... Avant-propos ...

Que toutes les personnes qui ont permis la réalisation de cette étude trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie plus particulièrement :

Monsieur BOUCHE, maître de recherches du laboratoire de zooécologie du sol à l'I.N.R.A. Dijon,

Monsieur FAYOLLE, ingénieur E.N.I.T.A. (hors statut I.N.R.A. Dijon),

Madame AUTISSIER, professeur de chimie analytique à la faculté de pharmacie de Dijon.

SOMMAIRE

INTRODUCTION..... 1

PREMIERE PARTIE..... 4

I. LE PLOMB..... 5

1.1 Etudes sur le terrain..... 5

1.2 Etudes de laboratoire..... 6

1.3 Conclusions..... 7

II. LE CADMIUM..... 7

2.1 Etudes sur le terrain..... 7

2.2 Etudes de laboratoire..... 8

2.3 Conclusions..... 9

III. LE MERCURE..... 9

IV. LE CUIVRE..... 10

4.1 Etudes sur le terrain..... 10

4.2 Etudes de laboratoire..... 12

4.3 Conclusions..... 13

DEUXIEME PARTIE..... 14

A - Objectifs et méthodologie..... 16

B - Matériel et méthodes..... 18

I. ETUDE DE LA TOXICITE AIGUE DES METAUX LOURDS : MERCURE, PLOMB, CADMIUM ET CUIVRE..... 18

1.1 Essai sol..... 18

a - souche lombricienne utilisée..... 18

b - type de sol utilisé..... 19

c - préparation de l'essai..... 20

d - conduite de l'essai..... 24

1.2 Essai litière..... 25

a - souche lombricienne utilisée..... 25

b - type de sol utilisé..... 25

c - préparation de l'essai..... 25
d - conduite de l'essai..... 25

II. ETUDE DE LA BIOACCUMULATION DES METAUX LOURDS (CADMIUM, PLOMB, ET MERCURE) PAR LES VERS DE TERRE..... 26

2.1 Technique d'analyse..... 26
a - cas du cadmium et du plomb..... 30
b - cas du mercure..... 32

2.2 Préparation des échantillons..... 33
a - cas du plomb et du cadmium..... 33
b - cas du mercure..... 33

2.3 Extraction des métaux lourds..... 34
a - cas du plomb et du cadmium..... 34
b - cas du mercure..... 34

2.4 Analyse des métaux..... 35
a - cas du plomb et du cadmium..... 35
b - cas du mercure..... 36

2.5 Calcul des concentrations..... 36

C - Résultats..... 38

I. CAS DU PLOMB..... 38

1.1 Toxicité aiguë à 7 jours..... 38
a - avec l'espèce *E. fetida*..... 38
b - avec l'espèce *A. chlorotica*..... 38
c - conclusions..... 38

1.2 Etude de la bioaccumulation..... 39
a - avec l'espèce *E. fetida*..... 39
b - avec l'espèce *A. chlorotica*..... 39
c - conclusions..... 39

II. CAS DU CADMIUM..... 40

2.1 toxicité aiguë à 7 jours..... 40
a - sur artisol..... 40
+ avec l'espèce *E. fetida*..... 40
+ avec l'espèce *A. chlorotica*..... 42
b - terre humifère..... 43
c - terre argileuse..... 44
d - terre limono-sableuse..... 44

2.2 Toxicité à long terme 46
2.3 Etude de la bioaccumulation 47

III. CAS DU MERCURE 48
3.1 Toxicité aiguë à 7 jours 48
a - sur artisol 48
+ avec l'espèce *E. fetida* 48
+ avec l'espèce *A. chlorotica* 50
b - terre humifère 50
c - terre argileuse 51
d - terre limono-sableuse 52
3.2 Toxicité à long terme 52
3.3 Etude de la bioaccumulation 53

IV. CAS DU CUIVRE 55
4.1 Toxicité aiguë à 7 jours 55
a - avec l'espèce *E. fetida* 55
b - avec l'espèce *A. chlorotica* 56
c - avec l'espèce *L. terrestris* 58
4.2 Toxicité à long terme 58

CONCLUSION 60

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 63

ANNEXES 66

I. ANALYSE CHIMIQUE DES TERRES UTILISEES 67

II. LES ESSAIS LITIERE 68

III. LE MODELE LOG-PROBIT 70

IV. DETAIL DU CALCUL DES CONCENTRATIONS EN METAUX LOURDS DES VERS DES DIFFERENTS ECHANTILLONS 75

V. TABLE DE LA DISTRIBUTION DE t 91

INTRODUCTION

Grâce aux observations et aux études de nombreux chercheurs, tels Darwin (1881), Muller (1879 ; 1884), Bouché (1972), les vers de terre sont sortis... de l'obscurité. Les annélides oligochètes terricoles commencent d'ailleurs à être si bien connus que nous ne présenterons, pour mémoire, que quelques généralités rapportées à leur sujet par Bouché (1979).

Leur biomasse est normalement comprise entre 1 et 3 T/ha en poids frais ; elle va en s'annulant dans les sols salés, desséchés ou glacés (déserts) et peut atteindre 4 T/ha en milieux fertiles (activité biologique intense). Cette biomasse peut atteindre 60 à 80 % de la zoomasse !

Si leur activité dans l'écosystème n'est pas constante (arrêt d'activité estivale), ils s'y maintiennent toute l'année et y jouent un rôle fondamental : ils se nourrissent des débris de matière organique qu'ils brassent dans leur tube digestif avec du sol minéral et qu'ils conditionnent d'une façon globalement favorable à l'activité microbienne. En perforant des galeries, ils permettent un micro-drainage du sol, la pénétration de l'énergie par l'enfouissement des litières, l'échange de fluides (gaz, eau,etc.), la dissémination de la microflore et de la microfaune.

L'importance de l'activité physiologique des lombriciens, du point de vue pédologique, est grande car ils sont le siège de nombreux échanges non encore quantifiés. Cette importance n'est pas ponctuelle, elle concerne pratiquement tous les territoires tempérés : si, en France, environ 16 millions d'hectares sont labourés mécaniquement, environ 50 millions d'hectares sont susceptibles de bénéficier du travail biologique des lombriciens.

Aujourd'hui, les agrotechniques (utilisation massive et générale de produits chimiques, fertilisation minérale, techniques culturales, etc.) et certaines pollutions industrielles (retombées de fumées, pollution de nappes phréatiques, etc.) menacent parfois ce potentiel agronomique. Elles justifient des recherches sur la nocivité de certains contaminants, plus ou moins dangereux, par des agronomes mais aussi par des éco-

logues ; en effet, selon leur nature ou leur état de liaison avec le sol, certains contaminants sont susceptibles d'être assimilés par les lombriciens et bio-accumulés. Comme ces derniers constituent la première biomasse animale disponible dans un écosystème, qu'ils contiennent 72 % de leur poids sec en protéines riches en lysine et possèdent une gamme variée d'acides gras, de nombreux animaux les inscrivent dans leurs régimes (taupe, musaraigne, oiseaux, poissons dulçaquicoles, batraciens, etc. cf. Bouché, 1972, p. 557). La diminution du nombre des vers, due aux effets létaux de contaminants, peut priver toute une faune de l'une de ses proies parfois exclusive.

La contamination des vers de terre est donc particulièrement inquiétante :

- pour la protection de notre environnement : de nombreux prédateurs sauvages peuvent être intoxiqués (sans conséquences visibles dues à l'absence d'études) ; tel est le cas du merle migrateur intoxiqué par le DDT contenu dans des vers (Hunt, 1965),

- pour l'homme, car elle contribue à la raréfaction et à la contamination du gibier ou des poissons dulçaquicoles.

Les manifestations de toxicité et de pollution dues aux métaux lourds sont devenues si graves depuis quelques années (exemple : catastrophe de Minamata, 1956-1965) qu'elles ont déclenché un grand nombre d'études et recherches à leur sujet. Parmi les plus étudiés, le plomb, le mercure, le cadmium présentent les dangers les plus sérieux.

Ils ont fait l'objet d'observations et de travaux célèbres, autant par leur originalité que par la gravité de leurs conclusions ; Ramade (1974) rapporte ceux de Murozumi, Chow et Petterson en 1969, qui étudièrent le taux de plomb dans les couches de neiges accumulées depuis plusieurs milliers d'années à la surface de l'inlandsis groenlandais, les recherches de Burnham, Moore et al. (1970-71) sur la corrélation de la circulation automobile et le taux de plomb dans l'air ; il cite encore les observations et recherches faites sur la tristement célèbre maladie de Minamata, au Japon, due à des résidus mercuriels et aussi les travaux de Jensen et Jernolov (1967) qui ont montré le rôle essentiel de certaines bactéries benthiques dans le passage du mercure au méthyl-mercure (CH_3Hg),

dérivé organique capable de s'intégrer aux mécanismes biochimiques des êtres vivants et, par conséquent, beaucoup plus toxique.

Un métal qui a fait très peu parler de lui en tant que métal lourd jusqu'ici doit encore être cité : il s'agit du cuivre, que l'on peut trouver en sol agricole suite à des épandages de fongicides cupriques en vergers, ou de lisier de porc en prairies. Ses incidences sur la faune du sol méritent d'être étudiées.

Les origines de ces contaminants, particulièrement nombreuses et diverses expliquent l'augmentation de leur fréquence relative dans la biosphère :

. Pour le plomb : les industries métallurgiques (fonderie), l'automobile avec les carburants, les incinérateurs d'ordures.

. Pour le mercure : les pesticides (organo-mercuriels), l'électrochimie de la soude et du chlore, l'électrotechnique, la métrologie, etc.

. Pour le cadmium : les fonderies de zinc, les crassiers, les fongicides, les quincailleries diverses, peintures, produits à base de zinc où le cadmium est une impureté, fertilisants phosphatés, charbon.

. Pour le cuivre : les fongicides cupriques, les lisiers de porc...

Les vers de terre, et à travers eux toute la faune du sol, sont concernés par ces polluants et c'est précisément une étude de l'impact de ces différents polluants sur le chaînon lombricien que nous voulons aborder dans ce mémoire.

PREMIERE PARTIE

BILAN DES CONNAISSANCES ACQUISES EN MATIERE DE POLLUTION SUR LA FAUNE DES LOMBRICIENS PAR LES METAUX SUIVANTS : CUIVRE, PLOMB, MERCURE ET CADMIUM

I. LE PLOMB

1.1 Etudes sur le terrain
1.2 Etudes de laboratoire
1.3 Conclusions

II. LE CADMIUM

1.1 Etudes sur le terrain
1.2 Etudes de laboratoire
1.3 Conclusions

III. LE MERCURE

IV. LE CUIVRE

4.1 Etudes sur le terrain
4.2 Etudes de laboratoire
4.3 Conclusions

BILAN DES CONNAISSANCES ACQUISES EN MATIERE DE POLLUTION SUR LA FAUNE DES LOMBRICIENS PAR LES METAUX LOURDS SUIVANTS : CUIVRE, PLOMB, MERCURE ET CADMIUM

Avant d'aborder une étude pratique, il était souhaitable de faire une sorte de bilan des recherches et des connaissances sur le sujet. En effet, des recherches très diverses ont été effectuées sur l'influence des métaux lourds étudiés sur le chaînon lombricien. En voici donc un bref résumé ; pour chaque métal sont présentés les principaux axes de recherche ainsi que leurs résultats et conclusions.

I. LE PLOMB

1.1 Etudes sur le terrain

Ce sont essentiellement des mesures de bioaccumulation sur des vers de terre récoltés aux alentours de mines de plomb et de zinc désaffectées (Ireland, 1975a, 1975b, 1975c, 1976a, 1976b, 1977a, 1977b) ou à des distances plus ou moins éloignées de routes très fréquentées (Williamson et Evans, 1972 ; Gish et Christensen, 1973) ou encore sur des friches (Van Hook, 1974).

Ainsi, Ireland (1975a,b,c, 1976a,b, 1977a,b) a-t-il montré qu'à Cmystwith (Pays de Galles), où des déchets miniers contribuent à perpétuer une pollution importante en plomb et en zinc malgré l'arrêt de la mine, que les vers autochtones (*Dendrobaena rubida*) sont capables de renfermer jusqu'à 7 000 ppm de plomb par rapport au poids sec de ver, sur un sol contaminé à 2 000 ppm environ. (ver témoin : concentration = 35 ppm ; sol témoin : concentration = 15 ppm).

D'autre part, il a fait certaines remarques d'ordre histologique sur ces mêmes vers (Ireland et Richards, 1977) dont celle-ci, concernant la localisation du plomb dans les vers : << le tissu chloragogène qui entoure l'intestin postérieur du ver a une fonction similaire à celle du foie des vertébrés (stockage du glycogène ; rôle dans le métabolisme de l'azote) ; or, une analyse aux rayons X des chloragocytes révèle du plomb et du phosphore dans les individus contaminés et un taux de glycogène plus

élevé dans les individus témoins : une corrélation négative plomb-glycogène suggérerait qu'il y a orientation du métabolisme des chloragocytes contaminés vers la rétention du plomb, lequel se fixerait donc surtout dans la région intestinale >>.

Gish et Christensen (1973) ont montré que, le long de grands axes routiers américains, des teneurs importantes de plomb dans le sol et dans les vers coïncidaient avec la proximité de la route (tableau I).

Distance de la route en m	Concentration en ppm de poids sec	
	du sol	des vers
3	468,3	269,8
6,1	135,9	113,1
12,2	71,4	80,5
24,4	48,1	43,5
48,8	53,4	52,7
Témoin	14,3	12,0

TABLEAU I : Comparaison des teneurs en plomb du sol et des vers pour des sols de bordure de deux grands axes routiers des U.S.A. (moyenne des 2) et pour des vers des espèces *L. terrestris, A. chlorotica, A. trapezoides* et *A. turgida*. D'après Gish et Christensen (1973).

1.2 Etudes de laboratoire

Les principaux travaux de laboratoire ont porté sur la localisation des polluants lourds dans les tissus du vers ; ainsi, sur *D. rubida*, Ireland (1975b) a montré que c'était le tube digestif postérieur (tissu chloragogène) qui renfermait le plus de plomb ; Wielgus-Serafinska et Kawka (1976), sur *E. fetida*, déterminèrent d'autre part, à l'aide de coupes fines, que les tissus les plus susceptibles de fixer le plomb étaient les épithéliums glandulaires, épidermiques et intestinaux.

Autre étude de laboratoire, celle d'Ireland (1977b) qui détermine sur des crapauds (*Xenopus laevis*) ayant ingéré des vers contaminés,

les principaux lieux de rétention du plomb ; le stockage s'effectue surtout dans les organes "filtrant" le sang : foie, reins, os (très peu de plomb dans les muscles et la peau).

1.3 Conclusions

De ces différentes études, on peut retenir tout d'abord que les vers semblent tolérants au plomb, dans la limite de la pollution actuelle et des expériences réalisées (Ireland, 1975a,b,c, 1976a,b, 1977a,b) et que, si le milieu de vie ou les aliments du ver sont contaminés, le ver l'est aussi car il fixe le plomb dans ses tissus mais sans facteur de concentration stable ni précisément défini jusqu'ici.

II. LE CADMIUM

2.1 Etudes sur le terrain

Deux expériences de bioaccumulation méritent d'être citées. Celle de Gish et Christensen (1973) est relative aux pollutions causées par 2 grands axes routiers américains (tableau II).

Distance de la route en m	Concentration en ppm de poids sec	
	du sol	des vers
3	1,23	12,6
6,1	0,72	8,8
12,2	0,72	8,3
24,4	0,68	6,9
48,8	0,72	7,1
Témoin	0,66	3

TABLEAU II : Comparaison des teneurs en cadmium du sol et des vers pour des sols de bordure de deux grands axes routiers des U.S.A. (moyenne des 2) et pour des vers des espèces *L. terrestris*, *A. chlorotica*, *A. trapezoides* et *A. turgida*. D'après Gish et Christensen (1973).

Citons aussi celle de Van Hook (1974) sur la concentration en cadmium des vers de 6 sols superficiels (10 premiers cm) de l'Est du Tenessee (U.S.A. ; sols non cultivés depuis 30 ans) (tableau III).

N° des sols	sol	vers	F_c (1)
1	0,32	7,2	22,5
2	0,20	3,1	15,5
3	0,28	6,1	21,8
4	0,80	9,3	11,6
5	0,28	5,1	18,2
6	0,23	3,4	14,8

(1) : F_c = facteur de concentration

TABLEAU III : Concentration en cadmium du sol et des vers (ppm de poids sec) et facteurs de concentration (F_c) pour des sols de l'Est du Tenessee (espèces de vers concernées *Allolobophora, Octolasium, Lumbricus*). D'après Van Hook (1974).

2.2 Etudes de laboratoire

Van Hook (1974), dans le cadre d'une application des techniques radio-isotopiques (utilisation du cadmium 109 radioactif), signale deux faits à l'issue de nombreuses expériences de laboratoire :

- Dans les écosystèmes soumis à des épandages éventuels de cadmium (pluie, gaz), ce dernier sera surtout disponible pour les animaux se nourrissant de litière et de détritus. La migration du cadmium est en effet lente du fait de sa fixation dans le sol.

- La pénétration du cadmium le long du profil d'un sol est fortement accentué en présence de certains vers (*Lumbricus*) et d'eau. La profondeur de pénétration du métal étant liée au mode d'alimentation des lombriciens, les vers du genre *Octolasium* (vers ne se nourrissant pas à la surface) ne jouent aucun rôle dans la migration du cadmium (sinon dans le cas d'une éventuelle bioaccumulation).

2.3 Conclusions

Les expériences ci-dessus ont montré que les vers accumulaient le cadmium de façon sensible (10 << facteur de concentration << 20) (Van Hook, 1974 ; Gish et Christensen, 1973) et insisté sur le rôle des vers dans la dissémination et les migrations d'un contaminant.

III. LE MERCURE

Bull et Roberts (1977), travaillant sur le terrain à proximité d'une usine de soude, montrèrent que le sol, la végétation, les vers de terre (*L. terrestris*) et les mousses étaient fortement contaminés en mercure dans les 500 m autour de l'usine (tableau IV).

Organisme contaminé	Distance aire d'étude-usine	
	0,5 km	10 à 30 km
Sol de 0 à 2 m de profondeur (n = 42) en µg/g de poids sec	3,81 ± 0,95	0,106 ± 0,009
Festuca rubra (n = 34) en µg/g de poids sec	4,01 ± 0,65	0,103 ± 0,008
Lumbricus terrestris (n = 18) en µg/g de poids frais	1,29 ± 0,32	0,041 ± 0,006
(en µg/g de poids sec)	(8,6)	(0,273)
Piège à mousse (n = 21) en mg/dm^2/jour	63,0 ± 9,9	3,5 ± 0,71

TABLEAU IV : Concentration du mercure dans le sol, *Festuca rubra*, *L. terrestris* et les pièges à mousse (sphaignes) en fonction de leur éloignement de l'usine. D'après Bull et Roberts (1977).

Les usines de soude caustique utilisent en effet des électrodes au mercure dans leur préparation et rejettent environ 250 g de mercure par tonne de soude produite. Les concentrations en méthyl-mercure (CH_3Hg) sont faibles (inférieures à 10 % de celle du total) mais tendent à augmenter dans les animaux vivant à proximité de l'usine, notamment dans les reins et les tissus musculeux. Les risques de bioaccumulation du mer-

cure au niveau des chaînes alimentaires comportant le maillon trophique lombricien sont à craindre (Bull et Roberts, 1977).

IV. LE CUIVRE

4.1 Etudes sur le terrain

Les principales études ou observations réalisées sur le terrain concernent l'influence des produits cupriques (fongicides) en vergers et des épandages de lisier de porc en prairies. Parmi plusieurs études en vergers, citons celles de Hirst et al. (1961), celles de Mochizuki et al. (1975) et celles de Van Rhee (1969 ; 1977) en vergers soumis à une contamination cuprique intense.

Citons encore celle de Van Rhee (1975) sur l'influence d'épandage de lisier de porc riche en cuivre sur la faune des lombriciens.

Qu'elles proviennent du Japon, de Grande Bretagne ou des Pays Bas, les observations faites en vergers hautement contaminés en cuivre (bouillies bordelaises, oxychlorure) sont souvent les mêmes :

- Accumulation de litière non décomposée à la surface du sol.
- Contamination importante de cette litière : jusqu'à 2 500 ppm de Cuivre (Hirst et al., 1961).
- Contamination des 10-15 premiers cm de sol superficiel : 412,6 ppm de 0 à 15 cm (Mochizuki et al., 1975), 120,0 ppm (Hirst et al., 1961).
- Dégradation éventuelle d'une structure du sol initialement grumelleuse (Van de Westeringh, en prép.).
- Dénombrement très réduit des vers de terre en sol de vergers contaminés et, en particulier, le nombre de jeunes est systématiquement beaucoup plus faible que celui des adultes (Van Rhee, 1969).

D'autres études veulent comparer le devenir de populations lombriciennes dans des vergers soumis à des épandages de produits chimiques plus ou moins systématiques et intensifs ; ainsi, Van Rhee (1969) met en évidence l'évolution des populations sur 8 ans dans les 2 cas d'un verger

"raisonné" et d'un verger "classique" (tableau V).

	ANNEES								
LUTTE INTEGREE	60	61	62	63	64	65	66	67	68
Densité moyenne de vers/m^2	300	460	590	420	310	280	465	470	500
Jeunes/m^2	60	105	165	95	55	60	190	165	125
Adultes/m^2	75	80	60	65	55	80	105	80	90
LUTTE CLASSIQUE									
Densité moyenne de vers/m^2	165	150	90	25	10	7	-	-	-
Jeunes/m^2	22	24	16	2	1	0	-	-	-
Adultes/m^2	70	45	30	9	6	3	-	-	-

TABLEAU V : Evolution de la population lombricienne dans 2 types de vergers (lutte intégrée : épandage chimique raisonné ; lutte classique : épandage intensif classique) pour l'espèce *A. caliginosa*.

Dans cette même étude, Van Rhee montre que les populations lombriciennes inoculées dans des vergers soumis à des traitements intensifs voient leurs effectifs faiblement multipliés (2,5 à 3 fois en 15 mois pour *A. caliginosa*) et même diminués (de 20 % pour l'espèce *L. terrestris*) par rapport aux observations réalisées sur des herbages inoculés pareillement (72 fois pour *A. caliginosa* en 29 mois). Dans une autre publication, plus récente (1977), il détermine l'existence d'une corrélation significative entre les taux de cuivre dans le sol de prairies contaminées par du lisier et dans le corps des vers (tableau VI).

Taux Cu sol	109,7	98,9	43,7	26,8	25,5	25,4	17,6	14,4	6,4
Taux Cu vers	63,0	39,0	20,0	19,0	19,0	16,0	14,0	12,0	10,0
Densité des vers/m^2	12	-	239	45	15	64	76	17	84

TABLEAU VI : Relation observée entre les taux de cuivre dans le sol et dans le corps des vers (en ppm de poids sec) des sols de prairies soumises à des épandages de lisier depuis plus de 10 ans. (Espèces concernées : *A. caliginosa, A. chlorotica, A. longa* et *L. rubellus*).

Autre corrélation positive entre le taux de cuivre et le taux de matière organique du sol ; selon Van Rhee (1975), en effet, si le cuivre a une action sur les vers, il est logique que le taux de matière organique non dégradée augmente (tableau VII).

Numéro des Exploitations	HAUTE CONCENTRATION			BASSE CONCENTRATION		
	MO %	Cu %	Vers/m^2	MO %	Cu %	Vers/m^2
1	7,4	64,6	16	8,5	7,4	143
2	12,3	36,0	10	6,3	7,1	176
3	6,4	45,8	169	5,7	6,0	215
4	12,2	31,4	138	9,6	11,8	182
5	7,1	33,0	69	4,7	5,6	0
6	12,1	34,1	153	4,3	8,2	42

TABLEAU VII : Comparaison des populations de vers entre prairies à haute et basse concentration de cuivre suite à des épandages de lisier. Cas de sols sableux (quelques sols tourbeux) des Pays Bas ; vers : *L. rubellus* et *A. caliginosa*. D'après Van Rhee (1975).

