool de métal stocké et $[M]_{\text{détox.}}$ est le pool de métal détoxiqué. † symbolise le seuil de mortalité.

Après assimilation, l'ETM sera d'abord disponible pour le métabolisme, en particulier s'il s'agit d'un métal essentiel. Si l'exposition et l'absorption se poursuivent, le métal excédant les besoins métaboliques devra être détoxiqué, soit via son excrétion à l'extérieur de l'organisme, soit via son stockage sous une forme soluble ou insoluble, pour prévenir sa diffusion aux tissus où il pourra interférer avec des réactions biochimiques (Simkiss, 1977; Rainbow, 2006). Deux principaux types de structures de détoxification et de stockage ont été identifiés chez les escargots (Chapitre I) : les métallothionéines (MTs) et les granules, qui vont lier de manière plus ou moins spécifique certains ETM selon leur affinité pour certains types de ligands. Au cours de la phase d'exposition au sol contaminé (Chapitre IV), le Cd a essentiellement été retrouvé en solution dans le cytosol (fraction C). Chabicovsky et al.

(2003) ayant démontré l'induction de Cd-MTs dans le cytoplasme des cellules à calcium, des cellules digestives et excrétrices de l'hépatopancréas, ainsi que dans les cellules épithéliales du tube digestif et dans les cellules des muscles du pied chez *H. pomatia* exposé à de la laitue contaminée, il est probable que l'absence d'effets toxiques chez les escargots exposés au sol ME4 (Chapitre III) soit due à la séquestration du Cd par des protéines thermostables du cytosol telles que les MTs. Les MTs constituent une superfamille de métalloprotéines de faible poids moléculaire, riches en cystéine et responsables à la fois de la protection des cellules contre les ETM toxiques tels le Cd ou le mercure (Dallinger et al., 2000) et de la régulation homéostatique d'ETM essentiels comme le Zn ou le Cu (Dallinger, 1993). Cette double compétence explique probablement la présence, chez *H. aspersa*, de fortes proportions de Zn accumulées dans le cytosol (44% dans les cellules épithéliales du tube digestif). Le Zn s'est également accumulé significativement dans la fraction granulaire (fraction D, 36% dans les viscères). Le transfert d'une partie du Zn lié aux MTs dans les granules où il est séquestré correspond aux voies de détoxification intracellulaire décrites chez les invertébrés du sol. En effet, selon Hopkin (1989), les ETM de classe A (ayant une affinité de liaison avec des ligands oxygénés) sont incorporés dans des granules (granules de type A) alors que les ETM de type B (ayant une affinité de liaison avec des ligands soufrés ou azotés, comme le Zn, le Cd ou le Cu) ont tendance à se lier à des métalloprotéines cytoplasmiques. Ces dernières peuvent alors être excrétées sous la forme de granules de type B après action lysosomale (corps résiduels ; Pihan, 2001). Appartenant à la classe intermédiaire, le Pb peut être incorporé dans les deux types de granules (Hopkin, 1989). Cependant, chez *H. aspersa* (Chapitre IV), sa forte accumulation dans la fraction granulaire (55% dans les viscères, pour seulement 8% retrouvé dans la fraction C) laisse supposer que son incorporation dans les granules diffère de celle observée pour le Zn. Ces résultats (Chapitre IV) sont en accord avec ce qui a été montré dans l'hépatopancréas d'*H. pomatia* où 50 à 80% du Zn accumulé était associé à des granules de pyrophosphate alors que 90% du Pb accumulé était retrouvé dans des débris cellulaires (lysosomes) et des granules de lipofuscine (Dallinger et Wieser, 1984b).

Si durant la phase d'exposition différents types de ligands réactifs peuvent être induits ou métabolisés, ils sont également susceptibles d'être excrétés. Le suivi du fractionnement subcellulaire durant la phase de dépuration permet de souligner certains phénomènes peu observés chez d'autres invertébrés du sol. L'absence d'excrétion du Cd est à mettre en relation avec le faible renouvellement des MTs et leur fort potentiel de reséquestration (Bebiano et Langston, 1998). A noter cependant, une très faible (3%) diminution des

concentrations en Cd dans la fraction cytosolique des cellules épithéliales du tube digestif qui pourrait représenter une voie d'excrétion via les fèces par l'extrusion de corps résiduels dans la lumière du tube digestif (Dallinger et Wieser, 1984a, Chabicovski et al., 2003). La diminution importante des concentrations en Pb dans la fraction granulaire souligne la capacité d'*H. aspersa* à excréter ces formes de stockage insolubles. Les mécanismes mis en œuvre impliquent probablement l'exocytose des granules de lipofuscine dans la lumière du tube digestif (Simkiss et al., 1982 ; Dallinger, 1993). Si aucune excrétion marquée du Zn n'a été observée, des échanges entre les fractions granulaire et résiduelle (débris cellulaires, fraction E) ont été identifiés. Ils soulignent l'importance de la transition lysosomale entre le Zn granulaire et cytosolique. Tant que le Zn est associé à des protéines solubles du cytosol (probablement MT), il ne peut être éliminé. Les processus d'excrétion ne se mettent en place qu'une fois le Zn intégré aux granules. Ces modifications biochimiques intracellulaires ne sont pas instantanées et l'excrétion de cet ETM est donc très progressive, comme observé en Chapitre IV.

La répartition subcellulaire des ETM conditionne donc leur séquestration et/ou leur stockage dans différents organes et tissus de l'escargot et leur excrétion. Ces informations sont par conséquent très utiles pour une meilleure compréhension des patterns d'accumulation et d'élimination des ETM mais également de la sensibilité des organismes (Rainbow, 2006).

VI.2.2. Effets toxiques

La distinction de deux états des ETM accumulés (métaboliquement disponibles ou détoxiqués) a des implications dans l'induction d'effets toxiques dans un organisme. Tant que le flux d'absorption d'un ETM (intégrant les différentes sources d'exposition) est inférieur à la combinaison des taux de détoxification et d'excrétion (élimination *sensu largo*), il ne s'accumule pas dans le pool disponible pour le métabolisme et aucune toxicité n'est induite (Rainbow, 2002 ; Marsden et Rainbow, 2004). Par contre, si la vitesse d'assimilation est plus rapide que la vitesse d'élimination du métal, alors la concentration interne en ETM métaboliquement disponible excédera un seuil et le métal toxique pourra interférer avec les fonctions métaboliques normales (Figure VI.1). Les invertébrés, et en particulier les escargots comme démontré précédemment, n'excrètent pas tous les ETM. Dans ce cas c'est le taux de détoxification seul qui doit compenser le taux d'absorption et empêcher l'induction d'effets toxiques. Les taux d'excrétion décroissants du Cd, du Pb et du Zn expliquent ainsi les importantes différences de toxicité des ETM pour *H. aspersa* illustrées, par exemple, par les

CE₅₀ croissance (concentration efficace entraînant une inhibition de croissance de 50%) estimées à 150, 5800 et >30000 µg.g⁻¹ nourriture pour le Cd, le Zn et le Pb, respectivement (Gomot-de Vaufleury, 2000). Un autre corollaire est que la concentration en ETM détoxiqué ([M]_{détox.}, Figure VI.1) n'est pas directement liée à l'induction d'effets toxiques et peut donc être très élevée (comme peut l'être la concentration interne totale) sans pour autant entraîner d'effets délétères (Rainbow, 2002). L'induction d'une toxicité peut survenir à n'importe quelle concentration interne totale si le flux d'absorption ou le taux d'élimination (détoxification et excrétion) sont modifiés de telle façon que leur équilibre est changé en faveur de l'absorption durant une période suffisante pour que les concentrations métaboliquement disponibles dépassent un seuil. Ceci implique par exemple une modification de l'exposition ou de la biodisponibilité entraînant une augmentation de l'absorption ou une surcharge des mécanismes de détoxification (Chabicoovsky et al., 2004).

Si les ETM sont connus pour leur toxicité directe en liaison avec, par exemple, des dommages irréversibles sur certaines enzymes ou sur l'ADN, ils peuvent également perturber de manière indirecte des processus physiologiques importants en entrant en compétition avec certains éléments essentiels tels que le calcium (Ca) (Craig et al., 1999 ; Beeby et al., 2002 ; Molnár et al., 2004). L'influence de ces interactions a été évoquée pour expliquer les inhibitions de croissance et les perturbations du cycle de reproduction des escargots exposés aux sols artificiels contaminés par du Cd (ISO 20 et ISO 100, Chapitre III). Chez ces individus, la diminution des réserves en Ca, en liaison avec l'inhibition de croissance de la coquille, peut être responsable du décalage de quatre semaines dans le cycle de ponte, délai probablement nécessaire pour le réajustement des dynamiques du Ca. Même si l'intensité de l'inhibition de croissance était la même (environ 10%), l'évaluation cinétique des effets sur la croissance a permis de souligner la précocité de l'inhibition chez les individus exposés à ISO 100, cette dernière apparaissant 14 jours plus tôt que sur ISO 20. Cette différence, au même titre que celle observée entre ISO 20 et ME4, doit être mise en relation avec des différences de biodisponibilité liées à la physico-chimie des sols. Les flux d'absorption, obtenus dans l'approche toxicocinétique présentée en Chapitre 1, ont été proposés comme indicateurs de la biodisponibilité et comme déterminants des effets sublétaux liés à l'exposition d'organismes à des milieux contaminés (van Straalen et al., 2005). Les effets sublétaux observés sur la croissance et la reproduction (Chapitre III) doivent donc être mis en relation avec les pools d'ETM disponibles pour les organismes et potentiellement disponibles pour exercer des effets délétères (directs ou indirects) (Peijnenburg et Jager, 2003).

VI.3. Contribution au développement d'une méthode d'évaluation de la biodisponibilité et des transferts des ETM du sol pour l'escargot

VI.3.1 Intérêt du suivi cinétique de l'accumulation par rapport aux études statiques

L'évaluation de la biodisponibilité des ETM dans l'environnement est un problème complexe qui implique différents aspects, chimiques, physiques et biologiques (Chapitre I). La biodisponibilité *sensu largo* est un concept qualitatif qui ne peut être simplement défini par quelques mesures chimiques ou biologiques isolées car elles sont souvent valides uniquement pour des organismes et des conditions spécifiques (Meyer, 2002). Plutôt que d'entreprendre de définir et d'évaluer la biodisponibilité des ETM d'une manière générique, une stratégie intéressante serait de développer une série d'indicateurs, biologiques et chimiques, par lesquels les différentes composantes de la biodisponibilité (disponibilité environnementale, biodisponibilité environnementale, biodisponibilité toxicologique) pourraient être quantifiées d'une manière opérationnelle. McMillen et al. (2003) ont ainsi proposé que les mesures biologiques de la biodisponibilité (transfert et accumulation) devraient faire partie intégrante de la série d'indicateurs utilisables pour l'évaluation de la biodisponibilité.

Il est généralement reconnu que l'ultime mesure de la biodisponibilité environnementale est l'assimilation par les organismes et de nombreux travaux ont donc approché le problème de l'évaluation de la biodisponibilité des ETM en mesurant leurs concentrations à l'intérieur des organismes et/ou les effets induits. Si l'accumulation dans l'organisme après une durée d'exposition donnée donne une image de ce qui est biodisponible, cette vision est incomplète, principalement pour deux raisons :

- ✓ elle est en désaccord avec les principes dynamiques de la bioaccumulation (prise en compte du facteur temps, connaissance des équilibres, influences environnementales...),
- ✓ en ne prenant en compte que les quantités en ETM stockées (résultantes de l'assimilation et de l'excrétion), elle sous-estime ce qui a réellement été transféré, l'excrétion étant, pour certains ETM, non négligeable.