4.2 Etudes de laboratoire

Nous citerons une étude de Van Rhee (1969) qui traite de l'impact de l'oxychlorure de cuivre sur la reproduction du ver *A. caliginosa* (tableau VIII).

Production de cocons par adulte	Cu en ppm					
	0	50	100	150	300	350
Après 45 jours	4,8	5,4	4,2	1,9	0	-
Après 70 jours	6,7	-	-	8,5	-	1,6
Après 120 jours	14,5	-	2	-	0	0
Après 225 jours	18,8	-	-	23	10,3	-
Jeunes/adultes après 225 jours	11	-	-	5	1	-

TABLEAU VIII : Effet du cuivre (oxychlorure) sur la reproduction de *A. caliginosa*. D'après Van Rhee (1969).

4.3 Conclusions

Les conclusions de ces quelques études restent limitées, une fois encore, par leurs conditions d'expériences très particulières. Néanmoins, les observations faites se rejoignent souvent ; retenons l'essentiel :

- Les vers de terre sont très sensibles à une contamination par le cuivre et surtout les jeunes (Van Rhee, 1969), phénomène particulièrement grave en cas d'épandages de lisier répétés sur prairies et de produits cupriques en vergers (dégradation de la structure des sols à long terme, accumulation de litière à leur surface).

- Aucun phénomène de bioaccumulation n'a pu être mis en évidence de façon claire même si les vers sont apparemment capables de fixer le cuivre (Van Rhee, 1977).

A l'issue de ces travaux, nous pouvons remarquer la diversité des expérimentations et observations effectuées et les difficultés qui se posent pour conclure ou extrapoler à partir des résultats obtenus.

Si la plupart des travaux fournissent des informations intéressantes, il serait bien audacieux de tirer des lois de leurs résultats. En effet, ce sont souvent des cas particuliers plus ou moins extrapolables, les paramètres observés résultant d'interactions multiples souvent incontrolables.

C'est dans le but de pallier ces deux inconvénients que nous avons installé le dispositif d'expérimentation qui va suivre.

DEUXIEME PARTIE

EXPERIMENTATION REALISEE

A - Objectifs et méthodologie

B - Matériel et méthodes

I. ETUDE DE LA TOXICITE AIGUE DES METAUX LOURDS : MERCURE, PLOMB, CADMIUM ET CUIVRE

1.1 Essai "sol"
1.2 Essai "litière"

II. ETUDE DE LA BIOACCUMULATION DES METAUX LOURDS (CADMIUM, PLOMB ET MERCURE) PAR LES VERS DE TERRE

2.1 Technique d'analyse
2.2 Préparation des échantillons
2.3 Extraction des métaux lourds
2.4 Analyse des métaux
2.5 Calcul des concentrations

C - Résultats

I. CAS DU PLOMB

1.1 Toxicité aiguë à 7 jours
1.2 Etude de la bioaccumulation

II. CAS DU CADMIUM

2.1 Toxicité aiguë à 7 jours
2.2 Toxicité à long terme
2.3 Etude de la bioaccumulation

III. CAS DU MERCURE

3.1 Toxicité aiguë à 7 jours
3.2 Toxicité à long terme
3.3 Etude de la bioaccumulation

IV. CAS DU CUIVRE

4.1 Toxicité aiguë à 7 jours
4.2 Toxicité à long terme

EXPERIMENTATION REALISEE

A - Objectifs et méthodologie

Les relations lombriciens-milieux sont extrêmement variées et complexes dans la nature ; les lombriciens sont en effet pratiquement présents dans tous les écosystèmes spontanés et plus ou moins intensifiés (forêt, bord de rivière, prairie, etc.).

Cette variété et cette complexité se trouvent accrues si l'on considère l'action humaine, pouvant jouer par la date ou la dose d'apport d'un produit chimique sur une culture, l'épandage d'un engrais, le passage de certains outils...

Notre objectif est donc de comprendre, d'estimer, de quantifier, de maîtriser tous ces phénomènes dans leur complexité et diversité ; pour cela nous avons deux possibilités :

. on observe et on étudie ce qui se passe dans la nature, sur le terrain ; on réalise alors un travail objectif mais difficile à généraliser et à extrapoler puisqu'on se trouve dans un cas particulier de l'espace et du temps et que l'on ne peut contrôler une multitude d'interférences inconnues pour la plupart.

. On isole des mécanismes reproductibles au laboratoire : ces mécanismes doivent être connus comme ayant effectivement lieu dans la nature, y être importants et généralisés. Une telle démarche réductionniste nous prive cependant de tout renseignement sur le déroulement de ces phénomènes dans la nature.

Ces deux types d'analyses sont souvent opposés ; en fait, on peut espérer que des connaissances plus approfondies (à partir d'essais au laboratoire) et simultanément la multiplication d'observations et d'études dans la nature permettront de trouver des voies logiques pour savoir observer et comprendre où et quoi. Les études de laboratoire ont donc pour but d'aider à l'interprétation et à l'explication de phénomènes qui se produisent dans la nature avec une infinité d'interactions inconnues et/ou incontrôlables.

Nous avons donc installé des essais de laboratoire dans le but d'isoler, sur une population expérimentale, les effets des contaminants testés (toxicité, bioaccumulation). Pour permettre leur reproduction et leur contrôle, il fallait standardiser les conditions d'expérimentations :

- le mode d'apport du contaminant ; sa dose,
- le milieu d'élevage,
- la souche lombricienne,
- la conduite de l'essai,
- les paramètres à étudier.

C'est ce que nous avons fait, tout en restant conscients que ces travaux de laboratoire présentaient, pour la compréhension des effets des métaux lourds sur les lombriciens, un intérêt limité de par la nature nécessairement artificielle et analytique de ces recherches.

B - Matériel et méthodes

Sachons que les contaminants viennent en contact avec les lombriciens soit par la litière de surface (pulvérisation agricole, retombées industrielles, contamination des végétaux du milieu) ; soit après incorporation dans le sol (Bouché, 1979). Nous avons abordé l'étude de la toxicité et de la bioaccumulation des quatre métaux lourds suivants : mercure, plomb, cadmium et cuivre ; ceci en considérant deux types d'essais :

- le contaminant arrive avec un aliment organique consommable par les vers ; cet aliment joue le rôle de litière contaminée : ce sont les essais dits "litière",
- le contaminant est incorporé au sol et agit ainsi par contact externe et par ingestion (géophagie) : ce sont les essais dits "sol".

I. ETUDE DE LA TOXICITE AIGUE DES METAUX LOURDS : MERCURE, PLOMB, CADMIUM ET CUIVRE

1.1 Essai "sol"

Dans ce type d'essai, les métaux sont incorporés au sol lui-même ; les vers de terre qui vont y évoluer sont susceptibles d'être contaminés et/ou intoxiqués soit par contact externe, soit par ingestion.

a) souche lombricienne utilisée

Il nous fallait un ver de souche suffisamment homogène, facile à obtenir en quantité importante et capable de vivre dans le milieu artificiel qu'on lui réservait. *Eisenia fetida fetida* (Savigny, 1826) souche P. 1756, espèce épigée de petite taille, sans intérêt agronomique (cette espèce est très cosmopolite mais on ne la trouve que très rarement en écosystèmes naturels et pratiquement jamais en agrosystèmes), correspondait tout à fait à nos besoins ; de plus, nous savons l'élever au laboratoire sur des composts d'ordures ménagères ou du terreau ; il se reproduit rapidement (adulte à 6 semaines) et résiste bien aux manipulations.

Comme nous pouvons disposer de nombreux vers de cette espèce,

nous allons nous en servir pour tester la toxicité des différents métaux tout au long des essais ; cependant, nous allons faire aussi quelques essais avec deux autres espèces, que l'on trouve fréquemment dans la nature et dont les rôles agronomiques sont certains. Il s'agit d'une espèce endogée : *Allolobophora chlorotica chlorotica* (Savigny, 1826) souche P. 1947, prélevée au mois d'avril le long de la vallée de l'Ouche ; et d'une espèce épi-anécique *Lumbricus terrestris* (Savigny, 1826) souche P. 343, prélevée sur la prairie de Cîteaux par la méthode au formol.

N.B. : voir toutes les espèces précitées et leur nomenclature dans Bouché (1972).

Il peut être en effet intéressant de comparer ces trois espèces de vers quant aux résultats obtenus, afin de savoir s'il est justifié d'utiliser *E. fetida* comme ver standard, représentant le chaînon lombricien dans d'éventuelles études toxicologiques ultérieures.

b) type de sol utilisé

Nous avons utilisé un sol artificiel que nous appelerons artisol. Conformément aux objectifs précédemment définis, nous avions besoin pour nos vers d'un milieu de vie reproductible, chimiquement inerte, permettant leur survie pendant la durée de l'essai au moins. Ce sol standard a été réalisé à partir d'une silice artificielle déshydratée en poudre à laquelle on a ajouté de l'eau permutée dans des proportions telles qu'on obtienne une pâte susceptible de jouer le rôle de terre.

Dans le double but de mettre en évidence un effet éventuel de la nature du sol sur la toxicité des produits et de comparer les résultats de toxicité du milieu artificiel avec ceux des milieux "naturels", pour des doses semblables de contaminant, des essais de toxicité ont été conduits avec trois types de terre différents :

- une terre argileuse originaire de Cîteaux, récoltée à une profondeur de 1 m environ,
- une terre humifère prélevée dans les 30 cm de sol superficiel des bois de Chevigny Saint Sauveur,
- une terre limono-argileuse provenant de la plaine d'Ourou à une

profondeur de 30 cm. (Cf. tableaux de leurs analyses en annexe, p. 67).

c) préparation de l'essai

La poudre artificielle doit être "transformée" en terre par adjonction de 450 ml d'eau pour 180 g de poudre. La quantité d'eau ajoutée (250 % du poids sec de silice) correspond à l'obtention d'une pâte de consistance souhaitable pour les vers (ni trop compacte et sèche, ni trop liquide et humide).

Les terres doivent être préalablement mises à sécher en étuve à 60 °C (3 jours). Il nous faut ensuite établir un potentiel capillaire identique pour chaque terre, donc calculer le volume d'eau à ajouter à chaque terre pour installer les vers dans les mêmes conditions. Voici les principales étapes du procédé, résumées ci-dessous pour chaque terre étudiée.

. Centrifugation à 3 vitesses différentes (1 000 tours pendant 2 H 30 ; 500 tours pendant 2 H 30 ; 250 tours pendant 2 H 30) correspondant à 3 pF différents dont la détermination précise n'était ni importante ni possible ici. (Rappel : pF = log Ψ, avec Ψ = potentiel capillaire ou énergie de rétention de l'eau par le sol ; Ψ s'exprime en atmosphères).

. Observation des 3 échantillons centrifugés humides et choix de celui paraissant le plus favorable aux vers.

. Mise à l'étuve de cet échantillon à 60 °C pendant 24 H.

. Détermination de son humidité, exprimée par rapport au poids sec de terre utilisée ; ce sera l'humidité employée pour nos futures boîtes d'élevage.

L'humidité nécessaire pour satisfaire les mêmes conditions de succion de l'eau par les différentes terres seront donc, pour chacune d'elles :

terre humifère : 65,19 %
terre argileuse : 35,43 %
terre limono-sableuse : 16,75 %

} exprimées par rapport au poids sec de terre.

Les contaminants sont introduits solubilisés dans l'eau constitutives des milieux ; nous utilisons en effet des sels solubles du plomb ($PbNO_3$), du cadmium ($Cd\ Cl_2$), du mercure ($Hg\ Cl_2$) et du cuivre ($Cu\ SO_4$), dont nous calculons le poids nécessaire à la confection des différentes doses en ppm en fonction du poids sec de terre ou de lévilite.

Les principales propriétés physiques de ces sels sont résumées dans le tableau I.

SEL	P.M. TOTAL en g	P.M. METAL en g	T FUSION en °C	T EBUL. en °C	SOLUBILITE mg/100 ml d'eau
$Pb\ (NO_3)_2$	331,19	207,19	470		0 °C 37,65 100 °C 127
$Cu\ SO_4$ $5\ H_2O$	249,68	63,546	110	150	0 °C 31,6 100 °C 203,3
$Cd\ Cl_2$	183,32	112,4	568	960	20 °C 40 100 °C 150
$Hg\ Cl_2$	271,496	200,59	176	302	20 °C 6,9 100 °C 48

TABLEAU I : Les sels de métaux lourds utilisés et leurs principales propriétés physiques (Anonyme, 1964).

Après avoir mélangé dans une cuvette et sous hotte aspirante (à cause des poussières de silice) le contenu d'une future boîte d'élevage (poids de terre défini et eau distillée contaminée à la dose voulue par l'essai), nous ajoutons 2,850 kg de billes de verre que nous incorporons soigneusement au mélange après les avoir rincées. D'un diamètre compris entre 18,5 et 21,5 mm, supposées inertes chimiquement, ces billes, convenablement enrobées, servent de substrat aux différentes "terres" ; d'autre part, elles permettent la formation de pores à l'intérieur du sol pour la circulation de l'air et des vers (l'espèce *Eisenia fetida* n'étant pas fouisseuse, elle ne creuse pas de galeries et ne supporterait pas un milieu compacté).

Le sol est transvasé de la cuvette de préparation à une boîte d'élevage parallélépipédique, en plastique, de surface 300 cm^2, de hauteur 10 cm.

Les compositions des différentes boîtes d'élevage en fonction des terres utilisées sont résumées dans le tableau II.

Poids en g	Lévilite	Humifère	Argileuse	Limono-sableuse
Sol	180	300	460	460
Eau	450	195	163	77
Billes	2 850	2 850	2 850	2 850
TOTAL	3 480	3 345	3 473	3 387

TABLEAU II : Récapitulatif de la composition des différentes boîtes d'élevage.

Ces boîtes sont percées de 3 trous munis de filtre, en tulle, pour la circulation de l'air : l'un est percé au niveau du fond, l'autre au niveau de la surface, le troisième permet l'emboîtement d'un tuyau servant à raccorder la boîte avec les canalisations de l'aération forcée (air saturé en eau) de la salle d'élevage.

Le dispositif d'élevage utilisé répond à deux exigences :

. placer les animaux dans des conditions de température, d'humidité et d'aération les plus favorables,

. faire en sorte que la mort d'un animal n'entraîne pas, à cause de la putréfaction et des gaz toxiques qu'elle dégage, celle des vers de la même boîte.

Ces objectifs ont été atteints en installant une aération forcée des boîtes d'élevage avec de l'air saturé d'eau ; il n'y a donc plus besoin d'arroser pour assurer l'entretien de l'humidité initiale. Le dispositif de ventilation comporte une pompe injectant l'air à la base d'une colonne d'eau, sous forme de très petites bulles grâce à une plaque de verre fritte. A la sortie de cette colonne, l'air saturé est distribué par des canalisations dans les récipients d'élevage qu'il traverse avant d'être libéré dans la salle. L'humidité théorique de l'air arrivant au niveau de la boîte est de 100 % (cf. figure I du dispositif d'aération).

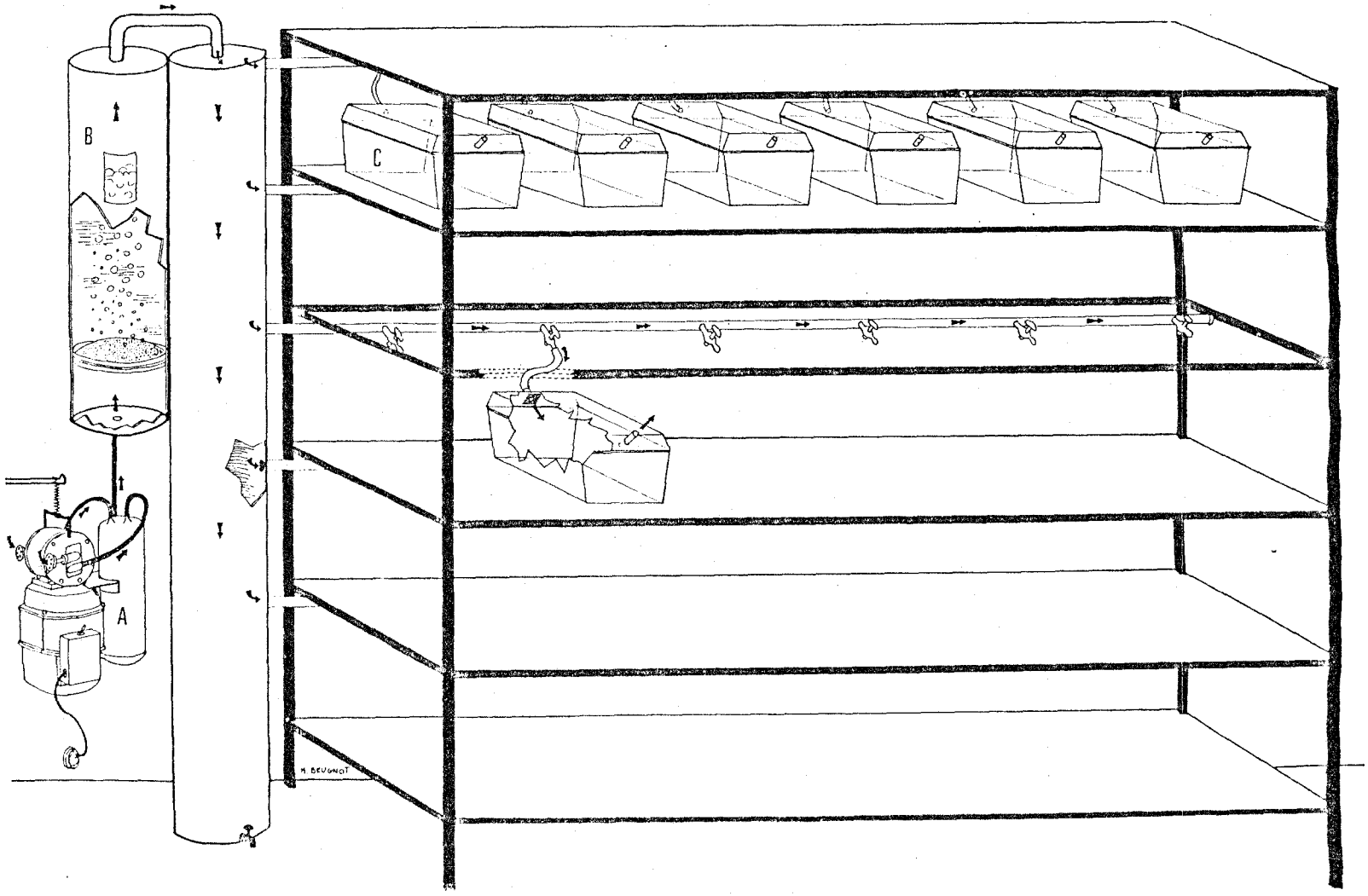


FIGURE I : Dispositif d'aération continue des boîtes d'élevage : l'air propulsé par une pompe A et saturé dans la colonne d'eau B avant de traverser les boîtes d'élevage C. Les flèches indiquent le flux d'air. D'après Bouché (1972).

Les températures optimales de vie des différentes espèces de vers testés sont obtenues grâce à un système de réfrigération thermostatée, fournissant la température voulue dans les différentes cases d'élevage :

22,5 °C pour *E. fetida*,

18 °C pour *A. chlorotica*,

18 °C pour *L.terrestris*.

d) conduite de l'essai

Pour chaque métal, nous commençons par faire une dose témoin (dose nulle) et trois doses : 10, 100 et 1 000 ppm (rapportées au poids sec d'artisol), de façon à repérer la zone toxique ou zone efficace pour l'espèce *E. fetida* ; dans chaque boîte nous introduisons, après pesée, un lot de 20 vers adultes ou subadultes, pesant en moyenne 8 g. Au bout de 7 jours, les survivants sont dénombrés, pesés et mis à congeler afin d'analyser ultérieurement une éventuelle bioaccumulation.

En s'appuyant sur les résultats précédents, au minimum 6 doses supplémentaires (Lowy, 1977) sont ensuite confectionnées parmi lesquelles 1 dose à effet faible ou nul, 4 à effet intermédiaire et 1 à effet fort, plus 1 dose témoin. Ces doses mises au point sur artisol, sont ensuite répliquées dans les différentes terres (toujours pour l'espèce *E. fetida*) puis avec les deux espèces de vers *A. chlorotica* et *L. terrestris* sur artisol. A l'issue des essais (7 jours) on procède comme pour les doses préliminaires (comptage, pesage, congélation).

Il s'agit alors d'étudier et d'interpréter les résultats obtenus ; nous établissons pour cela les courbes log-probit avec calcul de mortalité corrigée selon Abbott (le principe de transformation log-probit couramment utilisé dans les études de toxicologie, est détaillée en annexe p. 70), puis le coefficient de corrélation r et F de Fisher-Snedecor (avec tests de significations aux seuils de 1 et 5 %). Ces courbes permettent la lecture directe de la CL 50 et de la dose PPDS (Plus Petite Dose ayant un effet Significatif au seuil de 5 %). Cette dernière dose, spécifique de chaque métal dans les conditions décrites, va servir à la réalisation d'un essai supplémentaire visant à préciser la mortalité en fonction du temps. On refait 5 doses dont une témoin et 4 PPDS et on lit la mortalité chronique à 7, 14, 21 et 28 jours ; le témoin à 28 jours. De même que pour les autres essais, les vers sont conservés pour l'analyse.

1.2 Essai "litière"

Dans ces essais, le contaminant est incorporé à un aliment organique qui est répandu à la surface de l'artisol. Cet aliment joue ainsi le rôle de litière contaminée. On étudie la toxicité due à l'ingestion de cette litière par les vers.

a) souche lombricienne utilisée

La souche utilisée est la même que celle utilisée couramment pour les essais "sol" : il s'agit d'*E. fetida*.

b) type de sol utilisé

Il s'agit d'artisol.

c) préparation de l'essai

La litière contaminée consiste en un apport de son tamisé entre 1 et 2 mm que l'on désinfecte au préalable par passage à l'étuve 3 H à 60 °C pour éviter que les moisissures et en particulier les mucors ne se développent trop vite.

Ce son doit être humidifié pour être consommé ; le contaminant est donc apporté avec la phase liquide destinée à l'humification du son. L'établissement des doses de polluant est agencé de la façon suivante : on considère une pollution arbitraire de 1 kg de matière active par hectare, ce qui, rapporté à la boîte d'élevage (S = 300 cm^2), fait 3 mg pour la surface de la boîte. Ces 3 mg sont dissous dans l'eau servant à humidifier les 500 mg de son sec apportés à chaque boîte. Ce son humidifié, contaminé, est ensuite réparti en plusieurs points de la surface de l'artisol. Les conditions d'élevage sont les mêmes que pour les essais "sol".

d) conduite de l'essai

Pour chaque métal, nous commençons par faire une gamme de 3 doses : 0,3 mg/500 mg de son sec
3 mg/500 mg de son sec
30 mg/500 mg de son sec.

Nous observons alors la consommation du son par les vers pendant 7 jours. Trois doses supplémentaires, sous le seuil de non consommation, sont confectionnées de façon à préciser ce seuil et la dose subcritique juste inférieure à ce seuil.

N.B. : la réalisation de ces essais n'a été qu'ébauchée pour plusieurs raisons : le son initialement utilisé a tout d'abord moisi à la surface de l'artisol, empêchant toute consommation éventuelle. Nous l'avons alors passé à l'étuve pour le stériliser et avons recommencé les essais avec le plomb seulement ; nous nous sommes alors aperçus que les vers des essais "sol" ingéraient le milieu artificiel minéral ! Les toxicités observées dans ces essais ne pouvant être attribuées au seul contact du milieu par les vers, mais aussi à l'ingestion, il nous a paru inutile de poursuivre les essais "litière" parallèlement avec les essais "sol", d'autant qu'il nous fallait tenir compte de contraintes de temps. Les quelques résultats de ces essais sont rapportés en annexe p. 68.

Devaient alors suivre des essais destinés à déterminer le temps létal 50 (TL 50) en conditions subcritiques, toujours avec l'espèce *E. fetida* ; ces essais, n'ayant pas été abordés ici, devaient se dérouler de la façon suivante : 5 boîtes d'artisol sont préparées, dont 1 témoin. On apporte dans 4 boîtes le son à la dose subcritique en petites quantités tous les 3 à 4 jours (le son contaminé étant stocké au congélateur). Des boîtes ainsi préparées, l'une sera vidée à 7 jours, l'autre à 14 jours, une troisième à 21 jours et enfin la dernière et la boîte témoin à 28 jours.

Le TL 50 (temps létal 50 = temps au bout duquel 50 % de la population a péri) une fois établi pour *E. fetida*, les mêmes essais auraient dû être recommencés avec deux autres espèces de vers, toutes deux anéciques, afin de comparer les résultats obtenus à l'issue de ce dispositif d'expériences.

II. ETUDE DE LA BIOACCUMULATION DES METAUX LOURDS (CADMIUM, PLOMB, ET MERCURE) PAR LES VERS DE TERRE

2.1 Technique d'analyse

Nous utiliserons pour les analyses la spectrophotométrie d'absorption atomique (S.A.A.). Mise au point par Walsh en 1955, la S.A.A. prend

de plus en plus d'importance dans les études de toxicologie, elle permet de doser de faibles quantités d'éléments métalliques sans qu'il soit nécessaire de faire des extractions et elle garde toute sa spécificité. La seule limite est de pouvoir trouver la source lumineuse convenable pour chaque élément à doser.

Son principe repose sur une propriété fondamentale des atomes, définie par la loi de Kirchhoff : << un atome peut absorber les radiations qu'il est par ailleurs capable d'émettre >>. On fait donc absorber à l'atome, amené à l'état fondamental, une raie lumineuse , en particulier la raie de résonance,qui est la plus intense et qui permet d'avoir une plus grande sensibilité au cours des dosages. Cet atome absorbe un quantum de l'énergie excitatrice, passe à l'état énergétique supérieur ; il y a donc absorption d'une partie de l'intensité de la radiation excitatrice (cf. figures II, III et IV). On mesure la diminution de l'intensité. Pour mettre en oeuvre la méthode, il faut donc :

. produire un faisceau de radiation à la résonance de l'élément à doser,

. amener l'échantillon à analyser sous forme atomique,

. faire passer le faisceau lumineux au travers de la vapeur atomique qui en absorbe une partie,

. déterminer le pourcentage d'absorption d'après la diminution de la raie de résonance qui est proportionnelle à la quantité de subtance à analyser.

Pour cela, le S.A.A. Beckman modèle 1248, sur lequel nous travaillons, comporte les dispositifs suivants :

. un système émetteur : la source lumineuse est constituée par une cathode creuse dont la nature est différente selon l'élément à doser. Cette lampe émet la radiation de résonance de ce dernier. Les lampes utilisées ici sont :

- cadmium : lampe à cathode creuse Cathoden Ltd,
- plomb : lampe à cathode creuse Cathoden Ltd,
- mercure : lampe à cathode creuse Beckman.

L'intensité du courant de travail indiquée par le constructeur correspond en général au maximum de sensibilité et de durée de vie

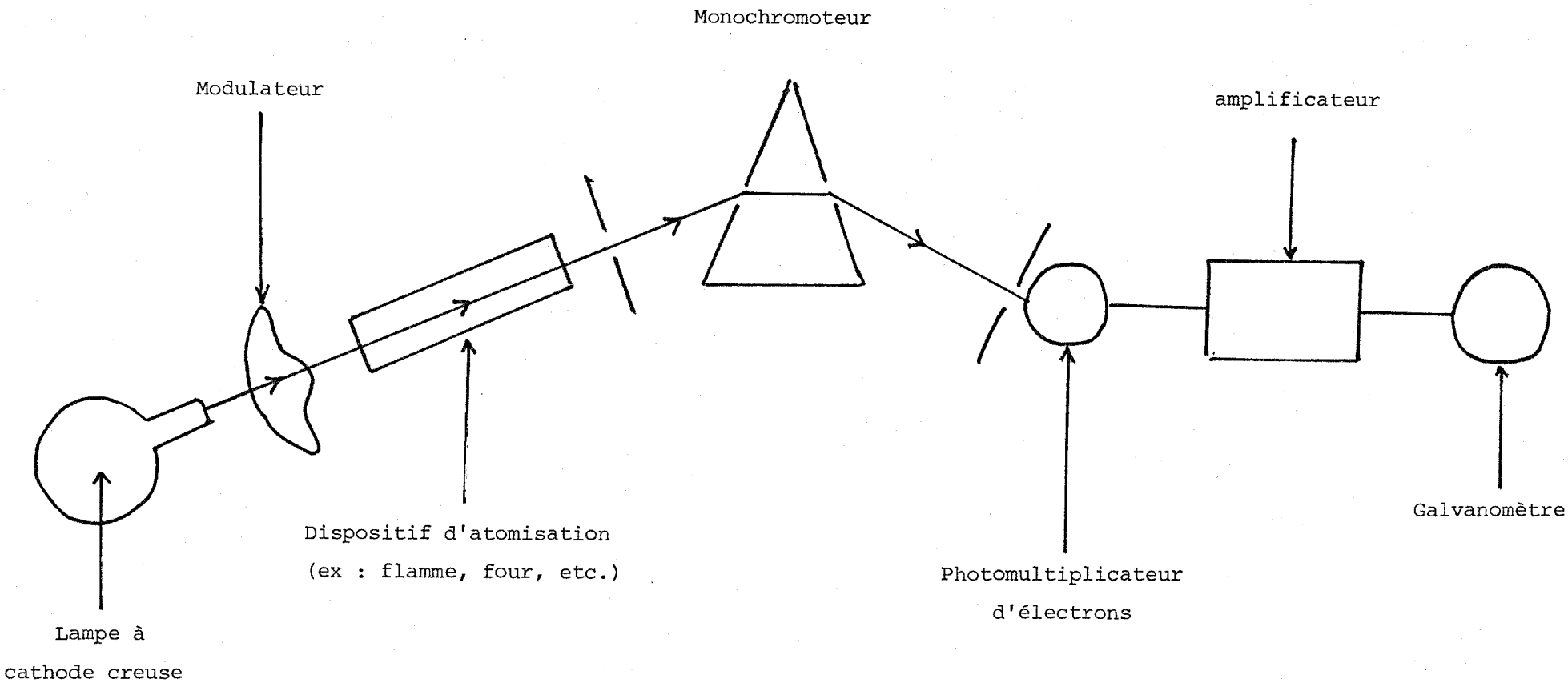


FIGURE II : Principe d'un spectrophotomètre d'absorption atomique
D'après Russel, Shelton et Walsh (1957).

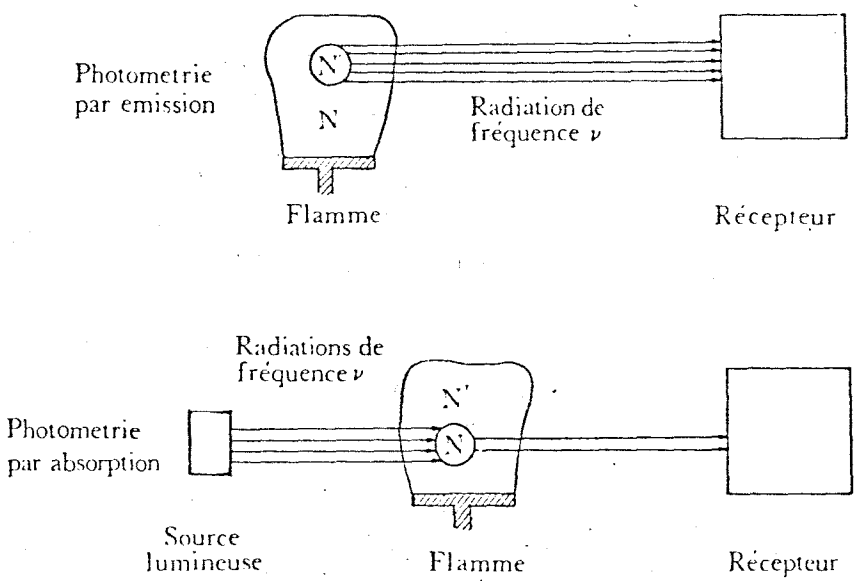


FIGURE III : Représentation schématique des photométries de flamme par émission et par absorption.

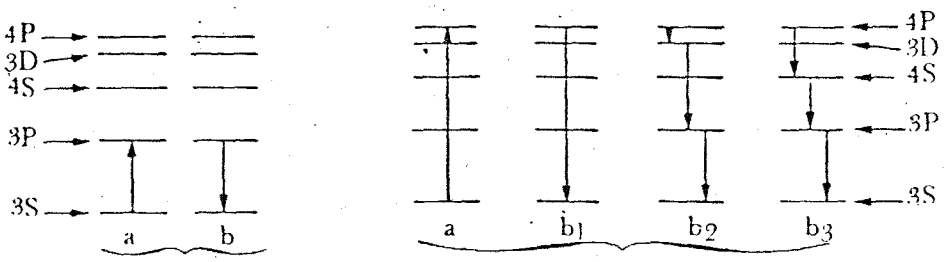


FIGURE IV : Différence entre raie de résonance et raies quelconques.

de la lampe. Les intensités, variables selon les lampes, sont notées dans le tableau III.

Lampe des métaux	Intensité Max en mA	Intensité nor en mA
Pb	6	6
Cd	6	6
Hg	10	7

TABLEAU III : Intensités maximale (Max) et normale (nor) des différentes lampes utilisées.

(Les lampes doivent être chauffées 15 mn avant leur utilisation de même que tout l'ensemble électronique).

. Un système d'atomisation : pour le cadmium et le plomb, nous utilisons le "four" et, pour le mercure, un dispositif spécial (cf. figures V et VI).

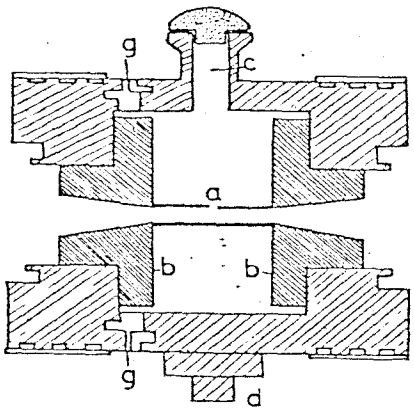
a) cas du cadmium et du plomb

On utilise un système sans flamme ; les systèmes sans flammes ont été mis au point pour pallier certains inconvénients du système à flamme où on ne peut pratiquement pas faire varier les températures du mélange à analyser. Or chaque élément métallique a une température d'atomisation bien définie. De plus, ils permettent de travailler sur de petites quantités d'échantillon de l'ordre du microlitre avec une meilleure sensibilité.

Le four Massman, ou cuvette de graphite, est mis à la place du brûleur classique. On introduit 20 µl d'échantillon directement dans le tube de graphite (6 à 8 mm de diamètre, 50 à 60 mm de longueur) à l'aide d'une micropipette automatique Eppendorf. L'ensemble est relié à un système d'alimentation électrique qui permet de fixer en température et en temps les différentes phases de l'analyse :

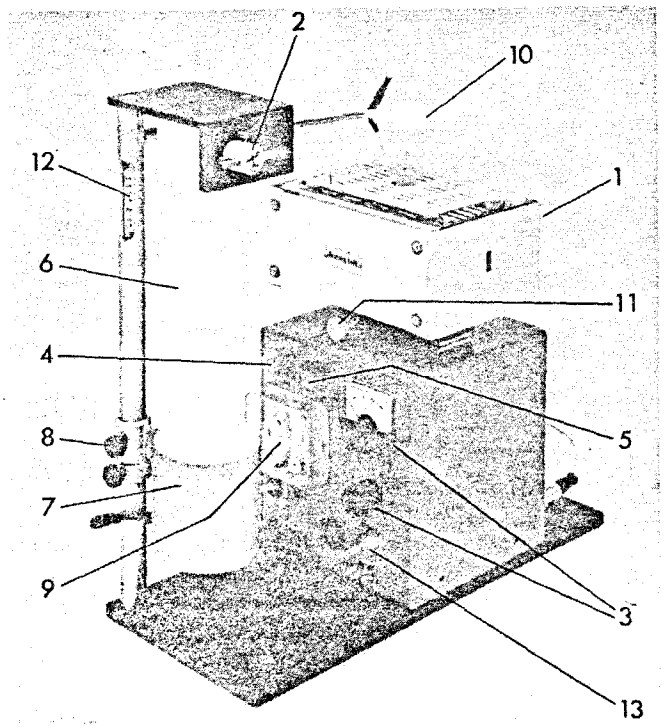
. séchage, ou volatilisation, du solvant (100 °C et 1 mn),

. minéralisation, ou calcination, ou décomposition, pendant laquelle on s'efforce de simplifier la matrice (=environnement chimique



a : tube en graphite
b : disques en acier
c : ouverture pour introduction de l'échantillon
d : support
g : isolants en platique

FIGURE V : Schéma du four Massman



1 : cellule quartz dv. el. chauffant
2 : valve de communication du gaz
3 : régulateur de température
4 : interrupteur pour cell. chauffage
5 : interrupteur principal
6 : cuve de réaction
7 : agitateur magnétique
8 : tige pour ajuster la hauteur
9 : pompe
10 : thermocouple
11 : vis de fixation
12 : débit-mètre
13 : reg. de débit-mètre

FIGURE VI : Schéma du système d'atomisation du mercure.

du métal) au maximum (la température est fonction de l'élément à doser et le temps de la nature de la matrice : environ 2 mn),

. atomisation : il s'agit d'amener l'élément métallique sous forme d'atomes (la température dépend encore de l'élément et cette opération est toujours très courte : 25 à 35 s),

. nettoyage du four, ce qui supprime en même temps les effets dits de "mémoire" (3 500 °C, 5 s).

Le programme préétabli se déroule automatiquement. L'appareillage comporte de plus une circulation d'eau froide autour du four et un courant d'argon qui balaie en permanence le four afin de ralentir l'usure du graphite.

b) cas du mercure

Le spectrophotomètre utilisé est le même que celui décrit précédemment ; la seule différence porte sur le système d'atomisation qui prend la place de la flamme ou du four Massman (cf. figure VI).

Le principe de la mesure est le suivant : la solution à doser est introduite dans la fiole de réaction où l'on fait arriver du borhydrure de sodium. Comme on est en présence d'H_2SO_4 , il se forme de l'hydrogène naissant selon la réaction :

$$2\ Na\ BH_4 + H_2SO_4 + 6\ H_2O \longrightarrow 16\ H + 2\ H_3BO_5 + Na_2\ SO_4$$

L'hydrogène naissant réduit le sulfate mercurique (forme chimique du mercure dans l'échantillon traité) selon la réaction :

$$Hg^{++} + 2\ H \longrightarrow Hg + 2\ H^{+}$$

Les atomes de mercure ainsi formés sont entrainés par un gaz inerte (argon) dans la cellule de quartz où ils absorbent une partie de la raie de résonance qui traverse cette cellule.

. Un système dispersif : il est constitué par un système optique comportant une fente d'entrée réglable de 1 à 12, un monochromateur à réseau permettant de séparer les diverses longueurs d'onde par rotation de celui-ci. La gamme va de 190 à 850 mm.

. Un système récepteur : c'est un photomultiplicateur mis sous tension à une valeur située entre 400 et 600 V. La lecture peut se faire soit sur galvanomètre dont l'échelle est graduée en absorbance et en transmittance, soit sur un enregistreur. L'appareil dont nous avons disposé possède une lampe au deutérium pour la correction des absorptions non spécifiques. Cette lampe, placée sur le trajet de la raie de résonance, absorbe dans l'U.V., on a donc un double faisceau qui permet de corriger les variations d'intensité de la lampe. L'appareil peut lire la différence entre l'absorption dans la raie de résonance et l'absorption en U.V. de la lampe au deutérium. Ceci s'avère très utile contre les absorptions moléculaires que l'on observe surtout avec les fours. Leur origine n'en est pas encore totalement connue. Ce sont surtout les petites molécules, comme CO et NO, qui sont mises en cause car elles absorbent dans l'U.V., domaine du rayonnement électromagnétique où se trouve la plupart des raies de résonance.

2.2 *Préparation des échantillons*

a) cas du plomb et du cadmium

La préparation des échantillons pour le plomb et le cadmium s'effectue de la même façon : les vers sont ouverts longitudinalement, côté face ventrale, débarassés du contenu contaminé de leur tube digestif (qui fausserait les résultats de bioaccumulation) à l'aide d'un pissette d'eau distillée, égouttés et pesés avant d'être répartis dans des coupelles (1 à 2 g de vers frais par coupelle) mises au four à 105 °C pendant 24 H. A la sortie du four, les coupelles sont repesées et leur contenu transvasé dans des Erlenmeyers de 25 ml dans lesquels se fait la minéralisation.

b) cas du mercure

Les vers sont débarassés du contenu de leur tube digestif de la même façon que précédemment, pesés et directement introduits dans l'Erlenmeyer (1 à 2 g de vers frais par Erlenmeyer) où l'on va procéder à une minéralisation progressive, car le mercure se dégage rapidement si la température devient trop élevée.

2.3 Extraction des métaux lourds

a) cas du plomb et du cadmium

La minéralisation pratiquée est la même pour les deux métaux elle a pour rôle de rompre les liaisons existant entre la matière organique et la structure minérale. Elle est réalisée à chaud, avec le mélange de H Cl (d = 1,19) et H NO_3 (d = 1,4). Un poids sec déterminé de vers (compris entre 100 et 200 mg) est placé dans un Erlenmeyer de 25 ml avec 0,5 ml de H Cl, 0,5 ml d'H NO_3 et 2,5 ml d'eau distillée (toute la verrerie doit être parfaitement propre, nettoyée de préférence avec H Cl et rincée à l'eau distillée).

Après avoir ajouté des billes de verre pour éviter les projections, le mélange est chauffé au bain de sable pendant 30 mn (de l'eau distillée est ajoutée de temps à autre pour conserver un volume constant et éliminer les vapeurs nitreuses). Lorsque le milieu initialement de teinte rouge (vers) devient jaune clair, c'est la fin de la minéralisation.

On laisse refroidir puis on filtre sur filtre sans cendre, préalablement imbibé d'eau distillée, directement dans un tube de 10 ml et on complète à l'eau distillée. Un "blanc" est préparé dans les mêmes conditions, avec les mêmes proportions d'acide et d'eau.

b) cas du mercure

Une fois introduit l'échantillon de vers frais dans l'Erlenmeyer, il faut procéder comme suit :

- ajouter 5 ml d'H_2 SO_4 concentré,
- porter au bain-marie bouillant pendant 30 mn en agitant de temps en temps,
- retirer du bain-marie, porter au bain de glace et agiter doucement,
- retirer du bain de glace et laisser reposer 30 mn à la température de la pièce,
- porter à nouveau au bain-marie bouillant pendant 30 mn en agitant

de temps en temps,

. retirer du bain-marie, laisser un peu refroidir et ajouter 5 ml de K Mn O_4 (préparée à la dose de 30 g/500 ml d'eau),

. chauffer jusqu'à ébullition et refroidir,

. après refroidissement, transvaser dans une fiole jaugée de 50 ml. Ajouter 5 ml d'une solution d'hydroxylamine chlorhydrate (préparée à la dose de 50 g/500 ml d'eau), agiter et compléter à 50 ml.

N.B. : un blanc est réalisé comme suit : dans un Erlenmeyer on met 5 ml d'H_2 SO_4 et 5 ml de K Mn O_4 que l'on porte à ébullition ; la suite du processus est la même que pour les échantillons.

2.4 *Analyse des métaux*

a) cas du plomb et du cadmium

L'établissement et le passage à la gamme d'étalonnage sont en annexe p. 75.

Les échantillons à doser sont passés au S.A.A. selon le processus précédemment décrit. Chaque mesure est effectuée 2 fois : on prend la moyenne des 2 pics d'absorbance sur le papier enregistreur. Les conditions opératoires sont résumées dans le tableau IV.

Source de radiation	Lampe à cathode creuse du Pb	Lampe à cathode creuse du Cd
Longueur d'onde λ en nm	253,7	326,11 228,80
Ouverture de fente	5	10
Temps d'intégration en s	16	32
Mode opératoire	Integrate-memory continuous	

TABLEAU IV : Principaux réglages à exécuter pour le dosage des échantillons contaminés en plomb et en cadmium.

b) cas du mercure

Dans la cuve de réaction du dispositif on introduit successivement : 10 ml de solution étalon ou d'échantillon,
3 ml d'H_2SO_4 à 45 %,
10 ml d'eau distillée.

N.B. : si la solution est très concentrée, on peut utiliser les proportions suivantes : 1 ml de solution
3 ml d'H_2SO_4 à 45 %
19 ml d'eau distillée

La solution de chlorhydrure de sodium stabilisée (en milieu alcalin) est placée dans un Bécher où trempe le tuyau souple de la pompe péristaltique.

On fait passer le courant d'argon en même temps que l'on introduit la solution de borhydrure en mettant la pompe péristaltique en route. A ce moment, le courant d'argon entraîne les vapeurs de mercure dans la cellule de quartz. Sur le papier d'enregistrement, on visualise le pic du mercure.

En fin de mesure, on arrête l'argon et l'arrivée de la solution de borhydrure. Tout appareillage est soigneusement rincé avant d'effectuer un nouveau dosage.

Lors des dosages, les réglages optiques de l'appareillage sont les suivants :

. longueur d'onde λ utilisée en mm ; λ = 253,65 mm

. ouverture de fente = 5

. temps d'intégration = 16 s

. mode opératoire : continuous measure (mesure en continu).

2.5 Calcul des concentrations

La lecture de l'absorbance de chaque échantillon est faite sur le papier d'enregistrement (moyenne de deux essais) puis reportée sur

la courbe d'étalonnage qui donne la concentration en métal en ppm ou en mg de la quantité dosée. Les valeurs trouvées sont rapportées au volume total de l'échantillon à doser, puis au poids de la prise d'essai et exprimées en ppm de poids sec (Cd, Pb) ou frais (Hg) des vers. (Cf. détail des calculs en annexe p. 75).

(Pour permettre la comparaison des résultats du mercure avec ceux des autres métaux, les quantités de mercure exprimées en ppm de poids frais de vers seront aussi exprimées en ppm de poids sec à l'aide d'un coefficient multiplicateur égal à 6,7).

C - Résultats

Abréviations utilisées dans ce chapître : PS : poids sec ; PF : poids frais ; N.I. vers : nombre initial de vers ; N.S. : nombre de survivants ; C : concentration ; mort. : mortalité ; PH : poids humide

I. CAS DU PLOMB

1.1 Toxicité aiguë à 7 jours

a) avec l'espèce *E. fetida*

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.I. vers	N.S. à 7 jours	% mortalité	% mortalité corrigée
10	2,85	20	20	0	0
100	28,5	20	20	0	0
1 000	285,7	20	19	5	0
10 000	2857	20	20	0	0
TEMOIN		20	19	5	

TABLEAU I : Résultats de toxicité aiguë du plomb à 7 jours avec *E. fetida* sur artisol.

b) avec l'espèce *A. chlorotica*

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.I. vers	N.S. à 7 jours	% mortalité	% mortalité corrigée
100	28,5	20	20	0	0
1 000	285,7	20	19	5	5
TEMOIN		20	20	0	0

TABLEAU II : Résultats de toxicité aiguë du plomb à 7 jours avec *A. chlorotica* sur artisol.

c) conclusions

Les doses employées de ce sol ne provoquent pas de mortalité

significative de ces vers ; quel que soit le sol utilisé, il nous a paru inutile de poursuivre à des doses plus fortes les essais de toxicité à 7 jours, sachant que de telles doses n'ont que peu de chances d'exister dans la nature. En accord avec les travaux déjà réalisés (Ireland, 1975 ; 1976 ; 1977), nous pouvons confirmer déjà que les vers semblent très tolérants vis-à-vis du plomb. Nous n'avons donc pas pu conclure quant à d'éventuelles différences de sensibilité des deux espèces vis-à-vis de ce contaminant.