La prise en considération de ces éléments fondamentaux nécessite le développement d'approches nouvelles. Comme il a été démontré dans les chapitres précédents, l'utilisation des modèles toxicocinétiques permet de répondre à ces besoins.

Dans le chapitre V, différentes approches ont été mises en oeuvre pour tenter d'évaluer, en microcosmes *in situ*, différents aspects de la biodisponibilité (exposition, accumulation, effets toxiques potentiels) du Cd d'un sol pour l'escargot *H. aspersa* et

l'influence de facteurs environnementaux sur le transfert de cet ETM. De nombreux paramètres ont ainsi été mesurés : concentrations totales dans les sols, concentrations chimiquement disponibles (estimées sur la base d'extractions au CaCl_2), concentrations dans les parties aériennes des plantes (nourriture), concentrations totales dans les escargots et flux d'absorption. Si les extractions chimiques mettent en évidence des différences de disponibilité environnementale entre les parcelles contaminées, ces différences ne transparaissent pas dans les concentrations internes en Cd mesurées après 56 jours d'exposition (Figure VI.2).

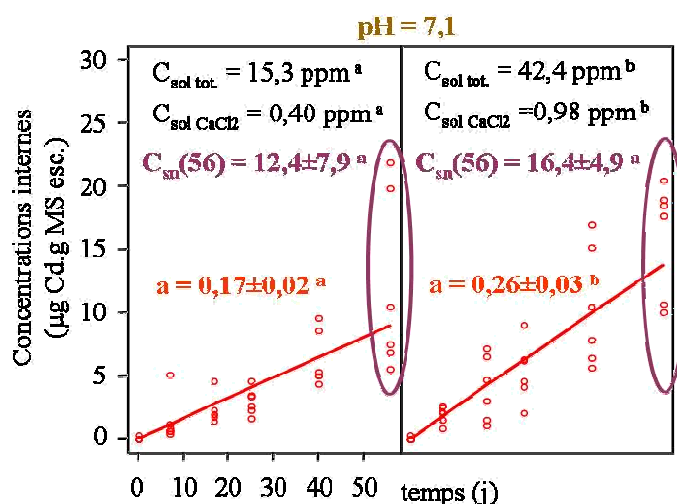


Figure VI.2. Cinétiques d'accumulation du Cd *in situ* sur deux parcelles présentant des contaminations différentes. Comparaison des flux d'absorption (a, $\mu\text{g Cd.g}^{-1} \text{esc.j}^{-1}$) et des concentrations internes à 56 jours (C_{sn}(56), $\mu\text{g Cd.g}^{-1} \text{esc}$).

La comparaison des mesures statiques (concentrations internes à 56 jours mais également pour chaque durée d'exposition) aurait conduit à la conclusion que la biodisponibilité environnementale du Cd est identique sur les deux parcelles. Cependant, le suivi toxicocinétique permet de déterminer des flux d'absorption (a) significativement différents sur les deux parcelles (Figure VI.3). Suivant les recommandations de van Straalen et al. (2005) et d'après les premières interprétations tirées de l'approche toxicocinétique en laboratoire (Chapitre II), nous pouvons conclure que les flux d'absorption, fortement corrélés à la disponibilité environnementale évaluées par extractions au CaCl_2 (Tableau VI.2), peuvent être utilisés comme indicateur de la biodisponibilité environnementale du Cd pour l'escargot *H. aspersa*. L'absence d'excrétion et l'impossibilité de déterminer un taux d'absorption (k_1) (du fait de l'existence de sources de contaminations multiples dont on ne connaît pas la part respective dans la contamination des escargots) ne permettent d'estimer les concentrations à l'équilibre ou les BAF cinétiques. Cependant, sachant que l'excrétion est indépendante de la

concentration de la substance dans le milieu et de sa biodisponibilité, les différences d'absorption conduiraient, sur une durée d'exposition suffisante, à des concentrations à l'équilibre, et donc des BAF, différents sur les parcelles étudiées. Cet équilibre n'étant pas atteint après 56 jours d'exposition, les mesures statiques des concentrations internes ne permettent pas de mettre en évidence les différences de biodisponibilité.

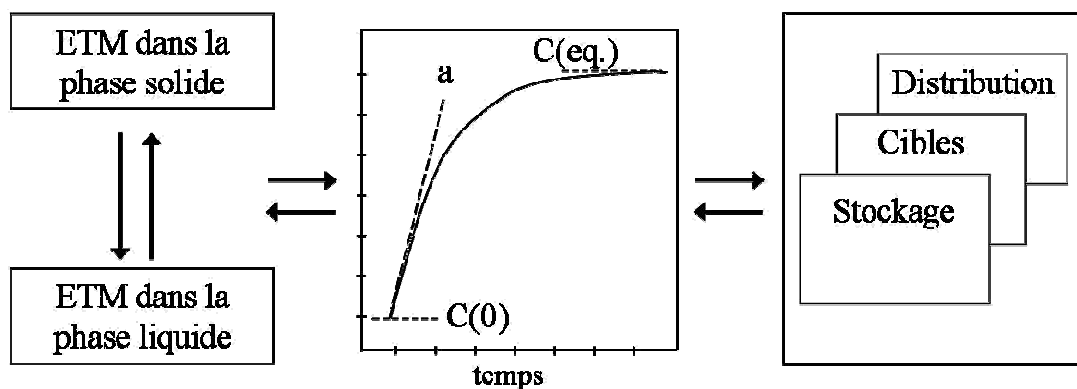


Figure VI.3. Principaux processus impliqués dans le concept de biodisponibilité. La disponibilité environnementale est envisagée comme la partition des ETM entre la phase solide du sol et l'eau interstitielle (à gauche). La biodisponibilité environnementale est représentée par les caractéristiques toxicocinétiques de l'absorption (flux d'absorption, a , et la concentration à l'équilibre, $C(eq.)$, au centre) (Chapitres II, IV et V). La biodisponibilité toxicologique est présentée (à droite) sur la base de la distribution interne, du transport aux sites cibles d'action toxique et des processus de stockage des métaux accumulés (Chapitre IV). Adapté de Peijnenburg (2002).

La biodisponibilité dépend de l'organisme considéré, ce qui est biodisponible pour un organisme ne l'est pas forcément pour un autre (en particulier si les voies et sources de contamination diffèrent). La biodisponibilité doit donc être définie pour une cible biologique définie ou préférentiellement, pour une série de cibles biologiques. Au moment où la toxicité commence à être mesurée sur des assemblages d'espèces (Beck et al., 2005 ; Breure et al., 2005 ; Römbke et Breure, 2005), la biodisponibilité des ETM doit également être évaluée pour différentes espèces (van Straalen et al., 2005). Des protocoles standardisés doivent être développés pour définir les conditions d'exposition des organismes et obtenir des courbes d'absorption comparables et des indicateurs pertinents de la biodisponibilité (McMillen et al., 2003). Si une base de données suffisamment importante est obtenue, des valeurs de références pourront être définies pour les flux d'absorption, à partir desquelles des comparaisons pourront être réalisées. Une partie des résultats présentés dans cette thèse œuvre dans ce sens.

Dans la lignée des travaux de Rainbow (2002) et van Straalen et al. (2005), nous avons souligné les aspects biologiques et dynamiques de la biodisponibilité des ETM pour l'escargot *H. aspersa*. En complément à cette première approche et pour une pleine compréhension de la biodisponibilité des ETM dans les sols, les perspectives devront s'attacher à déterminer

comment prédire la biodisponibilité à partir des concentrations (totales, extractibles, en solution...) en ETM dans le sol et de ses propriétés physico-chimiques d'importance comme le pH ou les taux d'argile ou de matière organique (Peijnenburg et al., 1997; Lock and Janssen, 2001; van Gestel and Koolhaas, 2004). La question qui doit être posée est : de quel(s) pool(s) chimiquement défini(s) les escargots absorbent-ils les ETM et quels sont les facteurs du sol et de l'environnement qui déterminent ce(s) pool(s) ?

VI.3.2 Facteurs influençant le transfert

L'influence de plusieurs paramètres environnementaux a été évaluée en exposant *in situ*, au printemps et en automne, des escargots calibrés (taille, âge...) sur des parcelles présentant un gradient de contamination et de pH (Chapitre V). Au sein des microcosmes, les animaux étaient exposés au Cd du sol à la fois directement *via* l'ingestion de particules et la diffusion du Cd par l'épithélium du pied et indirectement *via* la nourriture composée par les espèces végétales peuplant les parcelles. Les plantes répondent à la contamination du sol en présentant des concentrations en Cd dans les parties aériennes dépendantes de la concentration en Cd dans le sol (Tableau VI.3). Les escargots présentent des flux d'absorption (a) corrélés à la fois aux concentrations en Cd dans le sol et aux concentrations en Cd dans les parties aériennes des plantes (excepté pour *Ranunculus repens*). S'il est difficile de déterminer sans ambiguïté la part de chaque source de contamination dans le transfert du Cd à l'escargot, les coefficients de détermination (r^2) largement supérieurs pour les relations sol-escargot suggèrent l'importance de la source sol dans le transfert du Cd au sein de cette chaîne trophique. L'utilisation des modèles toxicocinétiques pourrait, dans une expérimentation spécialement conçue, permettre de faire la part entre ce qui vient du sol et ce qui vient de la nourriture, comme l'ont démontré Vijver et al., (2006) chez l'isopode *Porcellio scaber*.

Si le pouvoir de résolution des escargots concernant la contamination du sol s'est révélé très satisfaisant en permettant de distinguer, sur la base des flux d'absorption, des concentrations dans le sol de 15 et 40 $\mu\text{g Cd.g}^{-1}$ sol sec, aucune réponse marquée à la variation de pH (1 unité) n'a été observée. Ce type de variation physico-chimique est cependant connu pour affecter les concentrations et les formes des ETM dans la phase liquide du sol, leur accumulation et leur toxicité dans les plantes (Peijnenburg et al., 2000 ; Chapitre V) et les organismes (Spurgeon et al., 2006) fortement exposés à la solution du sol. L'absence de réponse d'*H. aspersa* doit être mise en relation avec la prépondérance de la voie digestive

dans le transfert et l'accumulation du Cd, et plus particulièrement de la phase solide du sol (Tableau VI.3, d'après les données du Chapitre V).

Tableau VI.3. Résultats des analyses de régression pour les concentrations en Cd ($\mu\text{g.g}^{-1}$) entre les compartiments sol-plantes ($n=18 \times 3$), sol-escargot (flux d'absorption, a, $n=36$) et plantes-escargot (a, $n=18 \times 3$). Pt=*Poa trivialis*, Tp=*Trifolium pratense*, Rr=*Ranunculus repens*. p, pente; q, ordonnée à l'origine; r^2 , coefficient de détermination. r^2 significatif à * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$; ns=non significatif.