1.2 Etude de la bioaccumulation

a) avec l'espèce *E. fetida*

Essai	C milieu en ppm PS	C vers en ppm PS	Facteur de C
Toxicité aiguë à 7 jours avec Artisol *E. fetida*	Témoin = 0	5	-
	1 000	85	0,085
	10 000	300	0,030

TABLEAU III : Résultats de bioaccumulation des vers des essais de toxicité aiguë à 7 jours.

b) avec l'espèce *A. chlorotica*

Essai	C milieu en ppm PS	C vers en ppm PS	Facteur de C
Toxicité aiguë à 7 jours avec Artisol *A. chlorotica*	100	14	0,14
	1 000	100	0,1

TABLEAU IV : Résultats de bioaccumulation des vers des essais de toxicité aiguë à 7 jours.

c) conclusions

Ces quelques analyses, réalisées à partir d'échantillons ayant vécu 7 jours en milieu hautement contaminé, montrent que les vers sont ca-

pables de fixer du plomb mais, ici, ils ne l'ont pas concentré à des doses égales à plusieurs fois la dose du milieu contaminé ; la durée de l'essai (7 jours) n'est sans doute pas suffisante.

II. CAS DU CADMIUM

2.1 Toxicité aiguë à 7 jours

a) sur artisol

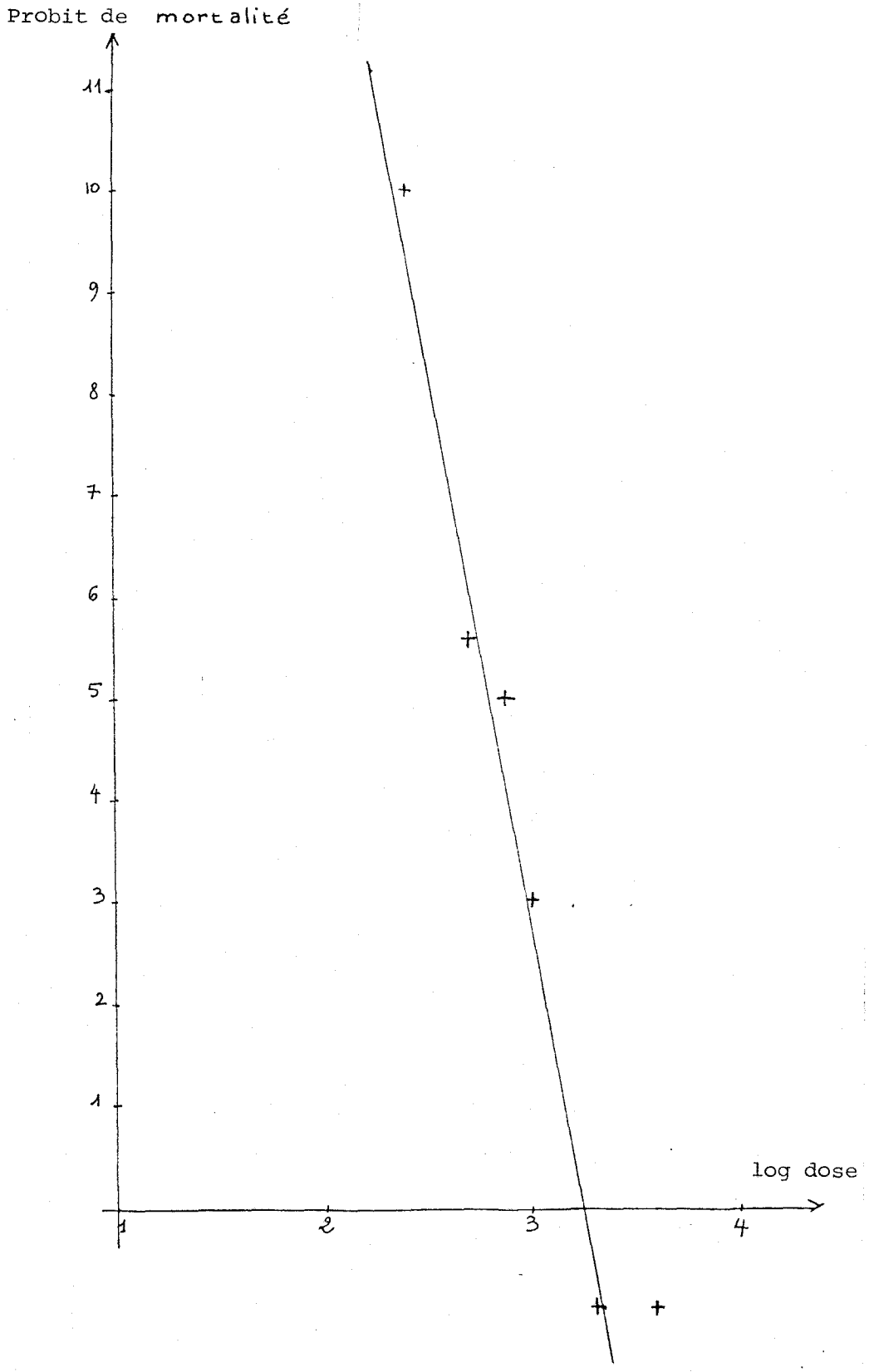
+ avec l'espèce *E. fetida*

dose du milieu en ppm PS	dose du milieu en ppm PH	log dose (ppm PS)	N.S. à 7 jours	% mort.	% mort. corrig.	valeur probit
10	2,85	1	19	5	0	11
100	28,57	2	18	10	5,265	6,6223
250	71,43	2,397	19	5	0	11
500	142,85	2,698	18	10	5,265	6,6223
750	214,28	2,875	16	20	15,76	6,0049
1 000	285,7	3	3	85	84,20	3,9950
2 000	571,4	3,301	0	100	100	- 1
4 000	1 142,8	3,602	0	100	100	- 1
TEMOIN			19	5		

TABLEAU V : Résultats de toxicité aiguë du cadmium sur *E. fetida* avec artisol.

Equation de la droite de régression	$\hat{Y} = - 10,58 X + 25,21$
Coefficient r de corrélation	$r = - 0, 970$
Test (n = 6) (cf. table de t p. 91)	$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = \frac{0,97 \times 2}{0,243} = 7,983^{++}$ 4 ddl
CL 50 } en ppm de PS	812,622 ≃ 813
PPDS ou CL 5 } artisol	568,143 ≃ 568

TABLEAU VI : Principaux résultats issus de la courbe log-probit du cadmium (p. 41). ++ : significatif à $p < 0,05$



Courbe log-probit du cadmium relative aux essais de toxicité aiguë à 7 jours { avec *E. fetida* / sur artisol

D'après les résultats et le graphe obtenu, nous pouvons constater que le polluant semble ne pas avoir d'effet sur les vers en dessous de la dose 750 ppm ; à partir de cette dose, on observe une mortalité croissante, rapidement totale ; son expression modifie l'hypothèse de départ selon laquelle la mortalité augmenterait progressivement avec la dose, la distribution suivant alors une loi de Gauss (en fait, on pourrait ici imaginer des doses sans effet, et une dose seuil au-delà de laquelle on a très vite une mortalité totale).

Tout semble se passer entre 750 et 1 000 ppm et c'est dans cette zone, relativement étroite, qu'il eût fallu travailler pour obtenir des informations plus précises quant à la zone létale et peut-être une meilleure estimation de la DL 50.

Quant à la dose PPDS, ou dose ayant le plus petit effet significatif au seuil de 5 %, elle est particulièrement délicate à déterminer dans cet essai ; le modèle log-probit, où les valeurs de mortalités correspondent aux doses 10 et 100 ppm ont été supprimées (non souhaitables pour l'application du modèle), serait commode pour son estimation mathématique mais celle-ci est cependant très aléatoire par manque de données tout d'abord, puis, d'autre part, s'il existe vraiment un effet seuil, une dose efficace à 5 % sera difficile à isoler ou n'aura pas de signification. L'établissement de cette dose ne se conçoit que si la toxicité croît avec la dose de façon progressive. Dans le cas présent, nous la calculerons mais en étant bien conscients des limites de sa valeur.

+ avec l'espèce *A. chlorotica*

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.S. à 7 jours	% mortalité
10	2,85	19	5
100	28,5	20	0
250	71,43	11	45
500	142,85	0	100
TEMOIN		19	5

TABLEAU VII : Résultats de toxicité aiguë du cadmium sur *A. chlorotica* avec artisol.

Les vers sont, pour cette espèce aussi, beaucoup plus sensible au cadmium qu'au plomb. On constate notamment qu'à 250 ppm, les quelques 11 vers survivants sont dans un état sanitaire lamentable (bosselés, tordus, amorphes, sectionnés, etc.) et leur survie est pratiquement désespérée. Le peu de doses réalisées ne permettent pas une exploitation mathématique des résultats mais il est toutefois clair que l'espèce est ici beaucoup plus fragile et sensible que l'espèce *E. fetida*.

b) terre humifère

Tous les essais concernant l'influence du type de terre sur la toxicité des produits utilisent l'espèce *E. fetida*.

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.S. à 7 jours	% mortalité
10	6,05	19	5
100	60,5	17	15
250	151,35	18	10
500	302,7	20	0
1 000	605,4	18	10
2 000	1 210,8	17	15
TEMOIN		19	5

TABLEAU VIII : Résultats de toxicité du cadmium à 7 jours en milieu "terre humifère" avec *E. fetida*.

L'espèce de vers testée ne semble pas sensible à de fortes doses de polluants en milieu humifère.

Nous pouvons donc déjà faire deux hypothèses : ou bien la résistance des vers est augmentée du fait de leur présence dans ce milieu (qui leur conviendrait mieux que les autres), ou bien l'effet du polluant est inhibé du fait de la structure et/ou de la texture de la terre (phénomènes d'adsorption, de rétention, etc.) qui rendrait le polluant moins disponible vis-à-vis des vers.

c) terre argileuse

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.S. à 7 jours	% mortalité
10	7,38	19	5
100	73,83	16	20
250	184,59	18	10
500	369,19	19	5
1 000	738,3	18	10
2 000	1 476,6	0	100
TEMOIN		20	0

TABLEAU IX : Toxicité du cadmium à 7 jours en milieu "terre argileuse" avec *E. fetida*.

Les doses toxiques se révèlent beaucoup plus élevées dans ce milieu que dans l'artisol ; tout semble se passer entre 1 000 et 2 000 ppm, large zone dans laquelle il eût fallu faire des doses supplémentaires afin de préciser ce qui se passe réellement.

d) terre limono-sableuse

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.S. à 7 jours	% mortalité
10	8,56	19	5
100	85,6	19	5
250	214,13	19	5
500	142,85	17	15
1 000	285,7	10	50
2 000	571,4	0	100
TEMOIN		19	5

TABLEAU X : Résultats de toxicité à 7 jours en milieu "terre limono-sableuse" avec *E. fetida*.

Nous observons dans ce cas une croissance progressive de la mortalité avec la dose ; à 500 ppm, les vers sont déjà sensibles au pol-

luant et à 1 000 ppm, déjà la moitié de l'échantillon a succombé. Selon les apparences, nous pouvons déjà dire que les vers semblent plus sensibles aux mêmes doses de polluant dans ce milieu que dans les autres.

En reprenant tous les résultats de ces essais "terre" ,, nous pouvons faire d'emblée deux observations :

. les doses toxiques, dans ces milieux, sont en moyenne plus élevées que dans la lévilite (artisol),

. dans la terre humifère, de fortes doses ne semblent pas toxiques alors qu'elles le sont dans l'argile, la terre limono-sableuse et l'artisol.

En fait, la lévilite ne peut se comparer avec ces milieux ; si, dans l'artisol, des doses relativement faibles sont toxiques, c'est que le polluant est peut-être bien "disponible" pour les vers, du fait de l'inertie chimique du milieu (pas d'adsorption du produit par le milieu). Donc, malgré la présence d'eau en grande quantité (par rapport au poids sec d'artisol) qui peut intervenir comme diluant, des phénomènes de toxicité s'observent même par des faibles doses de cadmium.

Quant aux types de terres étudiés, nous pouvons faire deux hypothèses par rapport aux facteurs susceptibles d'intervenir sur la toxicité observée :

. la terre interviendrait par sa structure et sa texture dans des phénomènes de fixation ou d'adsorption, rendant le polluant (ici le cadmium) peu disponible pour les animaux,

. la présence d'eau, si le polluant n'est pas adsorbé, interviendrait en le diluant, phénomène plus important pour la terre humifère que pour la terre argileuse et surtout limono-sableuse ; en effet, nous ajoutons, nous l'avons vu précédemment (cf. § 1.1 c) p. 20) 65 % d'eau par rapport au poids sec de terre humifère et seulement 17 % dans le cas de la terre limono-sableuse pour obtenir le même pF. Nous pouvons donc penser que, dans cette dernière, le polluant en phase aqueuse sera plus concentré, ce qui expliquerait la faible toxicité des polluants étudiés dans l'une et la forte toxicité de ces mêmes polluants dans l'autre.

Pour pouvoir conclure et extrapoler, il aurait fallu détermi-

ner précisément l'existence d'un effet dilution du polluant par l'eau du milieu par exemple en testant pour un même sol et une même dose efficace de polluant, l'effet de quantités d'eau croissantes sur la toxicité du polluant (pour les témoins, les mêmes essais mais sans polluant auraient pu être repris, afin de voir l'influence du facteur capacité en eau du sol sur les vers, en dehors du polluant).

En procédant comme précédemment, on modifie le pF, ce qui peut fausser les observations ; or, il existe une autre façon de mettre en évidence l'existence de cet effet dilution : réaliser les mêmes concentrations de polluant dans des quantités d'eau différentes que l'on ajoute à chaque terre pour avoir le même pF.

Si, pour une même concentration, les toxicités observées dans les trois terres sont différentes et si, pour plusieurs concentrations testées, le même phénomène se reproduit, c'est que les terres jouent effectivement un rôle spécifique dans la disponibilité des contaminants vis-à-vis des vers et que les phénomènes de dilution sont secondaires ou négligeables.

Si la toxicité est la même pour les trois terres et si ce phénomène se reproduit pour plusieurs concentrations testées, c'est que le rôle des terres est alors négligeable par rapport à celui de l'eau qui dilue le produit.

2.2 *Toxicité à long terme*

Rappel : les essais correspondant utilisent l'espèce de vers *E. fetida* et le milieu standard artisol.

La dose du produit testé est celle que nous avons déterminée sur la courbe log-probit comme étant la dose PPDS (plus petit effet significatif au seuil de 5 %) (cf. § 2.1-a p. 40).

Durée de l'essai	7 jours	14 jours	21 jours	28 jours	Témoin à 28 jours
N.S.	18	19	19	19	19
% mortalité	10	5	5	5	5

TABLEAU XI : Résultats de toxicité à long terme du cadmium avec l'espèce *E. fetida* sur artisol pour la dose 568 ppm.

Aucune toxicité significative n'a été observée ; nous pouvons faire deux hypothèses : ou bien le produit testé n'est pas toxique au terme de 4 semaines, du moins à la dose testée (568 ppm) ; ou alors la dose calculée d'après la courbe log-probit n'était pas efficace ; même en dessous du seuil de toxicité (si seuil il y a), cette dose n'a pas déclenché de mortalité de la part des vers, même au bout de 4 semaines.

2.3 Etude de la bioaccumulation

Essai	C milieu en ppm PS	C vers en ppm PS	Facteur de C
Toxicité	Témoin = 0	5	
à 7 jours avec	250	100 (106-125)	0,4
Artisol	500	175 (165-183)	0,347
E. fetida	750	250 (242-255)	0,333
Toxicité	10	20	0,5
à 7 jours avec	100	80	0,8
Artisol *A.chlorotica*	250	140	0,56
Toxicité			
à 14 jours	568	340 (310-365)	0,598
à 21 jours	568	410	0,721
Artisol *E. fetida*			

TABLEAU XII : Résultats des analyses des vers survivants de quelques uns des essais réalisés. (Nota : les échantillons de la totalité des essais n'ont pu être analysés à la suite d'une panne du four Massman).

D'après les résultats de toxicité aiguë observés pour le cadmium, on constate que les concentrations des vers augmentent avec celles des milieux et que, comme dans le cas du plomb, le facteur de concentration diminue avec l'accroissement des doses. Là encore, après 7 jours en milieu contaminé, il n'y a pas de bioaccumulation mais probablement simple fixation du polluant par les vers. Cependant, les essais à long terme révèlent que, très rapidement, la contamination des vers s'élève avec le temps.

III. CAS DU MERCURE

3.1 Toxicité aiguë à 7 jours

a) sur artisol

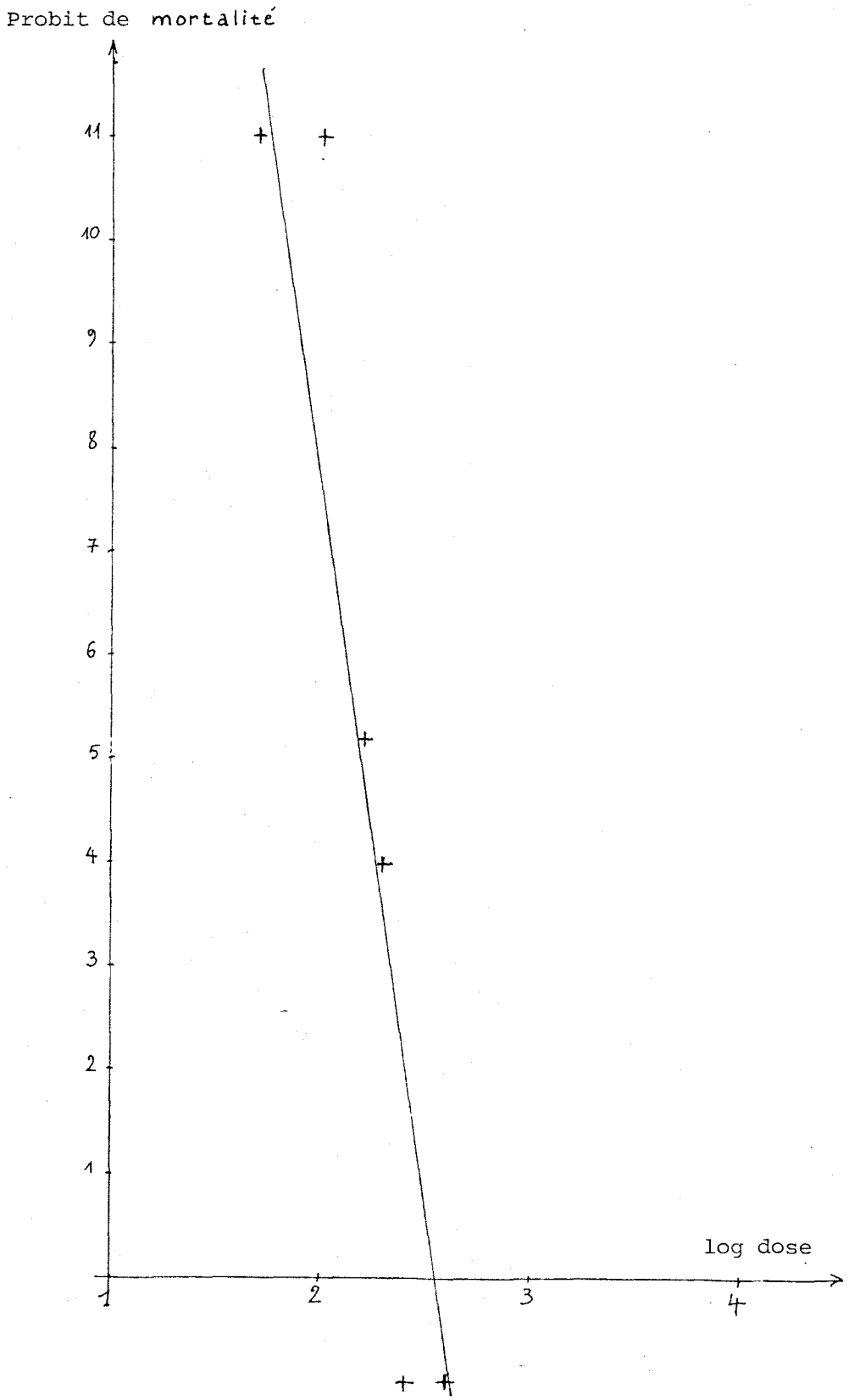
+ avec l'espèce *E. fetida*

dose du milieu en ppm PS	dose du milieu en ppm PH	log dose (ppm PS)	N.S. à 7 jours	% mort.	% mort. corrig.	valeur probit
10	2,85	1	20	0	0	11
50	14,28	1,6989	19	5	0	11
100	28,57	2	19	5	0	11
150	42,85	2,176	11	45	42,1	5,2019
200	57,14	2,301	3	85	84,2	3,995
250	71,43	2,397	0	100	100	- 1
400	114,28	2,602	0	100	100	- 1
700	200	2,845	0	100	100	- 1
1 000	285,7	3	0	100	100	- 1
TEMOIN			19	5		

TABLEAU XIII : Résultats de toxicité aiguë du mercure sur *E. fetida* avec artisol.

Equation de la droite de régression	$\hat{Y} = - 15,75 X + 31,578$
Coefficient r de corrélation	$r = - 0,927$
Test (n = 6) (cf. table de t p. 91)	$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = \frac{0,927 \times \sqrt{4}}{\sqrt{1-(0,927)^2}} = 4,944^{++}$ 4 ddl
CL 50 en ppm de PS	153,928 ≃ 154
PPDS ou CL 5 artisol	121,029 ≃ 121

TABLEAU XIV : Principaux résultats issus de la courbe log-probit du mercure (p. 49). ++ : significatif à $p < 0,01$



Courbe log-probit du mercure relative aux essais de toxicité aiguë à 7 jours { avec *E. fetida* / sur artisol }

On peut faire pour le mercure les mêmes observations que pour le cadmium, à savoir qu'il existe apparemment une zone efficace assez étroite (ici entre 100 et 200 ppm) et que, si l'estimation de la DL 50 est relativement fiable, celle de la dose PPDS l'est beaucoup moins ; en effet, il faudrait tirer parti de ces essais et faire des doses supplémentaires entre 100 et 200 ppm.

Nous remarquerons cependant que les vers semblent beaucoup moins bien supporter le chlorure de mercure ($HgCl_2$) que celui de cadmium ($CdCl_2$) : le mercure serait apparemment plus toxique.

+ avec l'espèce *A. chlorotica*

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.S. à 7 jours	% mortalité
10	2,85	17	15
50	14,28	0	100
100	28,57	0	100
TEMOIN		19	5

TABLEAU XV : Résultats de toxicité aiguë du mercure sur *A. chlorotica* avec artisol.

Cette espèce semble particulièrement sensible à la présence de mercure dans le milieu puisqu'il suffit d'une dose de 50 ppm pour provoquer une mortalité totale. Tout semble se passer entre 10 et 50 ppm, il faudrait des doses supplémentaires pour préciser la zone de la DL 50.

Une fois encore, nous ne savions pas comment allait réagir le ver et c'est pour cela que nous avions confectionné 3 doses arbitraires qui se sont révélées trop fortes peut-être mais qui ont permis "d'encadrer" la zone de mortalité.

b) terre humifère

Tous les essais concernant l'influence du type de terre sur la toxicité des produits utilisent l'espèce *E. fetida*.

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.S. à 7 jours	% mortalité
10	6,05	20	0
50	30,27	18	10
100	60,54	19	5
200	121,08	19	5
400	242,16	20	0
700	423,78	14	30
TEMOIN		19	5

TABLEAU XVI : Résultats de toxicité du mercure à 7 jours en milieu "terre humifère" avec *E. fetida*.