Variables (y-x)	p	q	r^2	
Transfert sol-plantes				
Cd plantes – Cd sol total	0,030	0,005	0,401	**
<i>Cd Pt – Cd sol total</i>	0,037	0,177	0,480	**
<i>Cd Tp – Cd sol total</i>	0,012	0,050	0,555	***
<i>Cd Rr – Cd sol total</i>	0,045	-0,324	0,583	***
Cd plantes – Cd sol CaCl ₂	1,212	-0,028	0,384	**
<i>Cd Pt - Cd sol CaCl₂</i>	1,622	0,088	0,539	***
<i>Cd Tp - Cd sol CaCl₂</i>	0,525	0,028	0,580	***
<i>Cd Rr - Cd sol CaCl₂</i>	1,676	-0,294	0,452	***
Transfert sol-escargot				
a – Cd sol total	0,006	0,051	0,844	***
a – Cd sol CaCl ₂	0,255	0,039	0,908	***
Transfert plantes-escargot				
a – Cd plantes	0,074	0,123	0,303	*
<i>a – Cd Pt</i>	0,085	0,084	0,484	**
<i>a – Cd Tp</i>	0,271	0,082	0,487	**
<i>a – Cd Rr</i>	0,052	0,147	0,250	ns

Le troisième facteur environnemental étudié était la saison. Son influence sur les concentrations internes en Cd et le flux d'absorption ne semble pas liée à une modification du comportement du Cd dans le sol. Elle s'avère plutôt résulter d'une diminution de la masse des organismes exposés en automne qui, à quantités de Cd accumulées égales, présentent des concentrations internes supérieures. Si ce résultat est à mettre en relation avec une diminution de la photopériode (la température, les précipitations et l'hygrométrie étant similaires entre les deux saisons), il soulève cependant le problème du choix de l'unité (concentrations ou quantités), l'utilisation de l'une ou l'autre pouvant conduire à des interprétations différentes du transfert.

VI.3.3 Concentrations ou quantités ?

Sur la base du test d'effet standardisé au niveau international (ISO, 2006), les escargots *H. aspersa* juvéniles ont été choisis comme modèle d'étude. Les modifications de la masse des organismes au cours du temps empêchent, comme explicité dans les chapitres II, IV et V, d'utiliser indifféremment les concentrations ou les quantités pour évaluer les transferts des ETM. Cependant, les deux unités présentant des intérêts complémentaires,

l'objectif ici est de présenter leurs intérêts respectifs et de donner des éléments guidant le choix de l'une ou de l'autre (Figure VI.4).

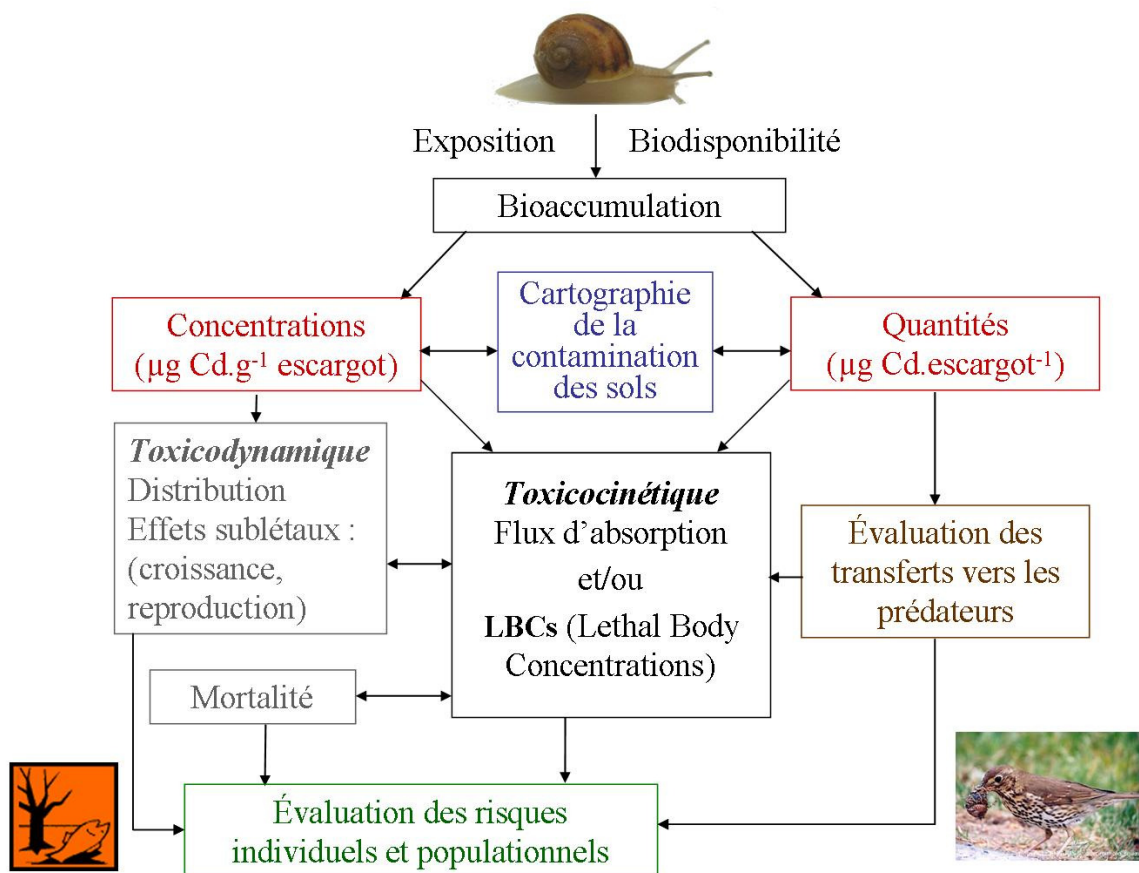


Figure VI.4. Schéma général des concepts développés et de leur implication en évaluation du risque environnemental lié à la contamination des sols par les ETM.

Le critère fondamental dans l'orientation du choix de l'unité est l'objectif de l'étude. Si concentrations et quantités sont utilisables dans les problématiques générales d'évaluation du risque, la caractérisation précise du risque étudié doit déterminer le choix de l'unité (Figure VI.4). Les investigations concernant le risque toxique d'une substance présente dans l'environnement nécessitent de considérer les concentrations internes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ organisme). Les effets sublétaux observés après exposition des organismes à la matrice contaminée, dépendant de la vitesse à laquelle la substance pénètre dans l'organisme, pourront être mis en relation avec les flux d'absorption (van Straalen et al., 2005 ; Chapitre III). La mortalité, quant à elle, dépend du niveau atteint par les concentrations internes : c'est le concept de "lethal body concentration" (LBC) (McCarty et Mackay, 1993 ; Crommentuijn et al., 1994; van Straalen, 1996 ; Lanno et al., 1998). Ce concept présume qu'un organisme mourra à une concentration totale interne donnée en liaison avec l'arrêt d'un certain nombre de fonctions vitales. Si de nombreux travaux rapportent l'intérêt de ce concept, il souffre cependant de certains défauts,

l'un des plus importants, au vu des résultats présentés dans ce mémoire, étant la difficulté voire l'impossibilité d'établir une relation directe entre les concentrations internes atteintes et les effets toxiques chez les organismes capable de détoxifier tout ou partie de l'ETM accumulé. L'utilisation des quantités est spécialement recommandée dans les études visant à étudier les transferts de contaminants dans les réseaux trophiques. Si les quantités totales accumulées durant la phase d'exposition correspondent aux charges ingérables par les prédateurs, elles ne peuvent témoigner des quantités assimilables et potentiellement toxiques, à moins que l'identification des formes de stockages n'ait été réalisée au préalable dans la proie. L'évaluation des effets toxiques potentiels liés à l'ingestion d'une proie contaminée devra alors s'intéresser aux concentrations internes résultantes. L'utilisation des quantités, et des concentrations si les variations de masse des organismes restent faibles, sont également utilisables dans des approches de screening et de cartographie de la contamination des milieux. Le calcul des flux d'absorption (a) est indépendant de l'unité considérée si les organismes conservent une masse constante au cours de l'exposition. Dans le cas contraire, au vu des résultats obtenus, les quantités semblent les plus à même à estimer les flux d'absorption et donc à évaluer les transferts et la biodisponibilité des ETM pour *H. aspersa*.

VI.4. Synthèse et perspectives

L'objectif général de cette thèse est d'améliorer l'évaluation de la bioaccumulation et des effets des ETM et de faire progresser les procédures d'évaluation de leur biodisponibilité par l'étude des cinétiques de transfert du Cd, du Pb et du Zn du sol vers l'escargot *Helix aspersa*. Le suivi à long terme des concentrations et des quantités internes dans l'escargot offre une image des patterns d'accumulation et d'élimination de ces ETM. Le développement et l'application de modèles toxicocinétiques a permis d'obtenir pour la première fois une estimation des flux internes en ETM chez *H. aspersa*. La connaissance de ces paramètres est importante pour la prédiction des concentrations internes à l'équilibre et des FBA, reflets des potentiels de bioaccumulation des ETM. Les cinétiques très contrastées observées pour le Cd, le Pb et le Zn soulignent l'importance des caractéristiques intrinsèques des ETM et de l'organisme considéré qui conditionnent leurs dynamiques internes. L'étude du fractionnement subcellulaire de ces ETM dans différents organes d'*H. aspersa* a permis de mieux comprendre la variabilité des patterns d'accumulation, des stratégies de dépuration et des effets toxiques potentiellement induits. La nature des formes métalliques à l'intérieur de l'organisme et leur propension plus ou moins forte à être excrétées déterminent l'acquisition

d'un état d'équilibre. Le niveau de cet état d'équilibre est quant à lui modulé par les flux d'absorption, directement influencés par la biodisponibilité de l'ETM pour l'espèce considérée. Cet état stationnaire, en reflétant l'équilibre entre l'assimilation et l'excrétion, constitue un seuil entre la biodisponibilité environnementale et la biodisponibilité toxicologique. En ce sens, le flux d'absorption peut être considéré comme un indicateur de la biodisponibilité des ETM pour l'escargot et comme un déterminant prédictif des effets sublétaux potentiellement induits par l'exposition à un environnement contaminé.

Au cours de cette étude, nous avons volontairement choisi de conserver la nomenclature et la terminologie des paramètres cinétiques de l'accumulation et de l'élimination généralement appliquées dans la littérature (Tableau I.3). Néanmoins, l'étude d'un nombre considérable d'articles et les réflexions développées au cours des trois années de thèse, dont ce mémoire est une synthèse, nous permettent aujourd'hui de proposer une nouvelle terminologie qui nous paraît utile pour lever certaines ambiguïtés relevées dans la bibliographie et pouvant conduire à des difficultés d'utilisation des modèles mathématiques et d'interprétation des résultats (Figure VI.5).

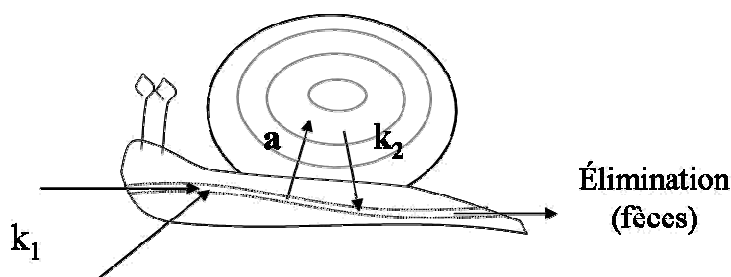


Figure VI.5. Représentation schématique des paramètres cinétiques de l'accumulation et de l'élimination des ETM par l'escargot *H. aspersa*. Avec k_1 , le taux d'absorption ; a , le taux d'assimilation et k_2 ; le taux d'excrétion.