De même que pour le cadmium, en milieu humifère, les doses confectionnées se sont révélées trop faibles pour cerner la zone d'action du polluant. Les mêmes hypothèses peuvent être formées, à savoir augmentation de la résistance des vers du fait du milieu (riche en matière organique) ou inhibition de l'impact du polluant (fixation ou adsorption par la terre) sur les vers. Inhibition qui ne jouerait que jusqu'à un certain seuil puisque dans le cas du mercure, nous observons un début de toxicité à 700 ppm.

c) terre argileuse

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.S. à 7 jours	% mortalité
10	6,05	20	0
50	30,27	20	0
100	60,54	20	0
200	121,08	18	10
400	242,16	19	5
700	423,78	8	60
TEMOIN		20	0

TABLEAU XVII : Résultats de toxicité du mercure à 7 jours en milieu "terre argileuse" avec *E. fetida*.

Là encore, les doses confectionnées se sont révélées trop faibles pour cerner la zone d'action du polluant ; cependant, nous pouvons remarquer que, de même que pour le cadmium en terre argileuse, les vers sont plus sensibles au polluant dans cette terre qu'en terre humifère.

d) terre limono-argileuse

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.S. à 7 jours	% mortalité
10	6,05	20	0
50	30,27	19	5
100	60,34	20	0
200	121,08	19	5
400	242,16	15	25
700	423,78	4	80
TEMOIN		20	0

TABLEAU XVIII : Résultats de toxicité du mercure à 7 jours en milieu "terre limono-sableuse" avec *E. fetida*.

Ici, la zone d'action du polluant se situe entre 400 et 700 et, c'est dans cette zone-là qu'il faudrait faire des doses supplémentaires afin de préciser ce qui se passe.

En plus des observations générales faites sur ces essais "terre" à propos du cadmium (cf. § 2.1-d p.44) et qui sont aussi valables dans celui du mercure, nous remarquerons qu'il y a vraissemblablement des doses inefficaces n'ayant apparemment pas d'impact (à 7 jours) sur les vers, puis une dose seuil à partir de laquelle les vers succombent tous plus ou moins rapidement. Cependant, si ces doses sont inefficaces à 7 jours, elles ne le sont pas forcément à long terme.

3.2 Toxicité à long terme

Rappel : les essais correspondant utilisent l'espèce de vers *E. fetida* et le milieu standard artisol.

La dose du produit testé est celle que nous avons déterminé sur la courbe log-probit comme étant la dose PPDS (cf. § 3.1-a p. 48).

Durée de l'essai	7 jours	14 jours	21 jours	28 jours	Témoin à 28 jours
N.S.	19	20	19	20	20
% mortalité	5	0	5	0	0

TABLEAU XIX : Résultats de toxicité à long terme du mercure avec l'espèce *E. fetida* sur artisol pour la dose 121 ppm.

On peut faire ici les mêmes hypothèses que dans le cas du cadmium : produit non toxique à long terme pour la dose PPDS ou dose PPDS sans effet parce qu'en dessous du seuil de toxicité.

3.3 Etude de la bioaccumulation

Essai	C milieu en ppm PS	C vers en ppm PF (PS)	Facteur de C
Toxicité à 7 jours avec T. humifère *E. fetida*	200	8,8 (59)	0,295
	400	37 (247)	0,617
	700	27 (180)	0,257
Toxicité à 7 jours avec T. argileuse *E. fetida*	0	0,755 (5)	-
	10	1,67 (11,2)	2,6
	100	19,5 (131)	1,31
	200	43 (240)	1,20
	400	27,5 (182)	0,455
	700	57 (380)	0,542
Toxicité à 7 jours avec T. limono-sable. *E. fetida*	10	2,3 (16)	1,6
	200	7,2 (480)	2,4
	400	90 (450)	1,25
Toxicité à 14 j.	121	39 (263)	2,16
Toxicité à 21 j.	121	87 (581)	4,8
Toxicité à 28 j.	121	39,5 (262)	2,16
Témoin à 28 j. artisol *E. fetida*	0	4,24 (26)	-

TABLEAU XX : Résultats des analyses des vers survivants de quelques uns des essais réalisés.

Tous les échantillons des essais relatifs au mercure n'ont pu être analysés par manque de temps.

Nous observons, dans un premier temps, c'est-à-dire jusqu'à 3 semaines, une augmentation de la teneur des échantillons en mercure en fonction du temps passé dans le milieu, avec un facteur de concentration supérieur à 1 et semblant croître avec le temps (14 jours : 2,16 ; 21 jours : 4,8). Il semble donc y avoir une légère bioaccumulation ; cependant, après 4 semaines dans le même milieu, les résultats sont assez inattendus : la concentration des vers est semblable à celle obtenue après 2 semaines de vie dans le milieu ; à cela nous pouvons donner 3 interprétations :

+ atteinte d'un état d'équilibre entre les phénomènes d'absorption et d'excrétion, par les vers, au bout d'un certain temps qui peut être fonction de la dose,

+ nous pouvons imaginer une réaction des vers, tendant à une déconcentration active à partir d'un certain seuil de contamination obtenu après un temps donné dans le milieu,

+ nous pouvons aussi supposer que, après avoir fixé et concentré le mercure pendant 3 semaines, les vers, fatigués ou incommodés (milieu artificiel, jeûne forcé, polluant), modifient leur comportement, deviennnent moins actifs, s'immobilisent plus ou moins permettant une éventuelle déconcentration.

Dans les essais sur l'influence des sols, nous constatons tout d'abord une augmentation de la concentration des vers avec les doses de contaminants du milieu. Puis, à partir d'une certaine dose, variable avec le type de terre (400 ppm pour la terre argileuse, 700 ppm pour la terre humifère), nous observons une stabilisation et même une diminution de la teneur des vers par rapport aux doses précédentes pourtant plus faibles.

Nous pouvons alors formuler les mêmes hypothèses que précédemment :

+ un état d'équilibre entre les phénomènes d'absorption et d'excrétion,

+ les vers, incommodés à partir d'une certaine dose, diminueraient leur activité, ralentissant leurs échanges avec le milieu de façon à fixer le moins possible de produit ou pour se déconcentrer plus ou moins "passi-

vement",

+ enfin, on peut encore imaginer chez les vers l'existence d'un système régulateur susceptible d'intervenir lorsque la concentration est trop forte dans le milieu contaminé par le mercure (ces hypothèses pourraient aussi être formulées dans le cas du cadmium sur artisol).

Nous devons encore remarquer que les concentrations en mercure des vers, pour les mêmes doses (soient 200, 400, 700 ppm), sont différentes selon les terres et il est curieux de constater que c'est en terre limono-sableuse que les valeurs de ces concentrations sont les plus fortes, ce qui serait compatible avec les observations précédentes, où les vers semblaient plus affectés, pour les mêmes doses de mercure, en milieu limono-sableux qu'en milieu argileux et surtout en milieu humifère. Ces résultats renforceraient l'idée selon laquelle il existerait un effet de dilution du produit par la phase liquide introduite pour l'humification du milieu ; ainsi, en milieu limono-sableux, nous avons vu que la quantité d'eau ajoutée étant très faible, le polluant se trouve concentré et l'accumulation, ainsi que, nous l'avons vu, la toxicité sont accrues.

IV. CAS DU CUIVRE

4.1 Toxicité aiguë à 7 jours

a) avec l'espèce *E. fetida*

dose du milieu en ppm PS	dose du milieu en en ppm PH	log dose (ppm PS)	N.S. à 7 jours	% mort.	% mort. corrig.	valeur probit
10	2,85	1	20	0	0	11
50	14,28	1,699	19	5	0	11
100	28,57	2	19	5	0	11
200	57,14	2,301	18	10	5,3	6,6223
300	85,71	2,477	7	65	63,1	4,6681
500	142,85	2,698	6	70	68,4	4,5182
750	214,28	2,875	0	100	100	- 1
1 000	285,7	3	0	100	100	- 1
2 000	571,4	3,301	0	100	100	- 1
TEMOIN			19	5		

TABLEAU XXI : Résultats de toxicité aiguë du cuivre sur *E. fetida* avec artisol.

Pour l'interprétation du tableau XXI p. 55, voir les détails du traitement mathématique des données en annexe p.

Equation de la droite de régression	$\hat{Y} = -10{,}06\ X + 29{,}632$
Coefficient r de corrélation	$r = -0{,}958$
Test (n = 7) (cf. table de t p. 91)	$t = \frac{r\sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}} = \frac{2{,}143}{0{,}284} = 7{,}545^{++}$ 5 ddl
CL 50 en ppm de PS	280,011 ≃ 280
PPDS ou CL 5 artisol	192,20 ≃ 192

TABLEAU XXII : Principaux résultats issus de la courbe log-probit du cuivre (p. 57). ++ : significatif à $p < 0{,}001$

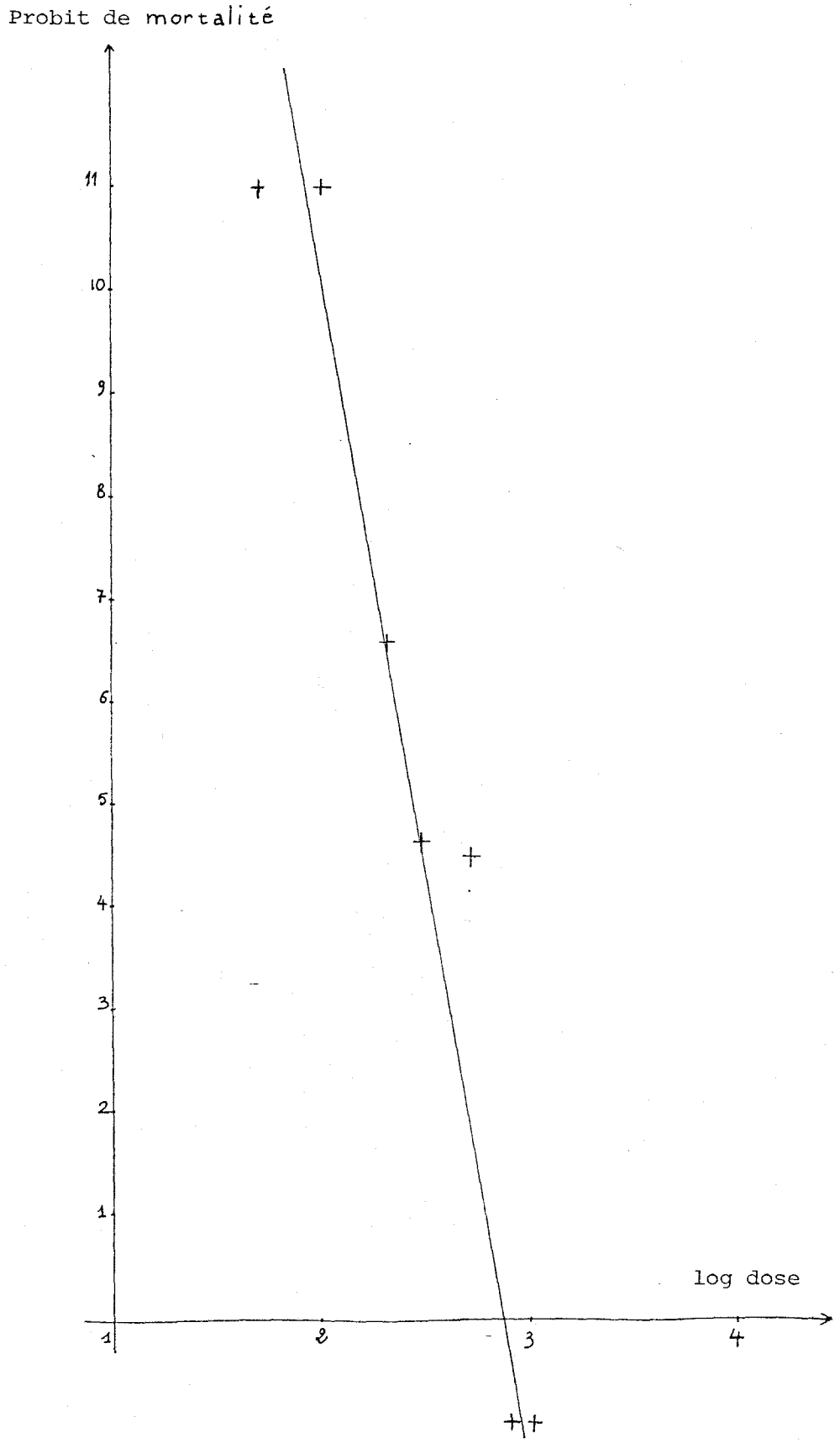
D'après les résultats obtenus, il serait intéressant de faire des doses supplémentaires entre 200 et 500 ppm, zone des doses efficaces. En effet, en dessous de 200 ppm, nous pouvons supposer que le seuil d'efficacité est à peine atteint et qu'au-dessus de 500 ppm, la mortalité est totale. Ici encore, la courbe log-probit obtenue pêche par manque de données ; nous avons pu cependant calculer une DL 50 et une dose PPDS théorique.

b) avec l'espèce *A. chlorotica*

Dose milieu en ppm PS	Dose milieu en ppm PH	N.S. à 7 jours	% mortalité
10	2,85	17	15
50	14,28	6	70
100	28,5	0	100
TEMOIN		20	0

TABLEAU XXIII : Résultats de toxicité aiguë du cuivre sur *A. chlorotica* avec artisol.

Cette espèce de vers est beaucoup plus fragile et sensible que l'espèce *E. fetida* et cela est encore valable dans le cas du cuivre :



Courbe log-probit du cuivre relative aux essais de toxicité aiguë à 7 jours { avec *E. fetida* / sur artisol

nous observons 70 % de mortalité à 500 ppm avec *E. fetida* et seulement à 50 ppm avec *A. chlorotica* ! Il semble même que de très faibles doses, autour de 10 ppm, soient déjà efficaces. La DL 50 se situe entre 10 et 50 ppm.

c) avec l'espèce *Lumbricus terrestris*

Dose milieu en ppm PS	Témoin	50	100	250	500	750
Nombre initial de vers	18	18	18	17	17	17
Poids initial total vers en g	51,071	48,095	52,212	48,938	54,993	54,282
N.S. à 7 jours	15	10	6	1	0	0
Mortalité en %	17	44	67	94	100	100
Mortalité corrigée	0	34	60	93	100	100

TABLEAU XXIV : Résultats de toxicité aiguë du cuivre sur *L. terrestris* avec artisol.

L'espèce *L. terrestris* semble ne pas trop apprécier le milieu artificiel qui n'est peut-être pas très adapté à sa taille ; il est relativement sensible au cuivre, ce qui correspond aux résultats de la bibliographie. Ce ver, particulièrement fréquent en prairie et en verger enherbé, est spécialement affecté par les épandages de lisier de porc répétés et les fongicides cupriques (Van Rhee, 1977). La DL 50 se situe vers 45-50 ppm dans le cadre de nos expériences.

4.2 Toxicité à long terme

Rappel : les essais correspondant utilisent l'espèce *E. fetida* et le milieu standard artisol.

La dose du produit testé est celle que nous avons déterminée sur la courbe log-probit (p. 57) comme étant la dose PPDS (plus petit effet significatif au seuil de 5 %) (cf. 4.1-a p. 55).

Durée de l'essai	7 jours	14 jours	21 jours	28 jours	Témoin à 28 jours
N.S.	19	16	14	14	18
% mortalité	5	20	30	30	10

TABLEAU XXV : Résultats de toxicité à long terme du cuivre avec l'espèce *E. fetida* sur artisol pour la dose 192 ppm.

Nous observons dans ce cas un effet de la dose dite PPDS à la troisième semaine, témoignage d'une sensibilisation progressive des vers au cuivre, aboutissant à des phénomènes de toxicité ; la dose PPDS calculée est cependant relativement élevée. Là encore, il faudrait compléter ces essais en prenant, par exemple, 8 semaines au lieu de 4 pour la durée des essais et des doses différentes légérement inférieures à 192 ppm.

CONCLUSION

Nous avons réalisé ici l'étude de quelques contaminants sur le chaînon lombricien en se plaçant dans un cadre écologique : en effet, les objectifs visés de cette étude consistaient en l'observation des 2 paramètres suivants : effet sur la vitalité du peuplement et accumulation des produits dans les tissus. Le terme d'"écotoxicité" du titre de ce mémoire se trouve donc justifié par les objectifs "écologiques" de ce travail.

En ce qui concerne les métaux testés, nous pouvons, à l'issue des essais réalisés, faire quelques remarques grossières à leur sujet :

+ Tous sont toxiques pour les lombriciens sauf le plomb qui ne joue apparemment aucun rôle néfaste dans le métabolisme des animaux, du moins pour les doses et les durées expérimentées ; cela viendrait confirmer les résultats antérieurs (cf. § 1.3 p. 7). Les trois autres métaux peuvent être classés par ordre de toxicité croissante : cadmium, cuivre, mercure.

+ Le mercure, le cadmium et le plomb sont susceptibles d'être accumulés par les lombriciens vivant en milieu contaminé par ces trois métaux, bien qu'aucun des essais réalisés ne l'ait ici démontré clairement (la durée des essais étant trop faible). D'après les travaux précédents, le cuivre ne s'accumulerait pas dans les tissus des vers (Van Rhee, 1977).

Dans le détail, il est audacieux de vouloir conclure : nous n'avons fait qu'ébaucher une étude de toxicologie dans des conditions particulièrement originales et inédites. L'objectif primordial de notre travail était en fait la mise au point d'un milieu artificiel (artisol) à travers la réalisation d'une étude de toxicologie ; ce milieu devant nous permettre une analyse des processus-clés que nous voulions observer, à savoir la toxicité aiguë et la bioaccumulation (nous avons vu précédemment ses avantages par rapport à un sol naturel reconstitué).

Notre étude toxicologique s'est donc mise en route dans des voies totalement inconnues et partant ainsi en chemin inexploré, nous avons fait quelques erreurs de parcours :

+ Ainsi, les doses intiales des contaminants à tester ont été établies au hasard et n'ont pas toujours permis l'application, dans les meilleures conditions, du modèle mathématique prévu (dose sans efficacité ou trop forte). D'autre part, les indication de Lowy (1977) à ce sujet n'ont pas été suivies : par suite d'une erreur de protocole, nous n'avons cherché à ne réaliser que deux doses à effet intermédiaire au lieu de quatre, ce qui a occasionné un manque critique de données, d'où les difficultés d'interprétation des courbes log-probit (au niveau de la CL 50 et de la dose PPDS surtout).

+ Autre exemple : nous pensions réaliser deux types d'essais, essai "sol" et essai "litière", croyant que l'espèce E. fetida épigée, n'ingérerait pas le sol minéral artificiel et ne subirait par conséquent qu'une contamination de contact "dans les essais sol". Nous avons vu comment tout s'était passé différemment et le peu d'intérêt résultant des essais "litière".

+ La durée des essais de toxicité aiguë (7 jours) fut nettement insuffisante pour mettre en évidence des phénomènes de bioaccumulation, d'autant que les doses utilisées étaient très élevées. D'autre part, les essais de toxicité à long terme (sur 4 semaines) devant nous permettre de déterminer le TL 50 (temps au bout duquel 50 % de la population a succombé) avec la dose PPDS, n'ont pas suffi non plus à montrer une bioaccumulation éventuelle de façon très nette. Il aurait fallu travailler sur plusieurs semaines (mois) avec des doses plus faibles et différentes des doses dites PPDS qui ne sont pas forcément adaptées à cet objectif.

+ Enfin, dans les terres naturelles, des phénomènes de toxicité sont apparus pour des doses plus fortes en moyenne que dans l'artisol ; cependant, nous n'avons pu déterminer à quoi cela était dû, ce que nous aurions pu préciser à l'aide d'une ou deux expérimentations (cf. §). D'autre part, il aurait été intéressant de pouvoir déterminer le pF de l'artisol afin de permettre une éventuelle comparaison avec les terres naturelles qui toutes ont été mises à même pF lors des essais.

Nous ferons remarquer pour finir que si l'adoption d'une méthodologie aussi originale et inédite que celle expérimentée pose de nombreux problèmes, elle constitue un progrès dans la démarche analytique ;

cependant elle n'a de sens que si des recherches parallèles menées sur le terrain permettent de créer des liens logiques entre les résultats de laboratoire et les observations de terrain.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANONYME, 1964 - Handbook of chemistry and physics. Ed. The chemical Rubber Co., Cleveland (U.S.A.), B-147 - B-239.

BOUCHE, M.B., 1972 - Lombriciens de France. Ecologie et systématique. Ed. I.N.R.A., Ann. zool. - écol. anim., numéro spécial, 72 - 2, 1-671.

BOUCHE, M.B., 1979 - Conséquences de l'apport de contaminants sur les lombriciens. I. Problèmes en cause et méthodologie. Doc. pédozool., 1, 1, 2-22.

BULL, K.R., R.D. ROBERTS, M.J. INSKIP et G.T. GOODMAN, 1977 - Mercury concentration in soil, grass, earthworms and small mammals near an industrial emission source. Environ. pollut., 12, 135-140.

BURNHAM, 1970-71 - Cité dans RAMADE, F., 1974 (sans référence)

DARWIN, C.R., 1881 - The formations of vegetable mould through the action of worms with observations on their habits. London, 336 pp., John Murrey and Co.

GISH, C.D., et R.E. CHRISTENSEN, 1973 - Cadmium, nickel, lead and zinc in earthworms from Roadside Soil. Environ. sci. techn., 7, 1060-1062.

HIRST, J.M., H.H. LE RICHE et C.L. BASCOMB, 1961 - Copper accumulation in the soils of apple orchards near Wisbech. Plant pathol., 10, 105-108.

HUNT, L.B., 1965 - Kinetics of pesticide poisoning in Dutch elm disease control. In "The effects of pesticides on fish an wildlife" U.S. fish wildlife serv. Circ. 226, 12-13.

IRELAND, M.P., 1975a - Metal content of Dendrobaena rubida (Oligochaeta) in a base metal mining area. Oikos, 26, 74-79.

IRELAND, M.P., 1975b - Distribution of lead, zinc, and calcium in Dendrobaena rubida (Oligochaeta) living in soil contaminated by base metal mining in Wales. Comp. biochem. physiol., 52B, 551-555.

IRELAND, M.P., 1975c - The effect of the earthworm Dendrobaena rubida on the solubility of lead, zinc and calcium in heavy metal contaminated soil in Wales. J. soil sci., 26, 3, 313-318.

IRELAND, M.P., 1976a - Excretion of lead, zinc and calcium by the earthworm Dendrobaena rubida living in soil contaminated with zinc and lead. Soil biol. biochem., 8, 347-350.

IRELAND, M.P., 1976b - Variations in the lead, zinc and calcium content of Dendrobaena rubida (Oligochaeta) in a base metal mining area. Environ. pollut., 10, 3, 201-208.

IRELAND, M.P., 1977 - Lead retention in toads Xenopus laevis fed increasing levels of lead-contaminated earthworms. Environ. pollut., 12, 85-91.

IRELAND, M.P., et K.S. RICHARDS, 1977 - The occurence and localisation of heavy metals an glycogen in the earthworms Lumbricus rubellus and Dendrobaena rubida from a heavy metal site. Histochem., 51, 153-166.

JENSEN et JERNOLOV, 1967 - Cité dans RAMADE, F., 1974 (sans référence).

LOWY, R., 1977 - Emploi des méthodes statistiques en toxicologie nutritionnelle. Cahiers nutr. diét., 11, 37-43.

MOCHIZUKI, T., S. CHIBA, S. HANADA et H. SAITOH, 1975 - Apple orchard soils contaminated by inorganic agricultural chemicals. I. Effects of the contents of residual copper, lead and arsenate on the soil macrofauna on an apple orchard in the Tsugaru district of Aomori Prefecture, Japon. Nippon Dojo-Hiryogaku Zasshi, 46, 2, 45-50.

MULLER, P.E., 1879 - Studier over Skovjord.I Om Bøgemuld og Bøgemor paa sand og Ler. Tidsskrift for Skovbrug, 3.