Cette nomenclature propose de distinguer plus clairement absorption (*i.e.* ingestion) et assimilation (*i.e.* passage des membranes biologiques) en conservant le terme de taux d'absorption ($g_{sol} \cdot g^{-1} \text{ esc} \cdot j^{-1}$) mais en remplaçant le terme flux d'absorption par taux d'assimilation ($\mu_{g_{ETM}} \cdot g^{-1} \text{ esc} \cdot j^{-1}$). Nous proposons également de distinguer un taux d'excrétion (j^{-1}) et une élimination qui considère plus globalement ce qui n'a pas été assimilé et ce qui est excrété, que l'on retrouve dans les fèces. Le paramètre liant l'absorption à l'assimilation est la concentration en ETM biodisponible dans le sol. Cette dernière dépend, comme précisé dans les chapitres précédents, des conditions régnant à l'interface entre le sol (phases solide et liquide) et les membranes biologiques (tube digestif et épithélium du pied).

L'identification des paramètres édaphiques contrôlant le transfert des ETM dans le sol pour l'escargot a fait l'objet d'une étude présentée dans le chapitre V et pourra faire l'objet d'investigations approfondies afin :

- ✓ d'intégrer l'évaluation de la disponibilité environnementale dans les procédures d'évaluation des transferts des ETM,
- ✓ de déterminer le ou les pool(s) du sol représentatif(s) de la biodisponibilité des ETM pour l'escargot,
- ✓ de comprendre la variabilité des patterns d'accumulation lors de l'exposition d'une même espèce à des sols contrastés (Peijnenburg et al., 1999a).

La connaissance de la meilleure expression de la fraction biodisponible des ETM du sol pour l'escargot (concentration totale, concentration extractible, concentration totale dans l'eau interstitielle, concentration ionique...) devrait par la suite améliorer le pouvoir prédictif des modèles toxicocinétiques présentés en permettant, à partir des taux d'assimilation (a), une estimation pertinente des taux d'absorption (k_1) et donc des concentrations internes à l'équilibre.

Si la compréhension des mécanismes physico-chimiques du sol permet d'optimiser l'utilisation des modèles, la compréhension des mécanismes physiologiques des organismes le permet aussi. Ainsi, l'utilisation de modèles toxicocinétiques multicompartimentaux devrait améliorer la description des cinétiques biphasiques d'accumulation et d'élimination des ETM dans l'escargot, comme observé chez le ver de terre *Lumbricus rubellus* (Vijver et al., 2005). Ces modèles rendent en effet compte de l'existence de différents compartiments à l'intérieur d'un organisme. Ces compartiments ne sont généralement pas directement associés à un tissu ou un organe, mais à des entités aux comportements cinétiques différents (Wen et al., 1999). A partir des informations toxicocinétiques obtenues chez l'escargot *H. aspersa*, deux compartiments peuvent être distingués : le premier correspondant aux formes mobiles des ETM (libres ou faiblement liés) et caractérisé par des cinétiques rapides ; le second correspondant aux formes détoxifiées et stockées, caractérisé par des cinétiques lentes. Les formes sous lesquelles les ETM se trouvent dans l'organisme présentent des réactivités biochimiques et des potentialités toxiques différentes. Ces considérations doivent également être prises en compte lors des études de transfert et de toxicité des ETM dans les réseaux trophiques.

L'ensemble des travaux réalisés apporte des données fondamentales pour la normalisation d'une méthode standardisée d'évaluation de la bioaccumulation avec l'escargot

Helix aspersa. Sur cette base et avec l'appui des recherches futures annoncées en perspectives, nous espérons pouvoir contribuer au développement d'une directive bioaccumulation qui fait encore défaut pour l'évaluation des risques en milieu terrestre.

Après-propos

Cette étude a bénéficié du soutien financier du Conseil Régional de Franche-Comté, de l'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME) sous la forme d'une allocation de recherche co-financée par ces deux organismes.

Ces travaux s'intègrent également dans différents programmes de recherche nationaux et internationaux :

- programmes « Utilisation des escargots comme bioindicateurs de pollutions des écosystèmes terrestres », contrat n°01 75037 et « Bioindicateurs de la qualité des sol »,

- programme « ECCO. ECosphere COntinentale : processus et modélisation », intitulé « Biodisponibilité, transferts et effets des éléments traces métalliques dans des réseaux trophiques terrestres : changements d'échelle spatiale et de niveau d'organisation biologique » (programme STARTT pour Spatialisation des TrAnsferTs dans des Réseaux Trophiques Terrestres), contrats ADEME n°0572 C0058 et Agence Nationale de la Recherche (ANR) n° ANR-05-ECCO-004.

Nous tenons à remercier l'ensemble de ces institutions sans lesquelles cette thèse n'aurait pu être réalisée.

Références bibliographiques

- Abollino, O., Giacomino, A., Malandrino, M., Mentasti, E., 2005. The use of sequential extraction procedures for the characterization and management of contaminated soils. *Annali di Chimica* **95**, 525-538.
- AFNOR, 1995. NF ISO 10693. Qualité du sol. Détermination de la teneur en carbonate. Méthode volumétrique. AFNOR, Paris, France.
- AFNOR, 1998. NF ISO 11885. Qualité de l'eau. Dosage de 33 éléments par spectroscopie d'émission atomique avec plasma couplé par induction. AFNOR, Paris, France.
- AFNOR, 1999. NF X 31-130. Qualité des sols. Méthodes chimiques. Détermination de la capacité d'échange cationique (CEC) et des cations extractibles. AFNOR, Paris, France.
- AFNOR, 2002. NF X 31-108. Qualité des sols. Détermination des cations Ca^{++} , Mg^{++} , K^+ , Na^+ extractibles par l'acétate d'ammonium. Méthode par agitation. AFNOR, Paris, France.
- AFNOR, 2003. NF X 31-107. Qualité du sol. Détermination de la distribution granulométrique des particules du sol. Méthode à la pipette. AFNOR, Paris, France.
- AFNOR, 2005. NF ISO 10390. Qualité du sol. Détermination du pH. AFNOR, Paris, France.
- Akaike, H., 1977. Canonical correlation analysis of time series and the use of an information criterion. In: Lainiotis, D.G., Mehra, R.K. (Eds). *System identification: Advances and Case studies*. Academic Press, p. 27-96.
- Alexander, M., Hughes, J.B., Chaney, R.L., Cunningham, S.D., Harmsen, J., van Gestel, H., 2003. Chemical Measures of Bioavailability. In: Lanno, R. P. (ed.). *Contaminated soils: from soil-chemical interactions to ecosystem management*. SETAC-publication, p. 345-362.
- Alloway, B. J., Ed., 1995. *Heavy metals in soils*. Blackie Academic & Professional, Glasgow, UK. pp 368.
- Bailey, S.E.R., 1981. Circannual and circadian rhythms in the snail *Helix aspersa* Müller and the photoperiodic control of annual activity and reproduction. *Journal of Comparative Physiology* **142**, 89-94.
- Baize, D., 1997. Teneurs totales en éléments traces métalliques dans les sols (France). INRA, Paris, 408 p.
- Baize, D., 2000. Teneurs totales en "métaux lourds" dans les sols français : résultats généraux du programme ASPITET. *Le courrier de l'Environnement* n°39, p. 39-54.

- Baize, D., Girard, M.C. (coord.), Hodgson, J.M., Eskenazi, N.R., Baize, D. (trans.), 1998. A Sound Reference Base for Soils: The "Référentiel Pédologique". INRA Editions, Versailles, France, 324 p.
- Barker, G.M., 2001. The Biology of Terrestrial Molluscs. CAB International, Oxon, Wallingford, UK, 567 p.
- Basta, N. et Gradwohl, R., 2000. Estimation of Cd, Pb, and Zn bioavailability in smelter-contaminated soils by a sequential extraction procedure. *Soil and Sediment Contamination* **9**, 149-164.
- Bebianno, M.J. et Langston, W.S., 1998. Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*. *Talanta* **46**, 301–313.
- Beck, L., Römbke, J., Breure, A.M., Mulder, C., 2005. Considerations for the use of soil ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **62**, 189-200.
- Becquer, T., Dai, J., Quantin, C., Lavelle, P., 2005. Sources of bioavailable trace metals for earthworms from a Zn-, Pb- and Cd-contaminated soil. *Soil Biology and Biochemistry* **37**, 1564-1568.
- Beeby, A., 1985. The role of *Helix aspersa* as a major herbivore in the transfer of lead through a polluted ecosystem. *Journal of Applied Ecology* **22**, p. 267-275.
- Beeby, A., 2001. What do sentinels stand for? *Environmental Pollution* **112**, 285-298.
- Beeby, A. et Richmond, L., 1989. The shell as a site of lead deposition in *Helix aspersa*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **18**, 623-628.
- Beeby, A., Richmond, L., 2002. Evaluating *Helix aspersa* as a sentinel for mapping metal pollution. *Ecological Indicators* **1**, 261-270.
- Beeby, A., Richmond, L., Herpé, F., 2002. Lead reduces shell mass in juvenile garden snails (*Helix aspersa*). *Environmental Pollution* **120**, 283-288.
- Begall, S., 1997. The application of the Gompertz model to describe body growth. *Growth, Development and Aging* **61**, 61-67
- Berger, B. et Dallinger, R., 1989. Accumulation of cadmium and copper by the terrestrial snail *Arianta arbustorum* L.: kinetics and budgets. *Oecologia* **79**, 60-65.
- Berger, B. et Dallinger, R., 1993. Terrestrial snails as quantitative indicators of environmental metal pollution. *Environmental Monitoring Assessment* **25**, 65-84.
- Berger, B., Dallinger, R., Felder, E., Moser, J., 1993. Budgeting the flow of cadmium and zinc through the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. In *Ecotoxicology of Metals in*

- Invertebrates (eds R. Dallinger et R. Rainbow). Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 291-313.
- Berger, B., Dallinger, R., Gehrig, P., Hunziker, P.E., 1997. Primary structure of a copper-binding metallothionein from mantle tissue of the terrestrial gastropod *Helix pomatia* L. *Biochemical Journal* **328**, 219-224.
- Berger, B., Hunziker, P., Hauer, C.R., Birchler, N., Dallinger, R., 1995. Mass spectrometry and amino acid sequencing of two cadmium-binding metallothionein isoforms from the terrestrial gastropod *Arianta arbustorum*. *Biochemical Journal* **311**, 951-957.
- Bibic, A., Drobne, D., Byrne, A.R., 1997. Assimilation of zinc by *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) exposed to zinc. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **58**, 814-821.
- Bourelle, P.H. et Berthelin, J. (Coords), 1998. Contamination des sols par les éléments en traces : les risques et leur gestion. *Rapport de l'Académie des sciences* n°42, 438 p.
- Breure, A.M., Mulder, C., Römbke, J., Ruf, A., 2005. Ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **62**, 211-229.
- Brooks, A.W., White, K.N., Bailey, S.E.R., 1992. Accumulation and excretion of aluminium and iron by the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **103C**, 577-583.
- Burnham, K.P. and Anderson, D.R., 2004. Multimodel inference. Understanding AIC and BIC in model selection. *Sociological Methods and Research* **33**, 261-304.
- Cain, D.J., Buchwalter, D.B., Luoma, S.N., 2006. Influence of metal exposure history on the bioaccumulation and subcellular distribution of aqueous cadmium in the insect *Hydropsyche californica*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 1042-1049.
- Calow, P., 1998. General principles and overview. In: Calow, P. (Ed.). *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science, Oxford, p. 1-6.
- Campion, M., 1961. The structure and function of the cutaneous glands in *Helix aspersa*. *Quarterly Journal of Microscopical Science* **102**, 195-216.
- Carlou, C., Dalla Valle, M., Marcomini, A., 2004. Regression models to predict water-soil heavy metals partition coefficients in risk assessment studies. *Environmental Pollution* **127**, 109-115.
- Chabico, M., Klepal, W., Dallinger, R., 2004. Mechanisms of cadmium toxicity in terrestrial pulmonates: programmed cell death and metallothionein overload. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**, 648-655.