MULLER, P.E., 1884 - Studier over Skovjord. II. Om Muld og Mor i Egeskove og paa Heder. Tidsskrift for Skovbrug, 7.

MUROZUMI, M., T.J. CHOW et C. PATTERSON, 1969 - Chemical concentrations of pollutants lead aerosols, terrestrial dusts and sea salts in Greenland and antartic snow strata. Geochim. cosmochim. Acta, 33, 1247-94.

RAMADE, F., 1974 - Eléments d'écologie appliquée. Ediscience, Paris, 1-521.

VAN de WESTERINGH, en prép - Cité dans Van Rhee, 1977.

VAN HOOK, R.I., 1974 - Radioisotope techniques in delineation of the environmental behavior of cadmium. Préédition multigraphiée, IAEA/SM-175/22, O.R.N.L., 1-14.

VAN RHEE, J.A., 1969 - Effects of biocides and their residues on earthworms. Meded. fac. Landbouwwet., Rijksuniv., 34, 3, 682-689.

VAN RHEE, J.A., 1975 - Copper contamination effects on earthworms by disposal of pig waste in pastures. In "Progress in soil zoology", proc. 5th int. coll. soil zoology, Prague 1973. Ed. Academia, 451-457.

WIELGUS-SERAFINSKA, E., et E. KAWKA, 1976 - Accumulation and localization of lead in Eisenia foetida (Oligochaeta) tissues. Folia histochem. cytochem., 14, 4, 315-320.

WILLIAMSON, P., et P.R. EVANS, 1972 - Lead : levels in roadside invertebrates and small mammals. Bull. environ. contamin. toxicol., 8, 5, 280-288.

ANNEXES

I. ANALYSE CHIMIQUE DES TERRES UTILISEES

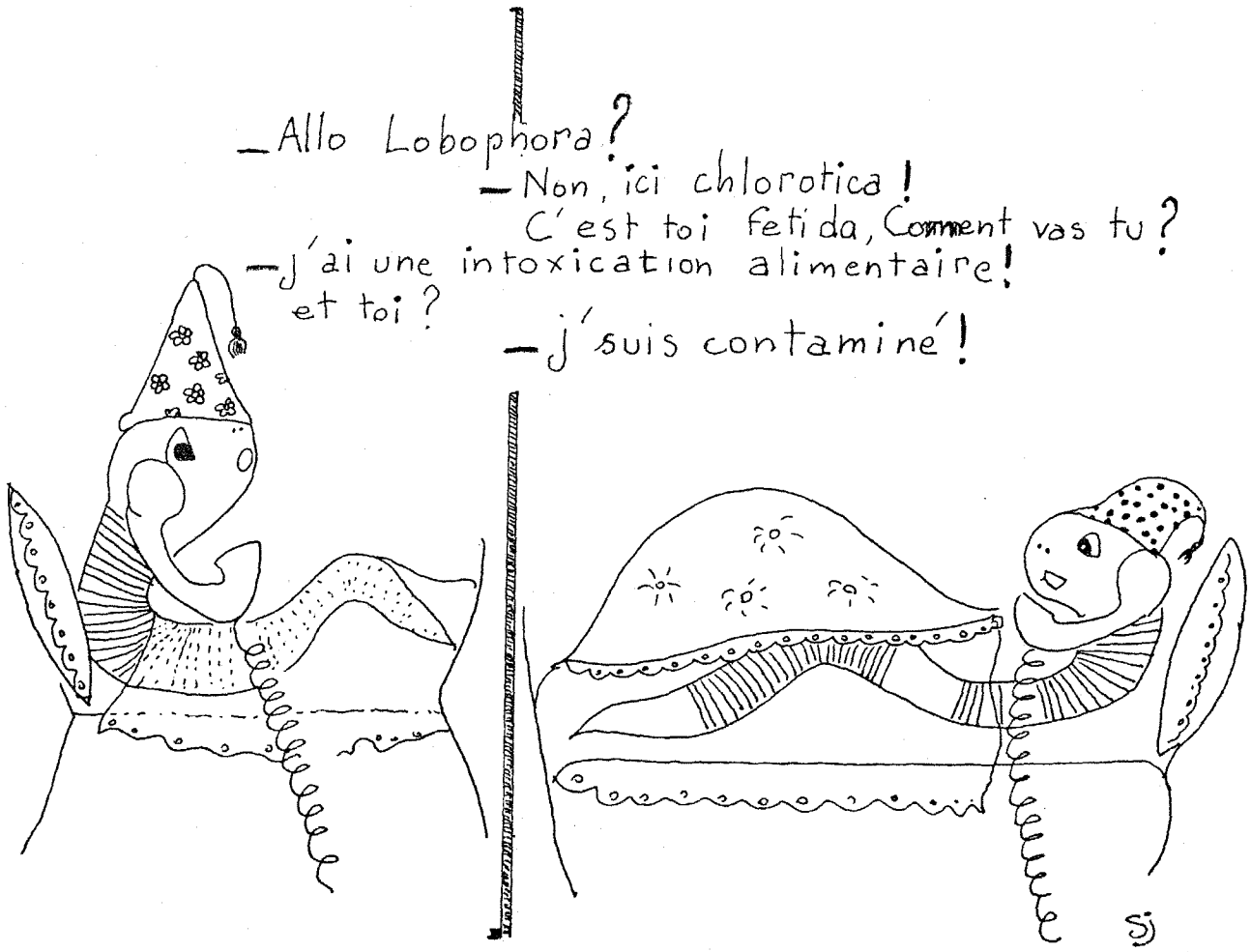
II. LES ESSAIS "LITIERE"

III. LE MODELE LOG-PROBIT

IV. DETAIL DU CALCUL DES CONCENTRATIONS EN METAUX LOURDS DES VERS DES DIFFERENTS ECHANTILLONS

4.1 Le plomb
4.2 Le cadmium
4.3 Le mercure

V. TABLE DE LA DISTRIBUTION DE t



ANNEXES

I. ANALYSE CHIMIQUE DES TERRES UTILISEES

Cette analyse a été réalisée à l'I.N.R.A., Station de Sciences du Sol, 17, rue Sully, 21034 Dijon Cédex.

PROVENANCE	CHEVIGNY	CHALON	CITEAUX
Profondeur du prélèvement	0 - 30 cm	30 cm	1 m
Carbone ‰	8,7	4,2	1,8
Azote organique (Kjeldahl) ‰	0,925	0,53	0,35
C/N	9,41	7,87	5,03
M.O. %	14,96	7,4	3,0

II. LES ESSAIS "LITIERE"

De la totalité des essais "litière" prévus, nous n'avons pu réaliser que les premiers d'entre eux et encore, pour un métal lourd seulement : le plomb.

La litière, réalisée à partir de son, a tout d'abord été contaminée à 3 doses différentes :

0,3 mg de plomb pour 500 mg de son sec soit 100 g/ha

3 mg de plomb pour 500 mg de son sec soit 1 kg/ha

30 mg de plomb pour 500 mg de son sec soit 10 kg/ha

Cela pour situer très grossièrement le seuil de non consommation.

+ Procédé de contamination suivi :

Le son distribué doit être humidifié avec une solution contenant le plomb à la dose voulue. Sachant qu'il faut :

6 mg d'eau pour humidifier 4 g de son sec soit
0,75 mg d'eau pour humidifier 0,5 g de son sec.

il s'agit d'incorporer 0,3, 3 et 30 mg de plomb, soient les quantités respectives de sel 0,479, 4,79 et 47,9 mg de $PbNO_3$ à la fraction d'eau nécessaire (0,75 mg).

Nous avons réalisé pour cela des solutions de $PbNO_3$ correspondantes aux concentrations ci-dessous :

0,479 mg $PbNO_3$ pour 0,75 ml d'eau : 63,8 mg/100 ml d'eau

4,79 mg $PbNO_3$ pour 0,75 ml d'eau : 638 mg/100 ml d'eau

479 mg $PbNO_3$ pour 0,75 ml d'eau : 6,38 g/100 ml d'eau

Le son a ainsi pu être contaminé directement en prenant, à l'aide d'une micropipette, la quantité d'eau et de contaminant nécessaires.

+ Résultats

Aucun phénomène de toxicité ne s'est manifesté pour chacune de ces 3 doses mais le son n'a pas été ingéré en même quantité dans les 3 boîtes, notamment, il n'a pas été touché à la dose la plus élevée (30 mg

de plomb pour 500 mg de son sec).

+ Nous avons alors refait, sous cette dose, 3 doses intermédiaires selon le même procédé :

3 x 2,5 = 7,5 mg de plomb pour 500 mg de son sec

3 x 5 = 15 mg de plomb pour 500 mg de son sec

3 x 7,5 = 22,5 mg de plomb pour 500 mg de son sec

+ Résultats

Si le son n'est pas resté intact pendant la durée de l'essai (7 jours), les quantités ingérées ont été très inégales et, semble-t-il, inversement proportionnelles à la dose de contaminant de la litière. Là encore, aucune mortalité n'a été enregistrée. Les vers ont été récupérés, lavés et congelés afin de pouvoir procéder à l'analyse de leurs tissus. Les résultats de l'analyse du S.A.A. sont rapportés dans le tableau ci-dessous

C son en ppm PS	C vers en ppm PS
15 000	171,68 ≃ 172
30 000	95,34 ≃ 95
45 000	88,32 ≃ 88

Résultats des essais "litière" de toxicité à 7 jours avec *E. fetida* sur artisol

D'après ces résultats, les quantités ingérées décroitraient avec la dose de contaminant, ce qui expliquerait la diminution de concentration des vers à mesure que la dose de contaminant augmente dans la litière. Aucun phénomène de bioaccumulation n'a pu être mis en évidence ici, les doses de contaminant étant trop peu élevées et la durée des essais trop faible.

III. LE MODELE LOG-PROBIT

Afin de visualiser et de pouvoir extrapoler au mieux les résultats obtenus, les représentations graphiques de l'effet par rapport à la dose des différents métaux ont été effectuées à l'aide de la transformation log-probit (avec calcul de la mortalité corrigée selon Abbott). Ce modèle, dont Lowy (1977) nous rappelle l'histoire et l'utilité en toxicologie, permet de déterminer facilement la CL 50 (concentration létale 50) et la dose PPDS (dose ayant le plus petit effet significatif au seuil de 5 %).

La caractéristique principale est de linéariser et de rectifier un phénomène suivant une loi sigmoïde.

Résumons tout d'abord les principales étapes du procédé :

. la transformation log-probit n'utilise pas la mortalité réelle observée mais la mortalité corrigée en fonction de celle observée dans les témoins ; on utilise la formule d'Abbott :

$$P'_d = \frac{P_d - P_o}{1 - P_o}$$

avec P'_d : mortalité corrigée

P_d : mortalité réelle observée due au traitement

P_o : mortalité réelle observée dans le témoin

. la mortalité corrigée est alors transformée en survie corrigée (100 % - % mortalité) puis en unités probit conformément à la table p. 71

. une fois obtenues les valeurs des doses en "log" et des pourcentages de survie en "probit", on procède au calcul de la droite de régression qui s'effectue sur une calculatrice programmable ; celle-ci nous fournit donc l'équation de la régression et le coefficient de corrélation, à partir desquels on calculera les tests d'ajustement des points sur la droite théorique obtenue, la CL 50 et la dose PPDS.

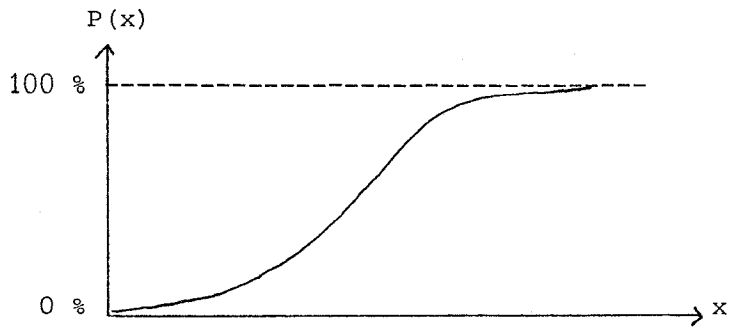
Voyons maintenant plus précisément en quoi consiste la transformation probit.

a) Rappels : soit x un paramètre, c'est-à-dire quelque chose de controlable, par exemple une dose de produit chimique, soit P un pourcentage, par exemple le pourcentage d'in-

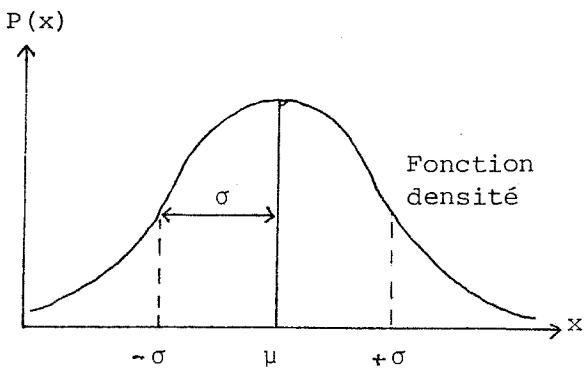
%	Probit	%	Probit	%	Probit
0	11,0000	34	5,4125	68	4,5323
1	7,3263	35	5,3853	69	4,5041
2	7,0537	36	5,3585	70	4,4756
3	6,8808	37	5,3319	71	4,4466
4	6,7507	38	5,3055	72	4,4172
5	6,6449	39	5,2793	73	4,3872
6	6,5548	40	5,2533	74	4,3567
7	6,4758	41	5,2275	75	4,3255
8	6,4051	42	5,2019	76	4,2937
9	6,3408	43	5,1764	77	4,2612
10	6,2816	44	5,1510	78	4,2278
11	6,2265	45	5,1257	79	4,1936
12	6,1750	46	5,1004	80	4,1584
13	6,1264	47	5,0753	81	4,1221
14	6,0803	48	5,0502	82	4,0846
15	6,0364	49	5,0251	83	4,0458
16	5,9945	50	5,0000	84	4,0055
17	5,9542	51	4,9749	85	3,9636
18	5,9154	52	4,9498	86	3,9177
19	5,8779	53	4,9247	87	3,8736
20	5,8416	54	4,8996	88	3,8250
21	5,8064	55	4,8743	89	3,7735
22	5,7722	56	4,8490	90	3,7184
23	5,7388	57	4,8236	91	3,6592
24	5,7063	58	4,7981	92	3,5949
25	5,6745	59	4,7725	93	3,5242
26	5,6433	60	4,7464	94	3,4452
27	5,6128	61	4,7207	95	3,3551
28	5,5828	62	4,6945	96	3,2493
29	5,5534	63	4,6681	97	3,1192
30	5,5244	64	4,6415	98	2,9463
31	5,4959	65	4,6147	99	2,6737
32	5,4677	66	4,5875	100	-1,0000
33	5,4399	67	4,5601		

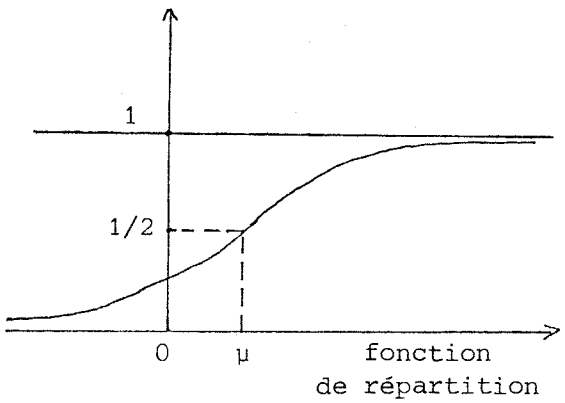
TABLE DES VALEURS "PROBIT" : la valeur des probits correspondant à chaque proportion a été calculée à l'aide d'une calculatrice Programme 652 Olivetti, programmée par Lowy (Laboratoire de biologie du C.N.A.M., Paris).

sectes tués par la dose de produit x. P est une fonction sigmoïdale de x, cela signifie que le graphe de P a l'allure d'une courbe en S.



Dire que P est de type sigmoïdal, cela signifie que le graphe est du même genre, de même nature qu'une fonction de répartition d'une loi normale.





$X \sim N(\mu, \sigma^2)$ $\begin{cases} \mu = E(X) \\ \sigma^2 = Var(X) \end{cases}$

On modélise en faisant l'hypothèse qu'il existe $X \sim N(\mu, \sigma^2)$ telle que la fonction P(x) soit la fonction de répartition de X, on a alors :

$$P(x) = \Pi\left[\frac{x - \mu}{\sigma^2}\right] = P(X < x)$$

b) La transformation probit

Soit une distribution expérimentale de centre de classe x et avec les fréquences cumulées F(x). On fait l'hypothèse que ces fréquences peuvent être assimilées aux probabilités P(x) de x dans une distribution normale $N(\mu, \sigma)$ donc aux probabilités qui leur sont égales P(X) des variables réduites

$$X = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

Connaissant F(x) on trouve P(X)

exemple : si F(x) = 0,30 ➡ P(X) = 0,5 - 0,2

X = - 0,52

X' = - 0,52 + 5 = probit de X = 4,48

si F(X) = 0,70 ➡ P(X) = 0,5 + 0,2

X = + 0,52

X' = 5,52

Dans une distribution de Laplace Gauss, probit et variable sont liés par la relation :

$$X' - 5 = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

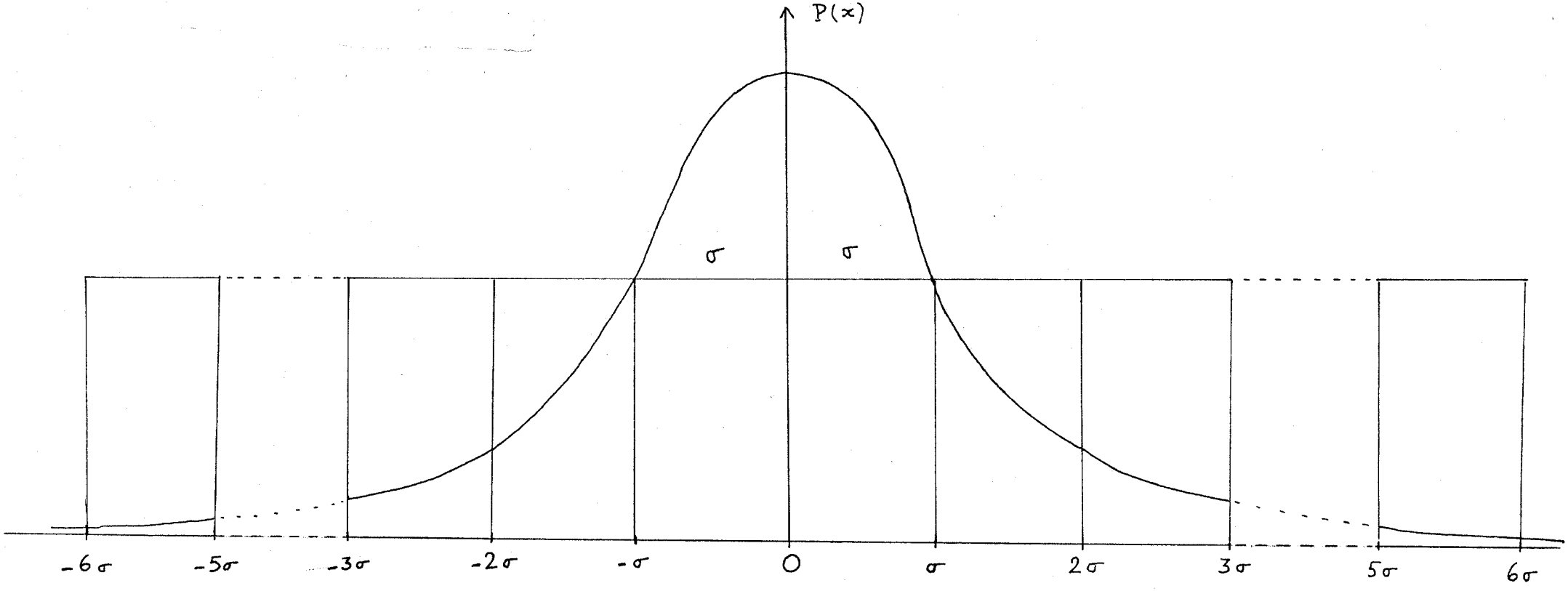
équation d'une droite dite droite de Henry : X' est fonction linéaire de x.

Donc, à toute fréquence cumulée, on peut associer une valeur probit, et, plus généralement, on considère que toute grandeur comprise entre 0 et 1 (des pourcentages de mortalité par exemple) peut être soumise à la transformation probit. C'est ainsi que l'on a dressé des tables de valeur "probit" toutes faites, telle celle dont nous nous sommes servis.

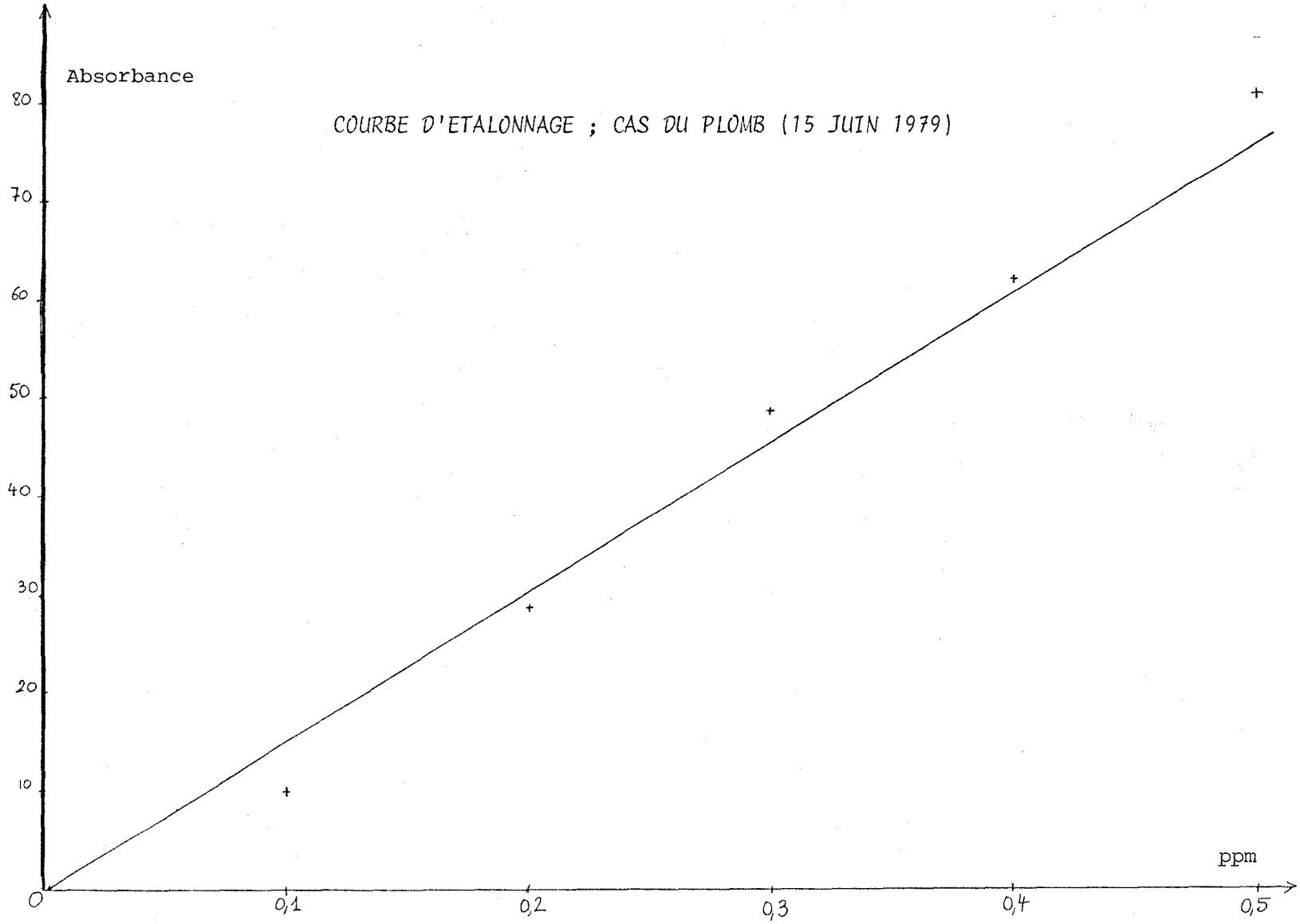
Les chercheurs en toxicologie qui l'ont bâtie, ont adopté une convention spéciale pour les valeurs extrêmes 0 et 1 ; d'après le schéma théorique (p. 74) , on s'aperçoit que la probabilité d'avoir une dose efficace est d'autant plus faible que l'on s'éloigne de la moyenne μ, donc que la probabilité d'avoir une dose non efficace ou nulle est d'autant plus grande.