- Chabicoovsky, M., Niederstätter, H., Thaler, R., Hödl, E., Parson, W., Rossmannith, W., Dallinger, R., 2003. Localization and quantification of Cd- and Cu-specific metallothionein isoform mRNA in cells and organs of the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. *Toxicology and Applied Pharmacology* **190**, 25-36.
- Chapman, P.M., Allen, H.E., Godtfredsen, K., Z'Graggen, M.N., 1996. Evaluation of bioaccumulation factors in regulating metals. *Environmental Science and Technology* **30**, 448A-452A.
- Chapman, P.M., Wang, F., Janssen, C.R., Goulet, R.R., Kamunde, C.N., 2003. Conducting ecological risk assessments of inorganic metals and metalloids: current status. *Human and Ecological Risk Assessment* **9**, 641-697.
- Cheung, M. et Wang, W.X., 2005. Influence of subcellular metal compartmentalization in different prey on the transfer of metals to a predatory gastropod. *Marine Ecology Progress Series* **268**, 155-166.
- Chevalier, L., Desbuquois, C., Le Lannic, J., Charrier, M., 2001. *Poaceae* in the natural diet of the snails *Helix aspersa* Müller (*Gastropoda*, *Pulmonata*). *C.R. Acad. Sci. Paris, Science de la vie / Life Sciences* **324**, 979-987.
- Coeurdassier, M., 2001. Utilisation de mollusques gastéropodes pulmonés terrestres (*Helix aspersa*) et aquatiques (*Lymnaea stagnalis* et *Lymnaea palustris*) comme indicateurs de pollution par les éléments métalliques et les xénobiotiques organiques. Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté, Besançon, France, 297 p.
- Coeurdassier, M.; de Vaufleury, A.; Badot, P.M., 2000. Dose-dependent growth inhibition and bioaccumulation of hexavalent chromium in the land snail *Helix aspersa aspersa*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 2571-2578.
- Coeurdassier, M., Gomot-de Vaufleury, A., Lovy, C., Badot, P.M., 2002. Is the cadmium uptake from soil important in bioaccumulation and toxic effects for snails? *Ecotoxicology and Environmental Safety* **53**, 425-431.
- Coeurdassier M., Saint-Denis M., Gomot-de Vaufleury A., Ribera D., Badot P.M., 2001. The garden snail (*Helix aspersa*) as bioindicator of organophosphorus exposure: effects of dimethoate on survival, growth and acetylcholinesterases activity. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 1951-1957.
- Cooke, M., Jackson, A., Nickless, G., Roberts, D.J., 1979. Distribution and speciation of cadmium in the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **23**, 445-451.

- Cortet, J., Gomot-de Vaufleury, A., Poinso-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D., 1999. The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutants effects. *European Journal of Soil Biology* **35**, 115-134.
- Coughtrey, P.J. et Martin, M.H., 1976. The distribution of Pb, Zn, Cd, and Cu within the pulmonate mollusc *Helix aspersa* Müller. *Oecologia*, **23**, 315-322.
- Coughtrey, P.J. et Martin, M.H., 1977. The uptake of lead, zinc, cadmium, copper by pulmonate mollusc, *Helix aspersa* Müller, and its relevance to the monitoring of heavy metal contamination of environment. *Oecologia*, **27**, 65-74.
- Craig, A., Hare, L., Tessier A., 1999. Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*. *Aquatic Toxicology* **44**, 255-262.
- Crommentuijn, T., Doodeman, C.J.A.M., Doornekamp, A., van der Pol, J.J.C., Bedaux, J.J.M., van Gestel, C.A.M., 1994. Lethal body concentrations and accumulation patterns determine time-dependent toxicity of cadmium in soil arthropods. *Environmental Toxicology and Chemistry* **13**, 1781-1789.
- Crommentuijn, T., Doornekamp, A., van Gestel, C.A.M., 1997. Bioavailability and ecological effects of cadmium on *Folsomia candida* (Willem) in an artificial soil substrate as influenced by pH and organic matter. *Applied Soil Ecology* **5**, 261-271.
- Daguzan, J., 1983. Principales caractéristiques biologiques et écophysologiques de l'escargot. In: Daguzan, J. (Ed.). L'escargot et l'Héliciculture. Informations techniques des services vétérinaires, Paris, 207 p.
- Dallinger, R., 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invertebrates. In: Ecotoxicology of Metals in Invertebrates (eds R. Dallinger et R. Rainbow), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 245-289.
- Dallinger, R., 1996. Metallothionein research in terrestrial invertebrates: synopsis and perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology* **113C**, 125-133.
- Dallinger et Berger, 1993. Function of metallothioneins in terrestrial gastropods. *The Science of the Total Environment Supplement* **1993**, 607-615.
- Dallinger, R., Berger, B., Gruber, A., 1993. Quantitative aspects of zinc and cadmium binding in *Helix pomatia*: differences between an essential and a nonessential trace element. In Ecotoxicology of Metals in Invertebrates (eds R. Dallinger et R. Rainbow), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 315-332.
- Dallinger, R., Berger, B., Gruber, C., Hunziker, P., Sturzenbaum, S., 2000. Metallothioneins in terrestrial invertebrates: structural aspects, biological significance and implications for their use as biomarkers. *Cellular and Molecular Biology* **46**, 331-346.

- Dallinger, R., Berger, B., Hunziker, P. et Kägi, J.H.R. (1997) Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism. *Nature*, **388**, 237-238.
- Dallinger, R., Berger, B., Triebkorn, R., Köhler, H., 2001. Soil biology and ecotoxicology. In: Barker, G.M. (Ed.). *The biology of terrestrial molluscs*. CAB International, Oxon, Wallingford, UK, p. 489-525.
- Dallinger, R., Chabicovski, M., Hödl, E., Prem, C., Hunziker, P., Manzl, C., 2005. Copper in *Helix pomatia* (Gastropoda) is regulated by one single cell type: differently responsive metal pools in rhogocytes. *American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **289**, R1185-R1195.
- Dallinger, R., Chabicovsky, M., Lagg, B., Schipflinger, R., Weirich, H.G., Berger, B., 2004. Isoform-specific quantification of metallothionein in the terrestrial gastropod *Helix pomatia*. II. A differential biomarker approach under laboratory and field conditions. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**:902-910.
- Dallinger, R. et Wieser, W., 1984a. Patterns of accumulation, distribution and liberation of Zn, Cu, Cd, and Pb in different organs of the land snail *Helix pomatia* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* **79C**, 117-124.
- Dallinger, R. et Wieser, W., 1984b. Molecular fractionation of Zn, Cu, Cd and Pb in the midgut gland of *Helix pomatia* L. *Comparative Biochemistry and Physiology* **79C**, 125-129.
- Dan, M. et Bailey, S.E.R., 1982. Growth, mortality and feeding rates of the snail *Helix aspersa* at different population densities in the laboratory and the depression of activity in helicid snails by other individuals, or their mucus. *Journal of Molluscan Studies* **48**, 257-265.
- Degryse, F., Broos, K., Smolders, E., Merckx, R., 2003. Soil solution concentration of Cd and Zn can be predicted with a CaCl₂ soil extract. *European Journal of Soil Science* **54**, 149-157.
- Denison, R.A. et Silbergeld, E.K., 1988. Risks of municipal solid waste incineration: an environmental perspective. *Risk analysis* **8**, 343-355.
- Descamps, M., Fabre, M.C., Grelle, C., Gerard, S., 1996. Cadmium and lead kinetics during experimental contamination and decontamination of centipede *Lithobius forficatus* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **31**, 350-353.
- de Souza Dahm, K.C., Rückert, C., Tonial, E.M., Bonan, C.D., 2006. In vitro exposure of heavy metals on nucleotidase and cholinesterase activities from the digestive gland of *Helix aspersa*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **143C**, 316-320.

- de Vaufleury, A., Coeurdassier, M., Pandard, P., Scheifler, R., Lovy, C., Crini, N., Badot, P.M., 2006. How terrestrial snails can be used in risk assessment of soils. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 797-806.
- Dudka, S., Piotrowska, M., Terelak, H., 1996. Transfer of cadmium, lead and zinc from industrially contaminated soil to crop plants: a field study. *Environmental Pollution* **94**, 181-188.
- Edwards, C.A., Subler, S., Chen, S.K., Bogomolov, D.M., 1996. Essential criteria for selecting bioindicator species, processes, or systems to assess the environmental impact of chemicals on soil ecosystems. In: van Straalen, N.M., Krivolutsky, D.A. (Eds). *Bioindicator Systems for Soil Pollution*. Kluwer, Amsterdam, The Netherlands, p. 67-84.
- Eijsackers, H., 1983. Soil fauna and soil microflora as possible indicators of soil pollution. *Environmental Monitoring and Assessment* **3**, 307-316.
- Fournie, J. et Chetail, M., 1984. Calcium dynamics in land gastropods. *American Zoologist* **24**, 857-870.
- Gamito, S., 1998. Growth models and their use in ecological modelling: an application to a fish population. *Ecological Modelling*. **113**, 83-94.
- Garret, R.R., 2000. Natural sources of metals to the environment. *Human and Ecological Risk Assessment* **6**, 945-963.
- Gimbert, F., de Vaufleury, A., Douay, F., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Badot, P.M., 2007. Long-term responses of snails exposed to cadmium contaminated soils in a partial life-cycle experiment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **in press**.
- Gimbert, F., de Vaufleury, A., Douay, F., Scheifler, R., Coeurdassier, M., Badot, P.M., 2006. Modelling chronic exposure to contaminated soil: a toxicokinetic approach with the terrestrial snail *Helix aspersa*. *Environment International* **32**, 866-875.
- Godin, M., Feinbert, M.H., Ducauze, C.J., 1985. Modeling of soil contamination by air-borne lead and cadmium around several emission sources. *Environmental Pollution*, **10**, 97-114.
- Goldberg, E.D., Koide, M., Hodge, V., Flegal, A.R., Martin, J., 1983. US Mussel Watch: 1977-1978 results on trace metals and radionuclides. *Estuarine and Coastal Shelf Science* **16**, 69-93.
- Gomot, L. et Deray, A., 1987. Les escargots. *La Recherche* **186**, 302-311.
- Gomot, A., 1997. Dose-dependent effects of cadmium on the growth of snails in toxicity bioassays. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **33**, 209-216.

- Gomot, L. et Enee, J., 1980. Biologie de la reproduction de l'escargot *Helix aspersa* Müller : les phases de croissance et la différenciation sexuelle. *Atti Accademia Fisiocritici Siena*, 73-85.
- Gomot, A., Gomot, L., Boukraa, S., Bruckert, S., 1989. Influence of soil on the growth of the land snail *Helix aspersa*. An experimental study of the route for the stimulating factors. *Journal of Molluscan Studies* **55**, 1-7.
- Gomot, A. et Pihan, F., 1997. Comparison of the bioaccumulation capacities of copper and zinc in two snail subspecies (*Helix*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **38**, 85-94.
- Gomot-de Vaufleury, A., 2000. Standardized growth toxicity testing (Cu, Zn, Pb, and Pentachlorophenol) with *Helix aspersa*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **46**, 41-50.
- Gomot-de Vaufleury, A. et Bispo, A. (2000) Method for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails. 1. Sublethal effects on growth. *Environmental Sciences and Technology* **34**, 1865-1870.
- Gomot-de Vaufleury, A. et Kerhoas, I., 2000. Effects of cadmium on the reproductive system of the land snail *Helix aspersa*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **64**, 434-442.
- Gomot-de Vaufleury, A. et Pihan, F., 2000. Growing snails used as sentinels to evaluate terrestrial environment contamination by trace elements. *Chemosphere*, **40**, 275-284.
- Gomot-de Vaufleury, A. et Pihan, F., 2002. Methods for toxicity assessment of contaminated soil by oral or dermal uptake in land snails: metal bioavailability and bioaccumulation. *Environmental Toxicology and Chemistry* **21**, 820-827.
- Grime, J.P., McPherson-Stewart, F., Dearman, R.S., 1968. An investigation of leaf palatability using the snail *Cepaea nemoralis* L. *The Journal of Ecology* **56**, 405-420.
- Gustaffson, J.P., 1999. WinHumicV, <http://www.lwr.kth.se>, Stockholm.
- Hamelink, J.L., Landrum, P.F., Bergman, H.L., Benson, W.H., 1994. Bioavailability. Physical, chemical and biological interactions. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, 239 p.
- Hamon, R.E., McLaughlin, M.J., Naidu, R., Correll, A., 1998. Long-term changes in cadmium bioavailability in soil. *Environmental Sciences and Technology* **32**, 3699-3703.
- Hatzioannou, M., Eleuthariadis, N., Lazaridou-Dimitriadou, M., 1994. Food preferences and dietary overlap by terrestrial snails in Logos area (Edessa, Macedonia, northern Greece). *Journal of Molluscan Studies* **60**, 331-341.

- Heller, J. et Magaritz, M., 1983. From where do land snails obtain the chemicals to build their shells ? *Journal of Molluscan Studies* **49**, 116-121.
- 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.
- Hopkin, S. P., 1989. *Ecophysiology of metals in terrestrial invertebrates*. Elsevier Applied Science, NY, USA, 366 p.
- Hopkin, S.P., 1993. In situ biological monitoring of pollution in terrestrial and aquatic ecosystems. In: Calow P (Ed). *Handbook of ecotoxicology*. Blackwell, Oxford, p. 397-427
- 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.
- Houba, V.J.G., Temminghoff, E.J.M., Gaikhorst, G.A., van Wark, W., 2000. Soil analysis procedures using 0.01 M calcium chloride as extraction reagent. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* **31**, 1299-1396.
- Howard, B., Mitchell, P.C.H., Ritchie, A., Simkiss, K., Taylor, M., 1981. The composition of intracellular granules from the metal-accumulating cells of the common garden snail (*Helix aspersa*). *Biochemical Journal* **194**, 507-511.
- Iglesias, J. et Catilejo, J., 1999. Field observations of feeding of the land snail *Helix aspersa* Müller. *Journal of Molluscan Studies* **65**, 411-423.
- Ihaka, R. et Gentleman, R., 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* **5**, 299-314.
- Impellitteri, C.A., Lu, Y., Saxe, J.K., Allen, H.E., Peijnenburg, W.J.G.M., 2002. Correlation of the partitioning of dissolved organic matter fractions with the desorption of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from 18 Dutch soils. *Environment International* **28**, 401-410.
- Impellitteri, C.A., Saxe, J.K., Cochran, M., Janssen, G.M.C.M., Allen, H.E., 2003. Predicting the bioavailability of copper and zinc in soils: Modeling the partitioning of potentially bioavailable copper and zinc from soil solid to soil solution. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 1380-1386.
- Ireland, M.P., 1979. Distribution of essential and toxic metals in the terrestrial gastropod *Arion ater*. *Environmental Pollution* **20**, 271-278.

- Ireland, M.P., 1982. Sites of water, zinc and calcium uptake and distribution of these metals after cadmium administration in *Arion ater* (Gastropoda: Pulmonata). *Comparative Biochemistry and Physiology*, **73A**, 217-221.
- Ireland, M.P., 1991. The effect of dietary calcium on growth, shell thickness and tissue calcium distribution in the snail *Achatina fulica*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **98A**, 111-116.
- Ismert, M., Oster, T., Bagrel, D., 2002. Effects of atmospheric exposure to naphthalene on xenobiotic-metabolising enzymes in the snail *Helix aspersa*. *Chemosphere* **46**, 273-280
- ISO/DIS 17402, 2006. Soil quality. Guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 11267, 1999. Soil quality. Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 11268-2, 1998. Soil quality. Effects of pollutants on earthworms (*Eisenia foetida*). Part 2 : Determination of effects on reproduction. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 15952, 2006. Soil quality. Effects of pollutants on juvenile land snails (Helicidae). Determination of the effects on growth by soil contamination. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- ISO 16387, 2004. Soil quality. Effects of pollutants on *Enchytraeidae* (*Enchytraeus* sp.). Determination of effects on reproduction and survival. International Standardisation Organisation. Geneva, Switzerland.
- Janssen, M.P.M., Bruins, A., de Vries, T.H., van Straalen, N.M., 1991. Comparison of cadmium kinetics in four soil arthropod species. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **20**, 305-312.
- Janssen, R.P.T., Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., van den Hoop, M.A.G.T., 1997a. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. I. Relationship between metal partition coefficients and soil characteristics. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 2470-2478.
- Janssen, R.P.T., Posthuma, L., Baerselman, R., Den Hollander, H.A., van Veen, R.P.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 1997b. Equilibrium partitioning of heavy metals in Dutch field soils. II. Prediction of metal accumulation in earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **16**, 2479-2488.

- Jordaens, K., de Wolf, H., Vandecasteele, B., Blust, R., Backeljau, T., 2006. Associations between shell strength, shell morphology and heavy metals in the land snail *Cepaea nemoralis* (Gastropoda, Helicidae). *Science of the Total Environment* **363**, 285-293.
- Kabata-Pendias, A., 2004. Soil-plant transfer of trace elements – an environmental issue. *Geoderma* **122**, 143-149.
- Kammenga, J.E., Busschers, M., Van Straalen, N.M., Jepson, P.C., Bakker, J., 1996. Stress induced fitness reduction is not determined by the most sensitive life-cycle trait. *Functional Ecology* **10**, 106–111.
- Kammenga, J.E. et Riksen, J.A.G., 1996. Comparing differences in species sensitivity to toxicants: phenotypic plasticity versus concentration–response relationships. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 1649–1653.
- Kooistra, L., Leuven, R.S.E.W., Nienhuis, P.H., Wehrens, R., Buydens, L.M.C., 2001. A procedure for incorporating spatial variability in ecological risk assessment of Dutch river floodplains. *Environmental Management* **28**, 359-373.
- Koster, M., Reijnders, L., Van Oost, N.R., Peijnenburg, W.J.G.M., 2005. Comparison of the method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zinc accumulation in plants and isopods. *Environmental Pollution* **133**, 103-116.
- Kovaríková, V., Podborská, M., Dočekalová, H., 2005. Assessment of metal bioavailability in soils by the DGT technique. *Chemicke Listy* **99**, s145-s148.
- Kramarz, P., 1999a. Dynamics of accumulation and decontamination of cadmium and zinc in carnivorous invertebrates. 1. The Ground Beetle, *Poecilus cupreus* L. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **63**, 531-537.
- Kramarz, P., 1999b. Dynamics of accumulation and decontamination of cadmium and zinc in carnivorous invertebrates. 2. The centipede *Lithobius mutabilis* Koch. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **63**, 538-545.
- Landrum, P.F., Hayton, W.L., Lee II, H.L., McCarty, L.S., Mackay, D., McKim, J.M., 1994. Synopsis of discussion section on the kinetics behind environmental bioavailability. In: Hamelink, J.R. Landrum, P.F. Bergman, H.L., Benson, W.H. (Eds). Bioavailability. Physical, chemical and biological interactions. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, pp. 203–219.
- Lanno, R.P., LeBlanc, S.C., Knight, B.L., Tymowski, R., Fitzgerald, D.G., 1998. Application of body residues as tool in the assessment of soil toxicity. In: Sheppard, S.C., Bembridge,

- J.D., Holmstrup, M., Posthuma, L. (Eds). *Advances in Earthworm Ecotoxicology*. SETAC Press, Boca Raton, p. 41-52.
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N., 2004. The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**, 39-47.
- Laskowski, R., 1997. Estimating fitness costs of pollution in iteroparous invertebrates. In: van Straalen, N.M., Løkke, H. (Eds.). *Ecological Risk Assessment of Contaminants in Soils*. Chapman & Hall, London, UK, 352 p.
- Laskowski, R. et Hopkin, S. P., 1996a. Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on fitness in snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **34**, 59-69.
- Laskowski, R. et Hopkin, S.P., 1996b. Accumulation of Zn, Cu, Pb and Cd in the garden snail *Helix aspersa*: implications for predators. *Environmental Pollution* **91**, 289-297.
- Lebourg, A., Sterckeman, T., Ciesielski, H., Proix, N., 1998. Trace metal speciation in three unbuffered salt solutions used to assess their bioavailability in soil. *Journal of Environmental Quality* **27**, 584-590.
- Ledergerber, S., Leadley, P.W., Stöcklin, J., Baur, B., 1998. Feeding behaviour of juvenile snails (*Helix pomatia*) to four plant species grown at elevated atmospheric CO₂. *Acta Oecologia* **19**, 89-95.
- Lee, S.Z., Allen, H.E., Huang, C.P., Sparks, D.L., Sanders, P.F., Peijnenburg, W.J.G.M., 1996. Predicting soil-water partition coefficients for cadmium. *Environmental Science and Technology* **30**, 3418-3424.
- Lindstrom, M.J. et Bates, D.M., 1990. Nonlinear mixed effects models for repeated measures data. *Biometrics* **46**, 673-687.
- Liu, Y.G., Zhang, H.Z., Zeng, G.M., Huang, B.R., Li, X., 2006. Heavy metal accumulation in plants on Mn mine tailings. *Pedosphere* **16**, 131-136.
- Lock, K. et Janssen, C. R., 2001. Effect of clay and organic matter type on the ecotoxicity of zinc and cadmium to the potworm *Enchytraeus albidus*. *Chemosphere* **44**, 1669-1672.
- Lock, K., Janssen, C. R., de Coen, W. M., 2000. Multivariate test designs to assess the influence of zinc and cadmium bioavailability in soils on the toxicity to *Enchytraeus albidus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **19**, 2666-2671.
- Lofts, S., Spurgeon, D., Svendsen, C., 2005. Fractions affected and probabilistic risk assessment of Cu, Zn, Cd, and Pb in soils using the free ion approach. *Environmental Science and Technology* **39**, 8533-8540.