Pour la valeur 0, déterminée pour une dose sans effet à laquelle on doit attribuer une probabilité de l'effet nul très grande (théoriquement égale à 1_0,5), la valeur probit correspondante est de + ∞. Or, par convention, on admet la valeur probit de 11 pour la valeur 0 et celle de - 1 pour la valeur 1, ce qui correspond au fait que l'on retire dans le premier cas et que l'on ajoute dans l'autre 6 fois la valeur de l'écart type. En effet, plus on s'éloigne de la valeur moyenne μ, plus on a de chance d'affirmer avec sécurité que l'on a une dose nulle ou une dose à effet total.

Schéma d'une distribution normale théorique et détail de l'obtention des valeurs Probit pour les valeurs de x s'écartant de la moyenne de $\pm 6\sigma$



				Valeur Probit				
6	4,99	4,77	3,41	0	-3,41	-4,77	-4,99	-6
				+5				
= 11	= 9,99	= 9,77	= 8,41	= 5,00	= 1,59	= 0,23	= 0,01	-1

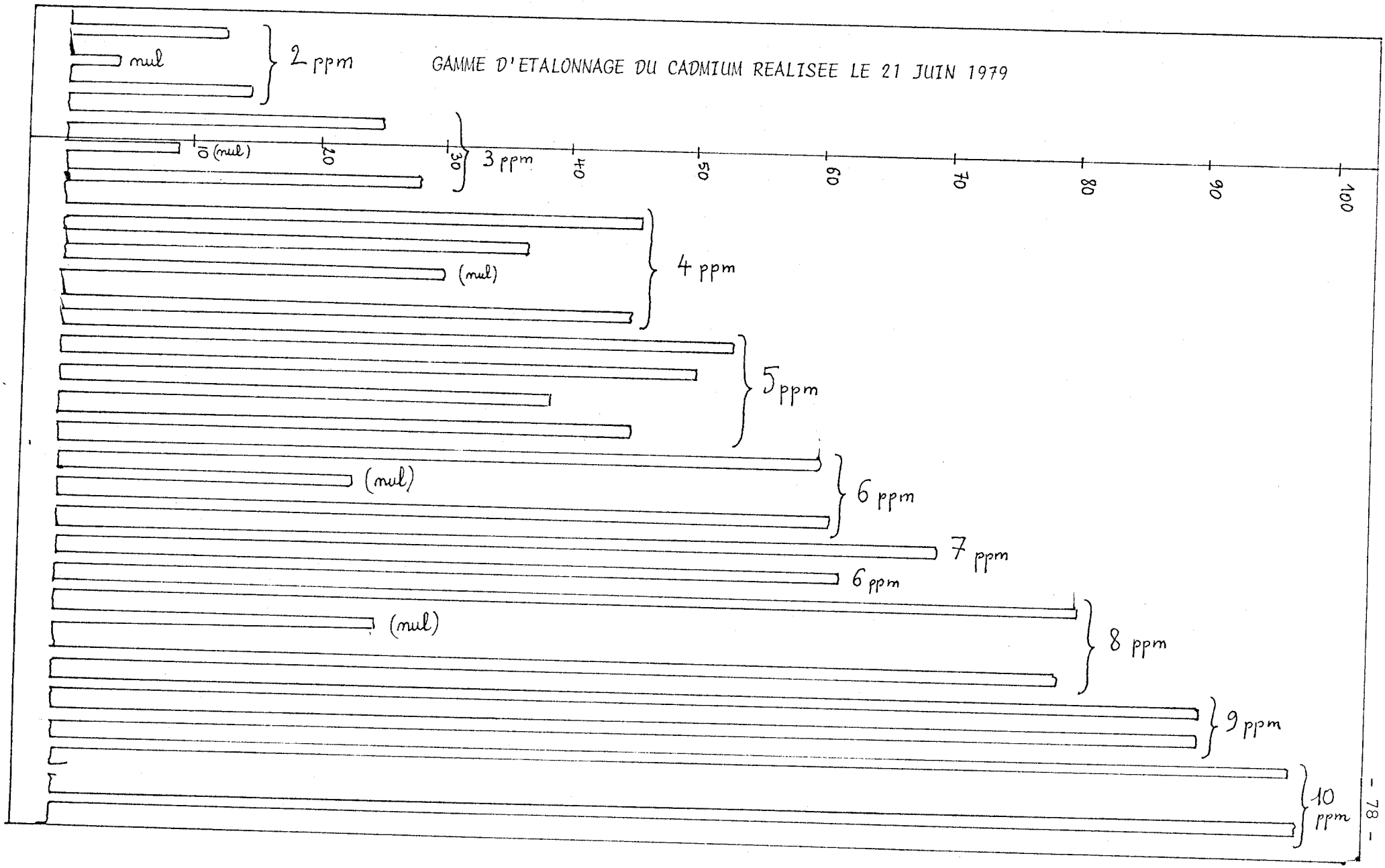

COURBE D'ETALONNAGE ; CAS DU PLOMB (15 JUIN 1979)
Absorbance
80
70
60
50
40
30
20
10
O
0,1
0,2
0,3
0,4
0,5
ppm

ESSAI Pb dose milieu ppm 15/6/79	*E. fetida* Témoin	*E. fetida* 10^3	*E. fetida* 10^4	*A. chlorotica* 10^2	*A. chlorotica* 10^3
Absorbance lue sur le papier enregistreur	10,5	55	93	35	66
ppm Pb corresp. aux dilutions cf. courbe	0,07 d = 1	0,367 d = 4	0,62 d = 10	0,235 d = 1	0,435 d = 4
ppm Pb échantillon tot. (on x par la dilution)	0,07	1,468	6,20	0,235	1,74
poids de la prise d'essai en mg PS	159,79	148,47	207,41	169,95	182,51
mg Pb de l'échantillon total	700	14 680	62 000	2 350	17 400
ppm Pb des vers en PS de vers	4,38	98,88	298,92	13,83	95,34

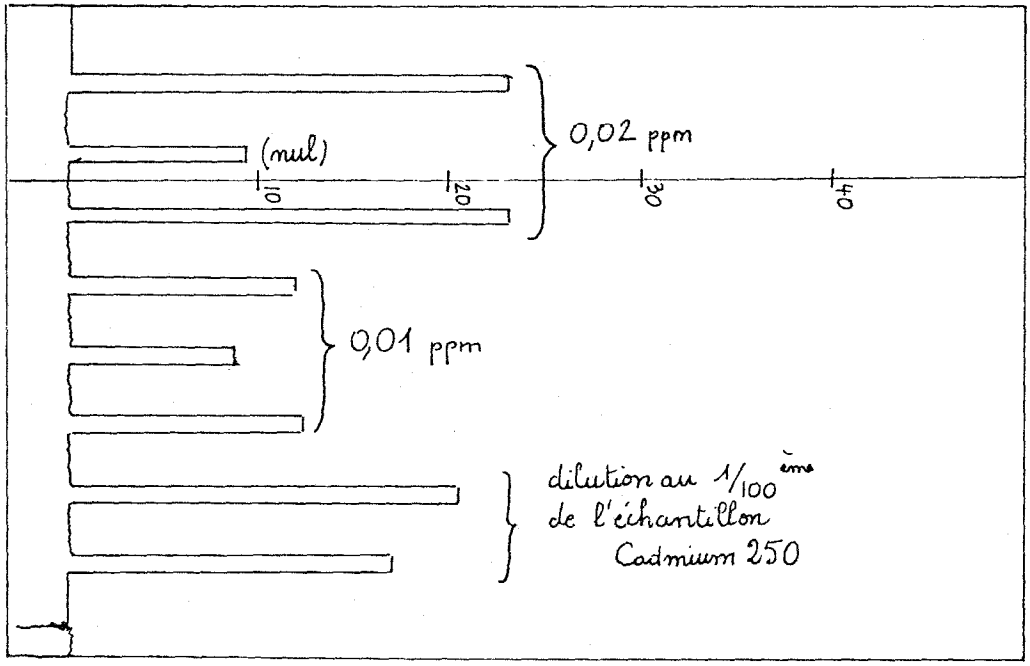
DETAIL DES CALCULS DE CONCENTRATIONS EN PLOMB FAISANT SUITE A L'ANALYSE DES ESSAIS :

. Toxicité à 7 jours ; Artisol ; E. fetida

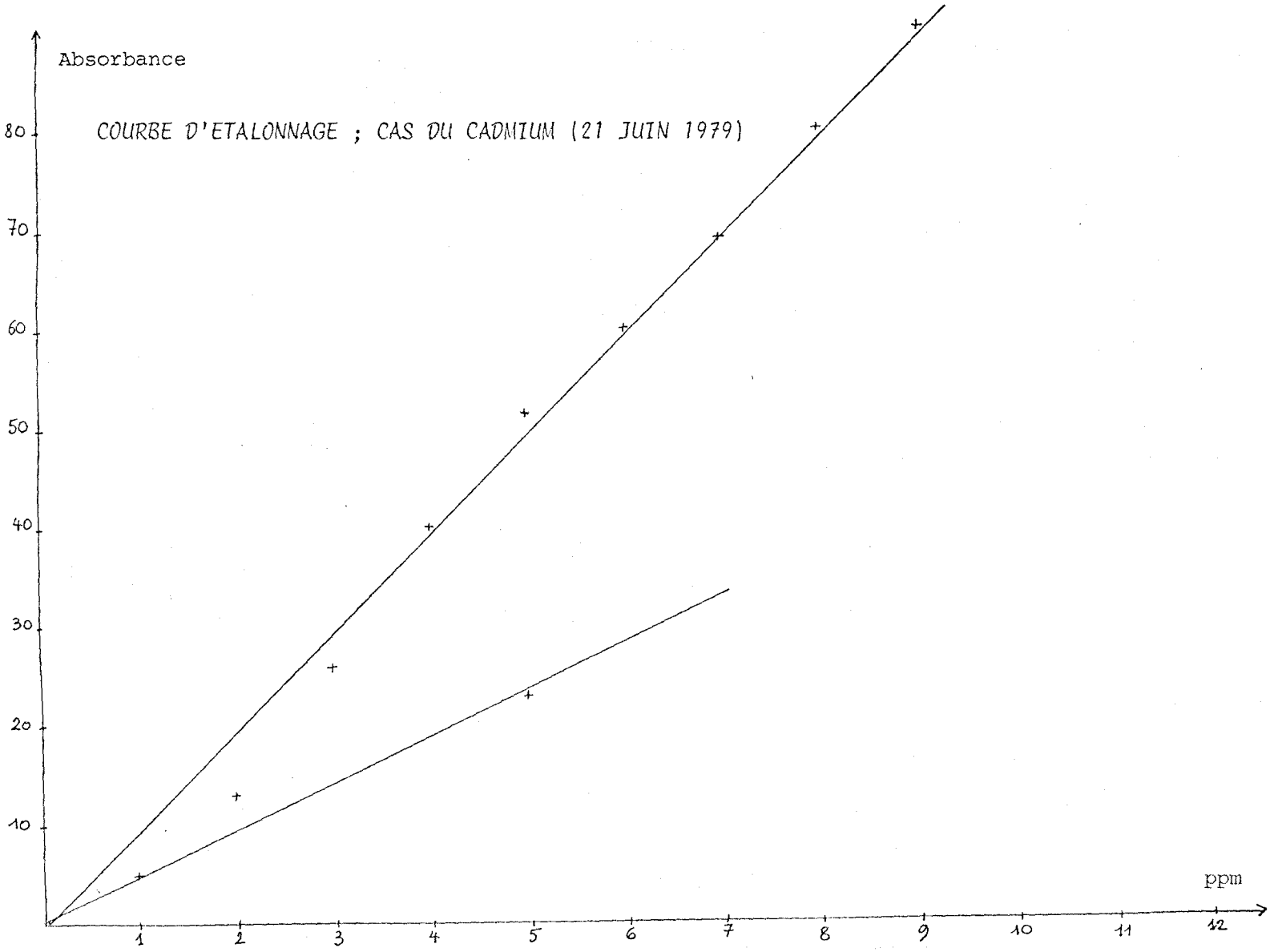
. Toxicité à 7 jours ; Artisol ; A. chlorotica


GAMME D'ETALONNAGE DU CADMIUM REALISEE LE 21 JUIN 1979
2 ppm
nul
3 ppm
0 (nul)
20
30
40
50
60
70
80
90
100
4 ppm
(nul)
5 ppm
6 ppm
(nul)
7 ppm
6 ppm
8 ppm
(nul)
9 ppm
10 ppm

4.2 Le cadmium

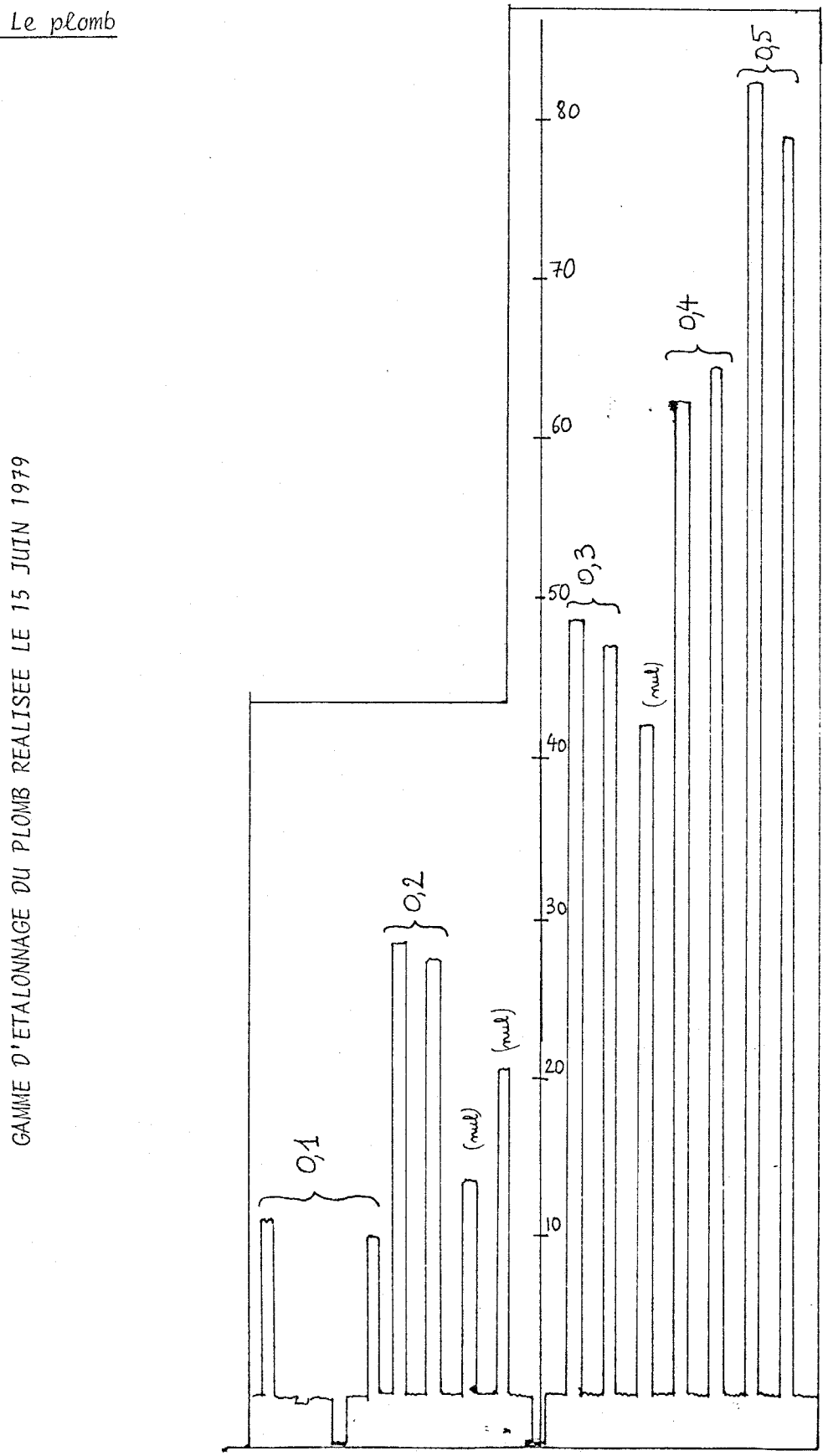


GAMME D'ETALONNAGE DU CADMIUM REALISEE LE 21 JUIN 1979
A L'INTENTION DE L'ECHANTILLON Cd 250 (1er essai) NE "SORTANT"
PAS DANS L'AUTRE GAMME (MOINS SENSIBLE)


Absorbance
COURBE D'ETALONNAGE ; CAS DU CADMIUM (21 JUIN 1979)
80
70
60
50
40
30
20
10
ppm
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

IV. DETAIL DU CALCUL DES CONCENTRATIONS EN METAUX LOURDS DES VERS DES DIFFERENTS ECHANTILLONS

4.1 Le plomb

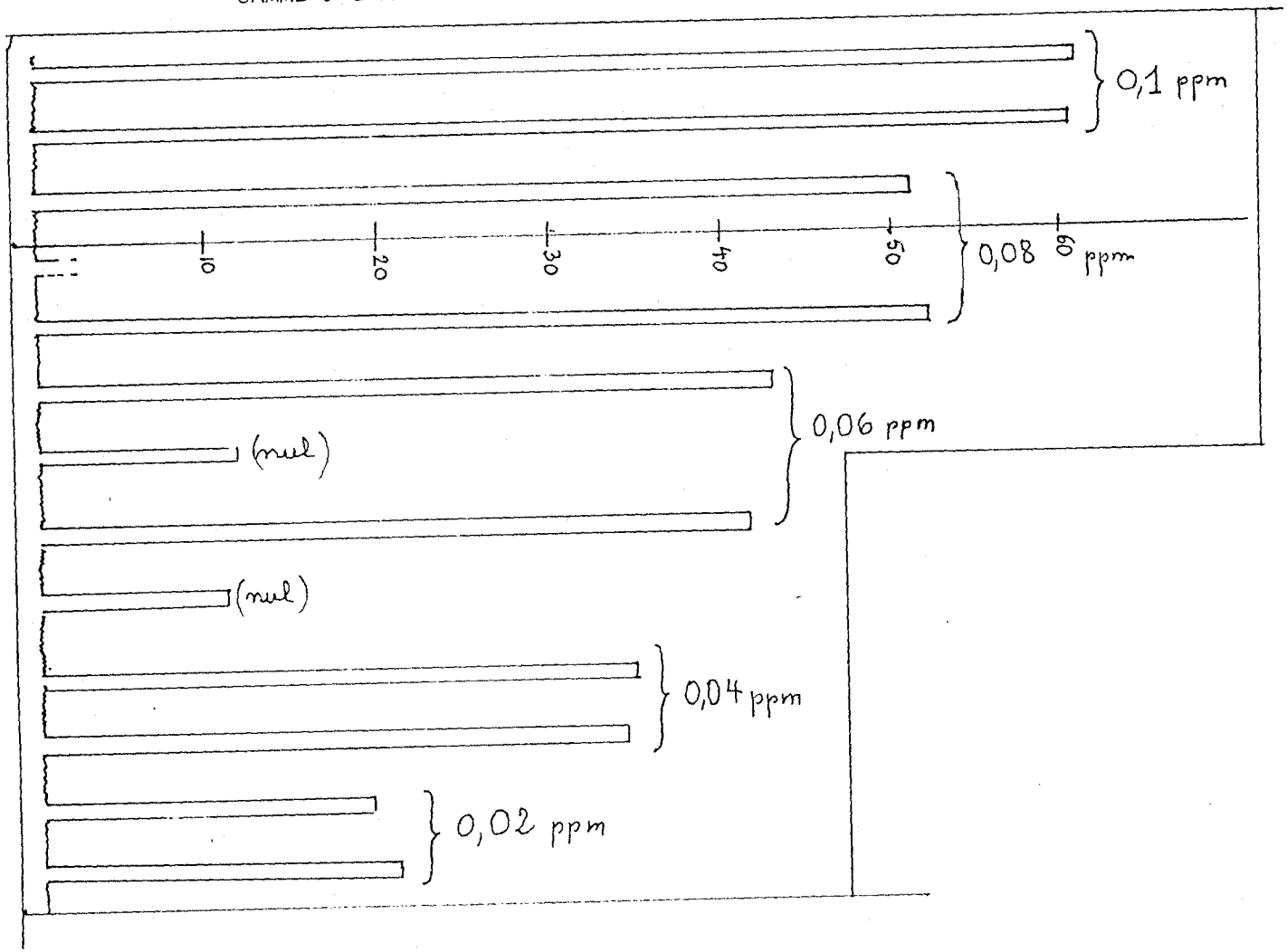


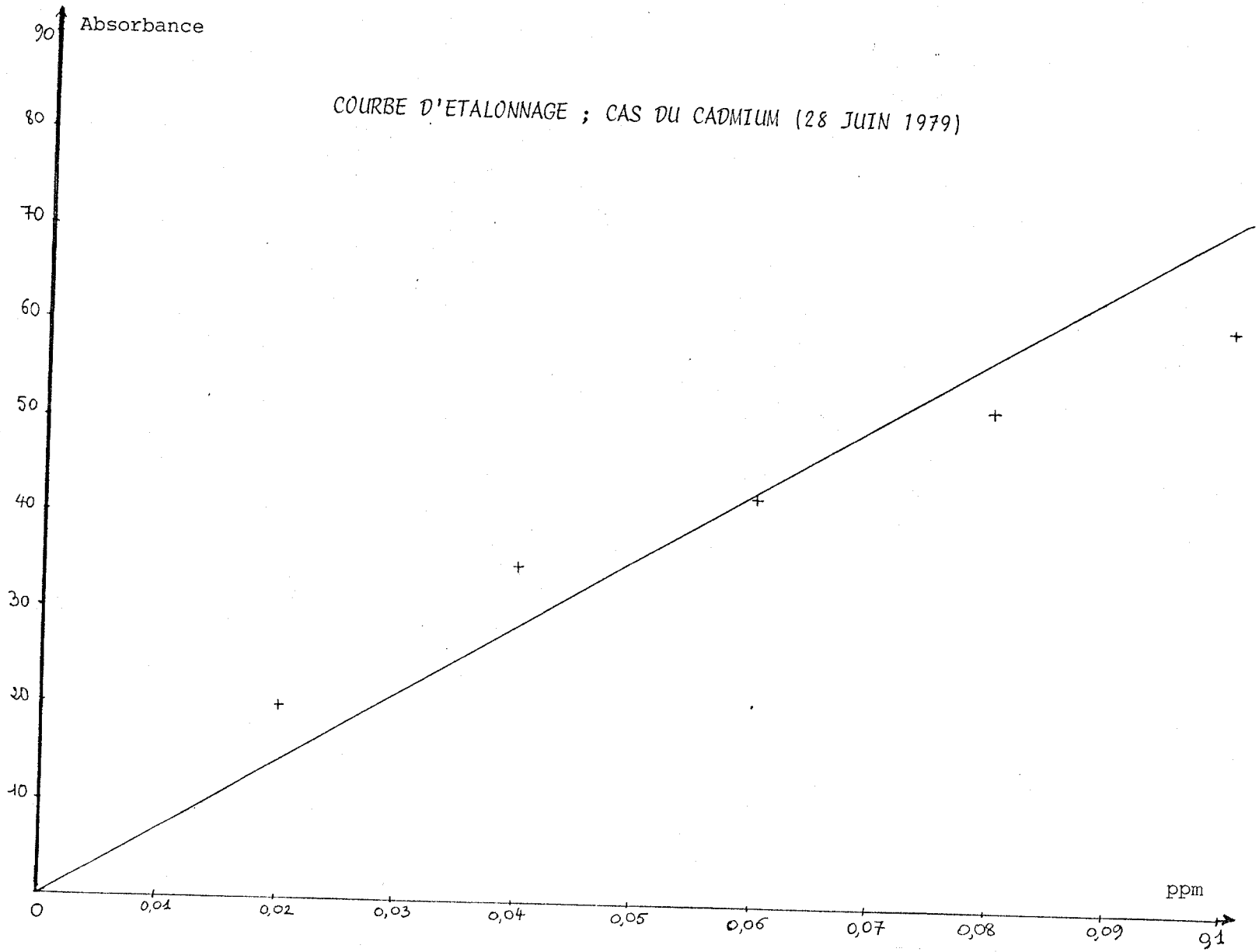
ESSAI Cd dose milieu ppm 21/6/79	Cd 250 1er essai	Cd 250 2ème essai	Cd 500 1er essai	Cd 500 2ème essai	Cd 500 3ème essai	Cd 750 1er essai	Cd 750 2ème essai
Absorbance lue sur le rouleau enregistreur	18	18,5	19	25	29	34	37
ppm Cd de l'échantillon tot. à anal. V tot = 10 ml	1,9	1,6	2	2,6	3	3,5	3,8
poids de la prise d'essai en mg PS	178,27	128	120,85	157,37	163,2	144,52	148,93
mg Cd de l'échantillon total (10 ml)	19 000	16 000	20 000	26 000	30 000	35 000	38 000
ppm Cd des vers en PS de vers	106,58	125	165,5	165,2	183,81	242	255,15