- López, S., Prieto, M., Dijkstra, J., Dhanoa, M.S., France, J., 2004. Statistical evaluation of mathematical models for microbial growth. *International Journal of Food Microbiology* **96**, 289-300.
- Lucarz, A. et Gomot, L., 1985. Influence de la densité de population sur la croissance diamétrale et pondérale de l'escargot *Helix aspersa* Müller dans différentes conditions d'élevage. *Journal of Molluscan Studies* **51**, 105-115.
- Luoma, S.N. et Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. *Environmental Science and Technology* **39**, 1921-1931.
- Ma, W.C., Dennenman, W., Faber, J., 1991. Hazardous exposure of ground-living small mammals to cadmium and lead in contaminated terrestrial ecosystems. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **20**, 266-270.
- Manouchehri, N., Besancon, S., Bermond, A., 2006. Major and trace metal extraction from soil by EDTA: Equilibrium and kinetic studies. *Analytica Chimica Acta* **559**, 105-112.
- Manzl, C., Krumschnabel, G., Schwarzbaum, P.J., Dallinger, R., 2004. Acute toxicity of cadmium and copper in hepatopancreas cells from the Roman snail (*Helix pomatia*). *Comparative Biochemistry and Physiology* **138C**, 45-52.
- Marinussen, M.P.J.C; van der Zee, S.E.A.T.M; de Haan, F.A.M., 1997. Cu accumulation in the earthworm *Dendrobaena veneta* in a heavy metal (Cu, Pb, Zn) contaminated site compared to Cu accumulation in laboratory experiments. *Environmental Pollution* **96**, 227-233.
- Marsden, I.D. et Rainbow, P.S., 2004. Does the accumulation of trace metals in crustaceans affect their ecology — the amphipod example? *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **300**, 343-371.
- Martin, A.W. et Deyrup-Olsen, I., 1986. Function of the epithelial channel cells of the body walls of a terrestrial slug, *Ariolimax columbianus*. *Journal of Experimental Biology* **121**, 301-314.
- Martins, R.J.E. et Boaventura, R.A.R., 2002. Uptake and release of zinc by aquatic bryophytes (*Fontinalis antipyretica* L. ex. Hedw.). *Water Research* **36**, 5005-5012.
- McBride, M.B., 1995. Toxic metal accumulation from agricultural use of sludge: are USEPA regulations protective? *Journal of Environmental Quality* **24**, 5-18.
- McCarty, L.S. et Mackay, D., 1993. Enhancing ecotoxicological modeling and assessment. *Environmental Science and Technology* **27**, 1719-1727.
- McLaughlin, M.J., 2001. Bioavailability of metals to terrestrial plants. In: Allen, H.E. (Ed.). Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems. Importance of partitioning for

- bioavailability to invertebrates, microbes and plants. SETAC Press, Pensacola, FL, USA, pp. 39-68.
- McMillen, S.J., van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., Linder, G.L., Pauwels, S.J., Stephenson, G.L., 2003. Biological measures of bioavailability. In: Lanno, R.P. (Ed.). Contaminated soils: from soil-chemical interactions to ecosystem management. Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola, p. 293-343.
- Menta, C. et Parisi, V., 2001. Metal concentrations in *Helix pomatia*, *Helix aspersa* and *Arion rufus*: a comparative study. *Environmental Pollution* **115**, 205-208.
- Merian, E., Anke, M., Ihnat, M., Stoepler, M. (Eds.), 2004. Metals and their compounds in the environment. Occurrence, analysis and biological relevance. 2nd Edition, VCH Publishers, Weinheim, New York, USA, 1806 p.
- Meyer, J.S., 2002. The utility of the terms “bioavailability” and “bioavailable fraction” for metals. *Marine Environmental Research* **53**, 417-423.
- Molnár, G., Salánki, J., Kiss, T., 2004. Cadmium inhibits GABA-activated ion currents by increasing intracellular calcium level in snail neurons. *Brain Res.* **1008**, 205-211.
- Moore, P.A. Jr, Joern, B.C., Edwards, D.R., Wood, C.W., Daniel, T.C., 2006. Effects of manure amendments on environmental and production problems. In: Rice, J.M., Caldwell, D.F, Humenik F.J. (Eds). Animal Agriculture and the Environment: National Center for Manure and Animal Waste Management White Papers. American Society of Agricultural and Biological Engineers, St. Joseph, Michigan, USA. p. 759-776.
- Morel, F.M.M., 1983. Principles of Aquatic Chemistry. John Wiley & Sons, NY, USA, 446 p.
- Morgan, R.K., Taylor, E., 2004. Copper Accumulation in Vineyard Soils in New Zealand. *Environmental Sciences* **1**, 139-167.
- Moriarty, F., 1983. Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems, Academic Press, London, 233 p.
- Moriarty, F. and Walker, C.H., 1987. Bioaccumulation in food chains – a rational approach. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **13**, 208-215.
- Neuhauser, E.F., Cukic, Z.V., Malecki, M.R., Loehr, R.C., Durkin, P.R., 1995. Bioconcentration and biokinetics of heavy metals in the earthworm. *Environmental Pollution* **89**, 293-301.
- Newman, M.C., Mulvey, M., Beeby, A., Hurst, R.W., Richmond, L., 1994. Snail (*Helix aspersa*) exposure history and possible adaptation to lead as reflected in shell composition. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **27**, 346-351.

- Nieboer, E. et Richardson, D.H., 1980. The replacement of the nondescript term 'heavy metals' by a biological and chemically significant classification of metal ions. *Environmental Pollution* **1B**, 3-26.
- Notten, M.J.M., 2005. Origin, transfer and effects of heavy metals in a soil-plant-snail food chain in polluted ecosystems of Biesbosch National Parck. PhD thesis, Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands, 154 p.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2005. Heavy metal concentrations in a soil-plant-snail food chain along a terrestrial soil pollution gradient. *Environmental Pollution* **138**, 178-190.
- Notten, M.J.M., Oosthoek, A.J.P., Rozema, J., Aerts, R., 2006. Heavy metal pollution affects consumption and reproduction of the landsnail *Cepaea nemoralis* fed on naturally polluted *Urtica dioica* leaves. *Ecotoxicology* **15**, p. 295-304.
- Nowack, B., Koehler, S., Schulin, R., 2004. Use of diffusive gradients in thin films (DGT) in undisturbed field soils. *Environmental Science and Technology* **38**, 1133-1138.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 1984. Test No. 207: Earthworm acute toxicity tests. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* **1**, 1-9.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD), 1996. Test No. 305: Bioconcentration: Flow-through fish test. *OECD Guidelines for the Testing of Chemicals* **1**, 1-23.
- Oste, L. A., Dolfing, J., Ma, W.C., Lexmond, T.M., 2001. Cadmium uptake by earthworms as related to the availability in the soil and the intestine. *Environmental Toxicology and Chemistry* **20**, 1785-1791.
- Peijnenburg, W.J.G.M., 2002. Bioavailability of metals to soil invertebrates. In: Allen, H.E. (Ed.). Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes and plants. Pensacola FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), p. 89-112.
- Peijnenburg, W., Baerselman, R., de Groot, A., Jager, T., Leenders, D., Posthuma, L., van Veen, R., 2000. Quantification of metal bioavailability for lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. **39**, 420-430.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Baerselman, R., de Groot, A., Jager, T., Posthuma, L., van Veen, R.P.M., 1999a. Relating environmental availability to bioavailability: Soil-type dependant metal accumulation in the oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **44**, 294-310.

- Peijnenburg, W.J.G.M. et Jager, T., 2003. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**, 63-77.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., Eijsackers, H.J.P., Allen, H.E., 1997. A conceptual framework for implementation of bioavailability of metals for environmental management purposes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **37**, 163-172.
- Peijnenburg, W.J.G.M., Posthuma, L., Zweers, P.G.C., Baerselman, R., de Groot, A., van Veen, R.P.M., Jager, T., 1999b. Prediction of metal bioavailability in Dutch field soils for the oligochaete *Enchytraeus crypticus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **43**, 170-186.
- Phillips, D.J.H., 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments. A review. *Environmental Pollution* **13**, 281-317.
- Phillips, D.J.H. et Rainbow, P.S., 1993. *Biomonitoring of Trace Aquatic Contaminants*. Elsevier, London.
- Pihan, F., 2001. Caractérisation de mollusques gastéropodes terrestres en tant que bioindicateurs de la contamination polymétallique (Al, Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, Cu, Cd et Pb). Thèse de doctorat, Université de Metz, Metz, France, 427 p.
- Pinheiro, J.C. et Bates, D.M., 2000. *Mixed-effects models in S and S-PLUS*. Springer-Verlag, New-York, USA, 528 p.
- Posthuma, L. et Notenboom, J., 1996. Toxic effects of heavy metals in three worm species exposed in artificially contaminated soil substrates and contaminated field soils. RIVM report n°719102048, Bilthoven, The Netherlands.
- Pueyo, M., López-Sánchez, J.F., Rauret, G., 2004. Assessment of CaCl₂, NaNO₃ and NH₄NO₃ extraction procedures for the study of Cd, Cu, Pb and Zn extractability in contaminated soils. *Analytica Chimica Acta* **504**, 217-226.
- R Development Core Team, 2005. *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* **120**, 497-507.
- Rainbow, P.S., 2007. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. *Environment International*, **33**, 576-582.

- Rainbow, P.S. et Dallinger, R., 1993. Metal uptake, regulation and excretion in freshwater invertebrates. In *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates* (eds R. Dallinger et R. Rainbow), Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 119-132.
- Rainbow, P.S., Poirier, L., Smith, B.D., Brix, K.V., Luoma, S.N., 2006. Trophic transfer of trace metals: subcellular compartmentalization in a polychaete and assimilation by a decapod crustacean. *Marine Ecology Progress Series* **308**, 91–100.
- Rand, G. M., 1995. *Fundamentals of aquatic ecotoxicology*. Washington DC, Taylor and Francis. 1125 p.
- Regoli, F., Gorbi, S., Fattorini, D., Tedesco, S., Notti, A., Machella, N., Bocchetti, R., Benedetti, M., Piva, F., 2006. Use of the land snail *Helix aspersa* as sentinel organism for monitoring ecotoxicologic effects of urban pollution: An integrated approach. *Environmental Health Perspectives* **114**, 63-69.
- Robert, M. et Juste, C., 1999. Enjeux environnementaux et industriels - Dynamique des éléments traces dans l'écosystème sol. In: *Spéciation des métaux dans le sol*. Les Cahiers du Club Crin, Paris, p. 15-37.
- Römbke, J. et Breure, A.M., 2005. Status and outlook of ecological soil classification and assessment concepts. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **62**. 300-308.
- Russell, L.K., DeHaven, J.I., Botts, R.P., 1981. Toxic effects of cadmium on the garden snail (*Helix aspersa*). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **26**, 634-640.
- Sauvé, S., 2002. Speciation of metals in soils. In: Allen, H.E. (Ed.). *Bioavailability of metals in terrestrial ecosystems: importance of partitioning for bioavailability to invertebrates, microbes and plants*. Pensacola FL: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), p. 7-37.
- Sauvé, S., Hendershot, W., Allen, H.E., 2000. Solid-solution partitioning of metals in contaminated soils: dependence on pH, total metal burdens and organic matter. *Environmental Science and Technology* **34**, 1125-1131.
- Scheifler, R., 2002. *Evaluation de la biodisponibilité et des transferts de polluants métalliques et organiques dans les réseaux trophiques "sol-plante-invertébrés"*. Thèse de doctorat, Université de Franche-Comté, Besançon, France, 196 p.
- Scheifler, R., de Vaufleury, A., Coeurdassier, M., Crini, N., Badot, P.M., 2006. Transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in a soil-plant-invertebrate food chain: a microcosm study. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 815-822.

- Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A., Toussaint, M.L., Badot, P.M., 2002a. Transfer and effects of cadmium in an experimental food chain involving the snail *Helix aspersa* and the predatory carabid beetle *Chrysocarabus splendens*. *Chemosphere* **48**, 571-579.
- Scheifler, R., Gomot-de Vaufleury, A., Badot, P.M., 2002b. Transfer of cadmium from plant leaves and vegetable flour to the snail *Helix aspersa*: bioaccumulation and effects. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **53**. 148-153.
- Scheifler, R., Ben Brahim, M., Gomot-de Vaufleury, A., Carnus, J.M., Badot, P.M., 2003. A field method using microcosms to evaluate transfer of Cd, Cu, Ni, Pb and Zn from sewage sludge amended forest soils to *Helix aspersa* snails. *Environmental Pollution* **122**, 343-350.
- Scheifler, R., Schwartz, C., Echevarria, G., de Vaufleury, A., Badot, P.M., Morel, J.L., 2003. Nonavailable soil cadmium is bioavailable to snails: Evidence from isotopic dilution experiments. *Environmental Science and Technology* **37**, 81-86.
- Senesi, G.S., Baldassare, G., Senesi, N., Radina, B., 1999. Trace element inputs into soils by anthropogenic activities and implication for human health. *Chemosphere* **39**, 343-377.
- Simkiss, K., 1977. Biomineralization and detoxification. *Calcified Tissue Research*. **24**, 199-200.
- Simkiss, K., Jenkins, K.G.A., McLellan, J., Wheeler, E., 1982. Methods of metal incorporation into intracellular granules. *Experientia* **38**, 333-335.
- Simkiss, K. et Taylor, M.G., 1989. Metal fluxes across the membrane of aquatic organisms. *Reviews in Aquatic Sciences* **1**, 173-188.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J., 1997. Biometry: the principles and practice of statistics in biological research. W.H. Freeman, NY, USA, 880 p.
- Spacie, A. et Hamelink, J.L., 1985. Bioaccumulation. In: Rand, G.M., Petrocelli, S.R., (Eds). *Fundamentals of aquatic toxicology*. Hemisphere Corp., Washington, USA, p. 495-525.
- Spellerberg I.F., 2005. *Monitoring ecological change*. Second Edition, Cambridge University Press, Cambridge, England, 410 p.
- Spurgeon, D.J. et Hopkin, S.P., 1996. Effects of variations in the organic matter content and pH of soils on the availability and toxicity of zinc to the earthworm *Eisenia fetida*. *Pedobiologia* **40**, 80-96.
- Spurgeon, D.J. et Hopkin, S.P., 1999. Comparisons of metal accumulation and excretion kinetics in earthworms (*Eisenia fetida*) exposed to contaminated field and laboratory soils. *Applied Soil Ecology* **11**, 227-243.

- Spurgeon, D.J., Lofts, S., Hankard, P.K., Toal, M., McLellan, D., Fishwick, S., Svendsen, C., 2006. Effect of pH on metal speciation and resulting metal uptake and toxicity for earthworms. *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 788-796.
- Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Kille, P., Morgan, A.J. and Weeks, J. M., 2004. Responses of earthworms (*Lumbricus rubellus*) to copper and cadmium as determined by measurement of juvenile traits in a specifically designed test system. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**, 54-64.
- Sterckeman, T.; Douay, F.; Proix, N.; Fourrier, H., 2000. Vertical distribution of Cd, Pb and Zn in soils near smelters in the North of France. *Environmental Pollution* **107**, 377-389.
- Stone, M., 1974. Cross-validatory choice and assessment of statistical predictions. *Journal of the Royal Statistical Society* **36**, 111-147.
- Suter II, G.W., 1993. Exposure. In: Suter II (Ed.). *Ecological Risk Assessment*. Lewis Publishers, Boca Raton, FL, USA, p. 153-172.
- Sverdrup, L.E., de Vaufleury, A., Hartnik, T., Hagen, S.B., Loibner, A.P., Jensen, J., 2006. Effects dans uptake of polycyclic aromatic compounds in snails (*Helix aspersa*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 1941-1945.
- Swaileh, K. M. et Ezzughayyar, A., 2000. Effects of dietary Cd and Cu on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **47**, 253-260.
- Swaileh, K.M. et Ezzughayyar, A., 2001. Dose-dependent effects of dietary Pb and Zn on feeding and growth rates of the landsnail *Helix engaddensis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **50**, 9-14.
- Tarazona, J.V. et Vega, M.M., 2002. Hazard and risk assessment of chemicals for terrestrial ecosystems. *Toxicology* **181-182**, 187-191.
- Tei, F., Aikman, D. P., Scaife, A., 1996. Growth of lettuce, onion and red beet. 2. Growth modelling. *Annals of Botany* **78**, 645-652.
- Tipping, E., 1994. WHAM – A chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion binding by humic substance. *Computer Geoscience* **20**, 973-1023.
- Tipping, E., Rieuwerts, J., Pan, G., Ashmore, M.R., Lofts, S., Hill, M.T.R., Farago, M.E., Thornton, I., 2003. The solid-solution partitioning of heavy metals (Cu, Zn, Cd, Pb) in upland soils of England and Wales. *Environmental Pollution* **125**, 213-225.

- Tompa, A.S., 1980. Studies on the reproductive biology of gastropods: part III. Calcium provision and the evolution of terrestrial eggs among gastropods. *Journal of Conchology* **30**, 145-154.
- Tompa, A.S. et Wilbur, K.M., 1977. Calcium mobilisation during reproduction in snail *Helix aspersa*. *Nature* **270**, 53-54.
- Topal, M., Ozdemir, M., Aksakal, V., Yildiz, N., Dogru, U., 2004. Determination of the best nonlinear function in order to estimate growth in Morkaraman and Awassi lambs. *Small Ruminant Research* **55**, 229-232.
- Tsoularis, A. et Wallace, J., 2002. Analysis of logistic growth models. *Mathematical Biosciences* **179**, 21-55.
- US-EPA (United States Environmental Protection Agency), 2003. Ecological soil screening levels for cadmium. Interim final. OSWER Directive 92857-65, Washington, DC, USA.
- van Gestel., C.A.M., 1997. Scientific basis for extrapolating results from soil ecotoxicity tests to field conditions and the use of bioassays. In: van Straalen, N.M., Løkke, H. (Eds). *Ecological Risk assessment of Contaminants in Soil*. Chapman & Hall, London, UK, p. 25-53.
- van Gestel, C.A.M., Koolhaas, J.E., 2004. Water-extractability, free-ion activity and pH explain cadmium sorption and toxicity to *Folsomia candida* (Collembola) in seven pH*soil combinations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **23**, 1822-1833.
- van Leeuwen, H.P., 1999. Metal speciation dynamics and bioavailability: inert and labile complexes. *Environmental Science and Technology* **33**, 3743 -3748.
- van Straalen, N.M., 1996. Critical body concentrations: their use in bioindication. In: Van Straalen, N.M., Krivolutsky, D.A. (Eds.), *Bioindicator Systems for Soil Pollution*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 5-16.
- van Straalen, N.M., Donker, M.H., Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., 2005. Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. *Environmental Pollution* **136**, 409-417.
- van Straalen, N.M., Schobben, J.H.M., de Goede, R.G.M., 1989. Population consequences of cadmium toxicity in soil microarthropods. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **17**, 190-204.
- van Straalen, N.M. et van Gestel, C.A.M., 1998. Soil invertebrates and micro-organisms. In: Calow, P. (Ed). *Handbook of Ecotoxicology*. Blackwell Science, Oxford, p. 251-277.
- Viard-La Rocca, B., 2004. Mise au point et validation, sur sites contaminés (ETM-HAP), d'un test de biosurveillance en microcosme : croissance et bioaccumulation par le

- gastéropode terrestre *Helix aspersa aspersa*. Thèse de doctorat, Université de Metz, Metz, France, 222 p.
- Viard, B., Maul, A., Pihan, J.C., 2004a. Standard use conditions of terrestrial gastropods in active biomonitoring of soil contamination. *Journal of Environmental Monitoring* **6**, 103-107.
- Viard, B., Pihan, F., Promeprat, S., Pihan, J.C., 2004b. Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: Bioaccumulation in soil, Graminaceae and land snails. *Chemosphere* **55**, 1349-1359.
- Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., Lanno, R.P., van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J.G.M., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environmental Science and Technology* **38**, 4705 -4712.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Jager, T., van Straalen, N.M., Wolterbeek, H.T., van Gestel, C.A.M., 2006a. Kinetics of Zn and Cd accumulation in the isopod *Porcellio scaber* exposed to contaminated soil and/or food. *Soil Biology and Biochemistry* **38**, 1554-1563.
- Vijver, M.G., van Gestel, C.A.M., van Straalen, N.M., Lanno, R.P., Peijnenburg, W.J.G.M., 2006b. Biological significance of metals partitioned to subcellular fractions within earthworms (*Aporrectodea caliginosa*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **25**, 807-14.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Jager, T., Wolterbeek, H.T., van Straalen, N.M., van Gestel, C.A.M., 2005. Biphasic elimination and uptake kinetics of Zn and Cd in the earthworm *Lumbricus rubellus* exposed to contaminated floodplain soil. *Soil Biology and Biochemistry* **37**:1843-1851.
- Vijver, M.G., Vink, J.P.M., Miermans, C.J.H., van Gestel, C.A.M., 2003. Oral sealing using glue: A new method to distinguish between intestinal and dermal uptake of metals in earthworms. *Soil Biology and Biochemistry* **35**, 125-132.
- Walker, C. H., Hopkin, S. P., Sibly, R. M., Peakall, D. B., 2005. Principles of Ecotoxicology. Third Edition, Taylor and Francis, London, UK, 344 p.
- Wallace, W.G., Lee, B.G., Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fraction (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* **249**, 183–197.
- Wallace, W.G. et Lopez, G.R., 1996. Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. *Estuaries* **19**, 923-930.

- Wallace, W.G. et Luoma, S.N., 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. The significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series* **257**, 125–137.
- Wang WX, Fisher NS (1999) Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **18**, 2034–2045.
- Weltje, L., 1998. Mixture toxicity and tissue interactions of Cd, Cu, Pb and Zn in earthworms (Oligochaeta) in laboratory and field soil: a critical evaluation of data. *Chemosphere* **36**, 2643-2660.
- Wen, Y.H., Kalff, J., Peters, R.H., 1999. Pharmacokinetic modeling in toxicology: a critical perspective. *Environmental Review* **7**, 1-18.
- Widianarko, B et van Straalen, N., 1996. Toxicokinetic-based survival analysis in bioassays using nonpersistent chemicals. *Environmental Toxicology and Chemistry* **15**, 402-406.
- Williamson, P., 1979. Comparison of metal levels in invertebrate detritivores and their natural diets: concentrations factors reassessed. *Oecologia* **44**, 75-79.
- Williamson, P., 1980. Variables affecting body burdens of lead, zinc and cadmium in a roadside population of the snail *Cepea hotensis* Müller. *Oecologia* **44**, 213-220.
- Yu, R., Leung, P., Bienfang, P., 2006. Predicting shrimp growth: Artificial neural network versus nonlinear regression models. *Aquacultural Engineering* **34**, 26-32.
- Zhang, H. et Davison, W., 2000. Direct in situ measurements of labile inorganic and organically bound metal species in synthetic solutions and natural waters using diffusive gradients in thin films. *Analytical Chemistry* **72**, 4447-4457.
- Zullinger, E.M., Ricklefs, R.E., Redford, K.H., Mace, G.M., 1984. Fitting sigmoidal equations to mammalian growth curves. *Journal of Mammalogy* **65**, 607-636.