DETAIL DES CALCULS DE CONCENTRATIONS EN CADMIUM FAISANT SUITE A L'ANALYSE DES ESSAIS

. Toxicité à 7 jours ; Artisol ; E. fetida

GAMME D'ETALONNAGE DU CADMIUM REALISEE LE 28 JUIN 1979





COURBE D'ETALONNAGE ; CAS DU CADMIUM (28 JUIN 1979)

Essai Cd dose milieu ppm / 28/6/79	*A. chlorotica* Témoin	*A. chlorotica* 10	*A. chlorotica* 100	*A. chlorotica* 250	*E. fetida* PPDS 14 J.	*E. fetida* PPDS 21 J.
Absorbance lue sur le papier enregistreur	57,5	28,5	58,5	55	27 / 88	43
ppm Cd dans la dilution de l'échantillon anal.	0,08 d = 1	0,04 d = 10	0,081 d = 20	0,077 d = 20	0,038 d=100 / 0,0525 d = 100	0,06 d = 100
ppm Cd échantillon tot. (on x par la dilution)	0,08	0,4	1,62	1,54	3,8 / 5,25	6
Poids de la prise d'essai en mg PS	166	187,7	202	109	103,9 / 170,41	146,34
mg Cd de l'échantillon total (10 ml)	800	4 000	16 200	15 400	38 000 / 52 500	60 000
ppm Cd des vers en PS de vers	4,82	21,3	80,2	141,28	365,7 / 308,08	410

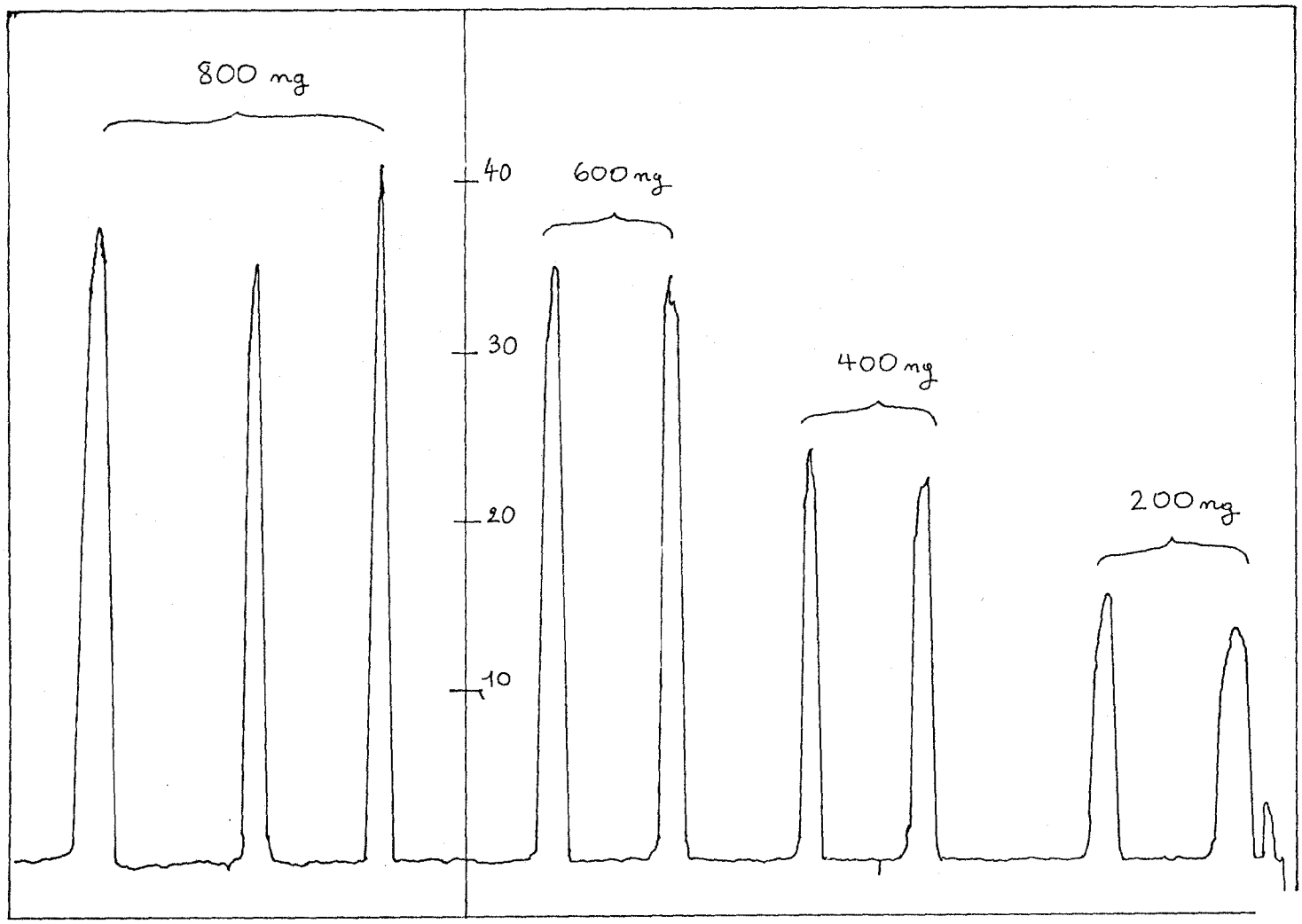
ESSAI 1 / ESSAI 2

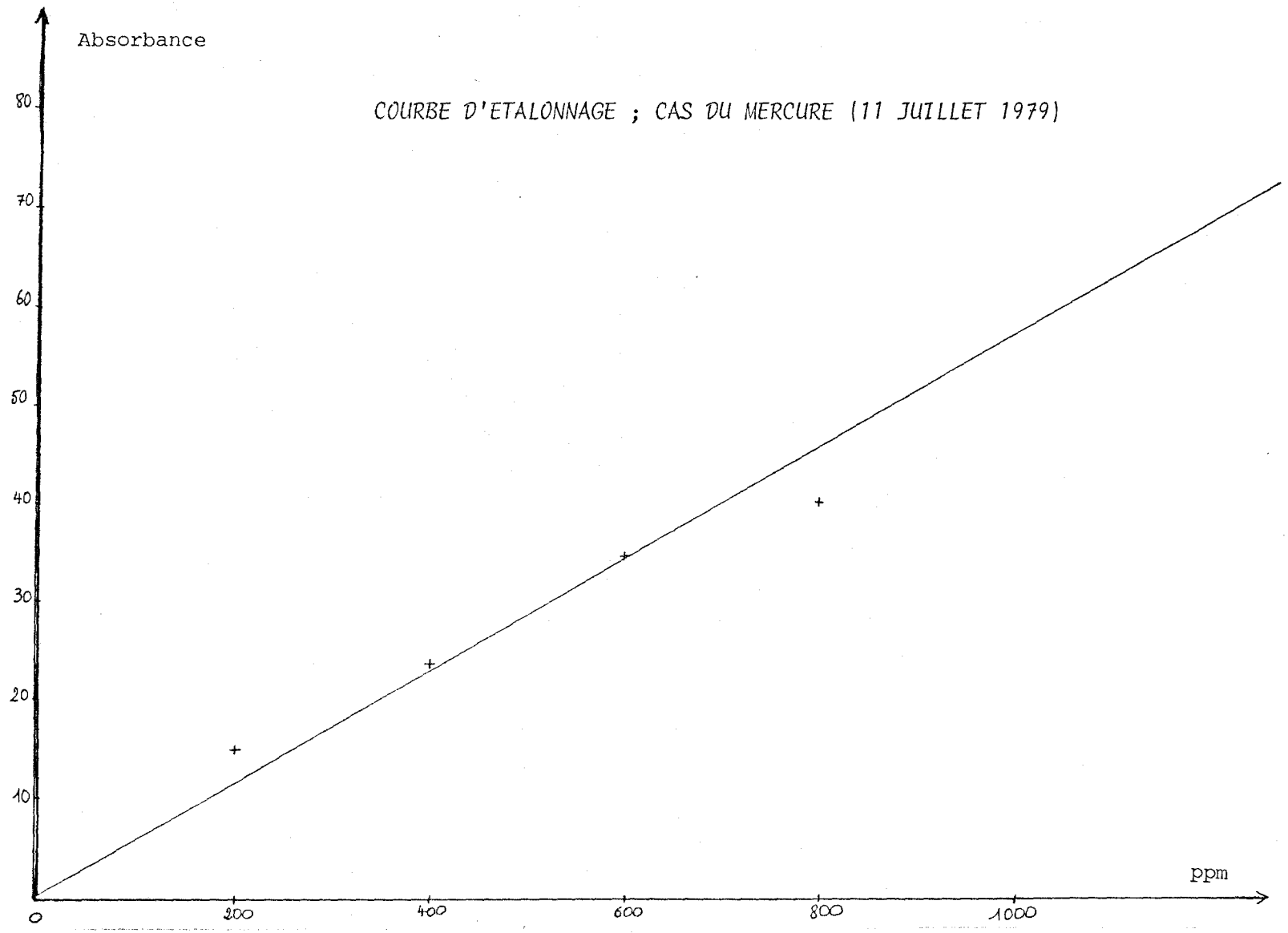
DETAIL DES CALCULS DE CONCENTRATIONS EN CADMIUM FAISANT SUITE A L'ANALYSE DES ESSAIS

. Toxicité à 7 jours ; Artisol ; A. chlorotica

. Toxicité à long terme ; Artisol ; E. fetida (14 jours ; 21 jours)

GAMME D'ETALONNAGE DU MERCURE REALISEE LE 11 JUILLET 1979





COURBE D'ETALONNAGE ; CAS DU MERCURE (11 JUILLET 1979)

ESSAI Hg dose milieu ppm / 11/7/79	*E. fetida* PPDS 14J (121)	*E. fetida* PPDS 21J (121)	*E. fetida* A Témoin	*E. fetida* A 10	*E. fetida* A 100	*E. fetida* A 200
absorbance lue sur le papier enregistreur	45	55	10	26	37 / 32	58 / 36
mg de Hg dans la prise d'essai cf. courbe	785	960	175	450	660 / 555	1 010 / 625
mg de Hg dans 1 ml de la prise d'essai	785	960	175	450	660 / 555	1 010 / 625
a = mg Hg échantillon total (50 ml)	35 250	48 000	875	2 250	33 000 / 27 750	50 500 / 31 250
b = PF en mg de l'échantillon	994,68	550	1 160	1 342	1 634 / 1 440	1 288 / 952
c = PS correspondant en mg +	149,2	82,5	173,9	201,3	245,1 / 216	193,2 / 142,8
a/b = C vers en ppm PF de l'échantillon	39,46	87,27	0,755	1,67	20,19 / 19,27	53,046 / 32,82
a/c = C vers en ppm PS de l'échantillon	263,07	581,8	5,03	11,17	134,64 / 128,47	261,38 / 218,83

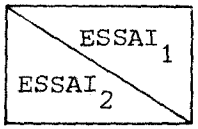
+ ces PS ont été calculés à partir des PF afin de permettre la comparaison des teneurs en Hg (exprimées en ppm de PS de vers) avec celles en autres métaux. Le ver est supposé contenir 85 % de son poids en eau. Le coefficient multiplicatif est égal à 0,15.

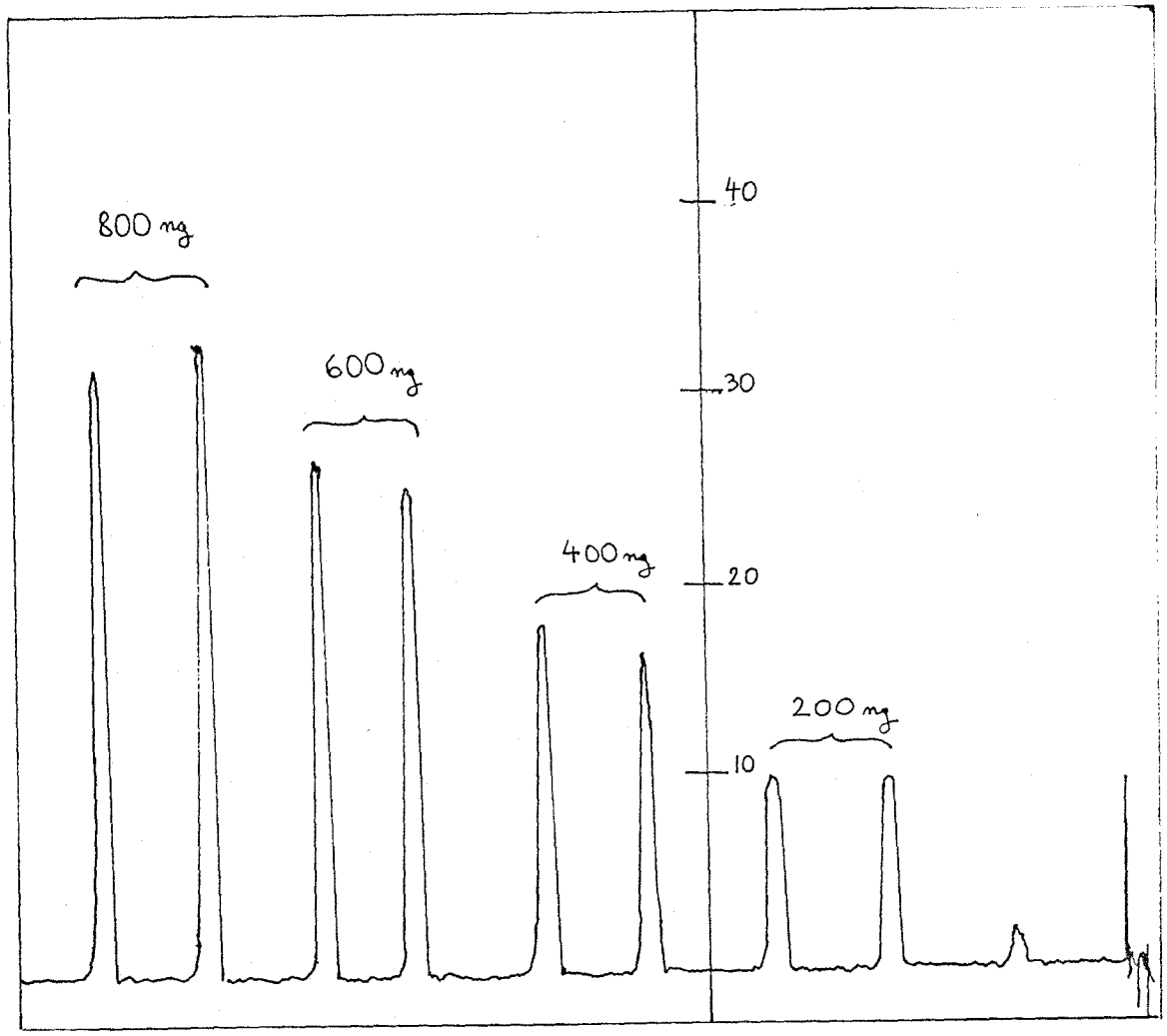
A : t. argileuse

DETAIL DES CALCULS DE CONCENTRATIONS EN MERCURE FAISANT SUITE A L'ANALYSE DES ESSAIS

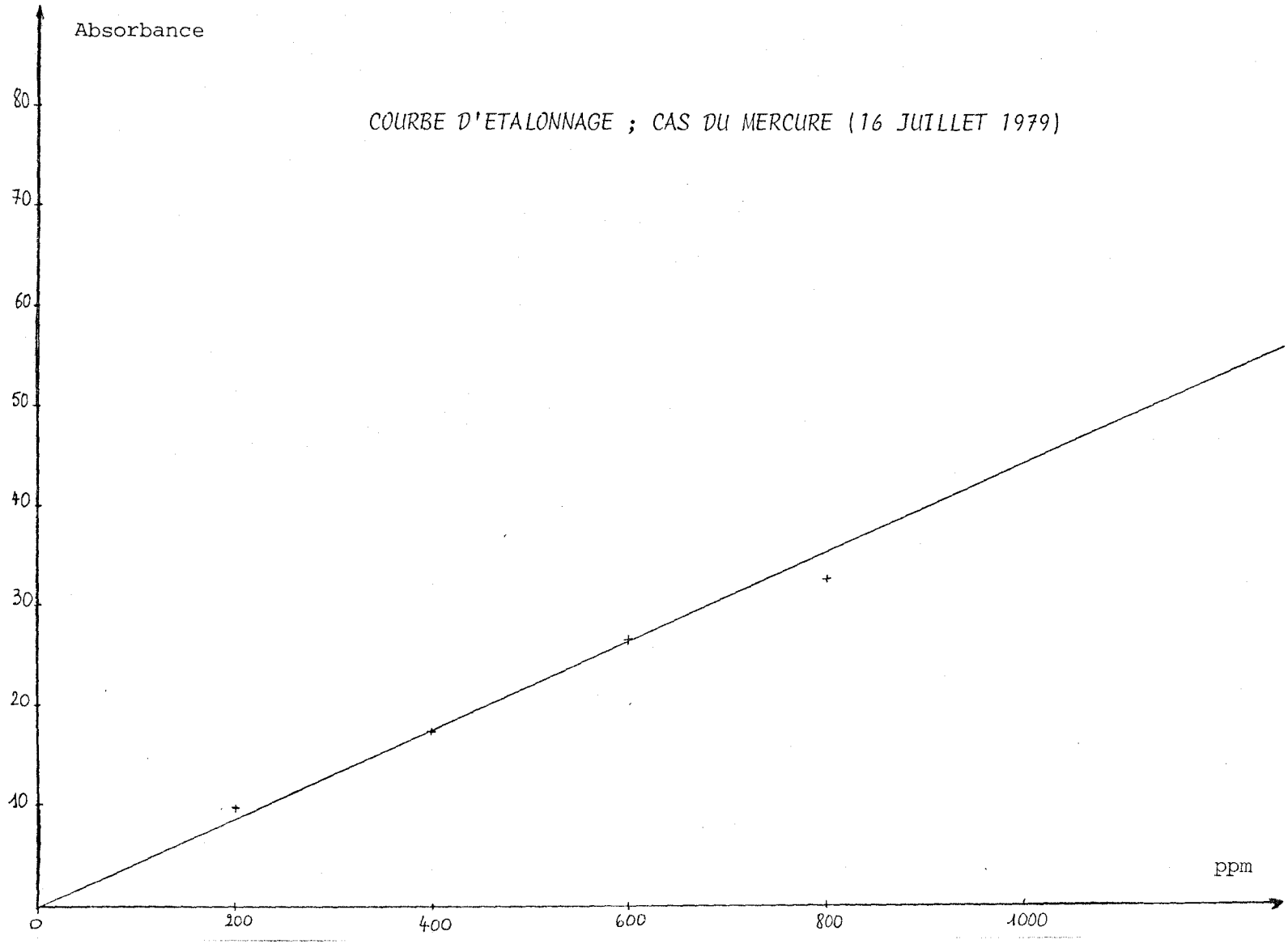
. Toxicité à long terme (14 jours, 21 jours) ; Artisol ; E. fetida

. Toxicité à 7 jours ; Influence du type de terre ; E. fetida





GAMME D'ETALONNAGE DU MERCURE REALISEE LE 16 JUILLET 1979



COURBE D'ETALONNAGE ; CAS DU MERCURE (16 JUILLET 1979)

ESSAI Hg dose milieu ppm / 16/7/79	Hg *H* 200	Hg *H* 400	Hg *H* 700	Hg *A* 400	Hg *A* 700	Hg *LS* 10	Hg *LS* 200	Hg *LS* 400	PPDS 28 J (121)	PPDS
Absorbance lue sur le papier enregistreur	12	38 / 37	25	36 / 20	41	33,5	16	36 / 43	30 / 37	5
mg de Hg dans la prise d'essai cf. courbe	270	860 / 840	570	815 / 455	930	710	360	815 / 980	685 / 840	115
mg de Hg dans 1 ml de la prise d'essai	270	860 / 840	570	815 / 455	930	71	1 800	815 / 1 960	685 / 840	115
a = mg Hg échantillon total (50 ml)	13 500	43 000 / 42 000	28 500	40 750 / 22 750	46 500	3 550	90 000	40 750 / 97 500	34 250 / 42 000	5 750
b = PF en mg de l'échantillon	1 531	1 134 / 1 153	1 059	905,76 / 1 090	814	1 513	1 251	905,7 / 1 086,5	863 / 1 081	1 357
c = PS correspondant en mg+	229,65	170,1 / 172,95	158,85	135,8 / 163,5	122,25	226,95	187,65	135,8 / 162,9	129,4 / 169,15	203,55
a/b = C vers en ppm PF de l'échantillon	8,817	37,92 / 36,42	26,91	33,67 / 20,87	57,1	2,346	71,94	44,98 / 89,7	39,6 / 38,85	4,237
a/c = C vers en ppm PS de l'échantillon	58,79	252,79 / 242,8	179,4	224,5 / 139,1	380,3	15,64	479,6	299,9 / 598,2	264,9 / 259	25,9

A : t. argileuse

H : t. humifère

LS : t. limono-sabl.

ESSAI$_1$ / ESSAI$_2$

\+ ces PS ont été calculés à partir des PF afin de permettre la comparaison des teneurs en Hg (exprimées en ppm de PS de vers) avec celles des autres métaux. Le ver est supposé contenir 85 % de son poids en eau. Le coefficient multiplicatif est égal à **0,15**

DETAIL DES CALCULS DE CONCENTRATIONS EN MERCURE FAISANT SUITE A L'ANALYSE DES ESSAIS

. Toxicité à 7 jours ; Influence du type de terre ; E. fetida

. Toxicité à long terme (28 jours) ; Artisol ; E. fetida

V. TABLE DE LA DISTRIBUTION DE t

Degrés de liberté	Probabilité d'avoir une valeur supérieure, quel que soit le signe								
	0.500	0.400	0.200	0.100	0.050	0.025	0.010	0.005	0.001
1	1.000	1.376	3.078	6.314	12.706	25.452	63.657		
2	0.816	1.061	1.886	2.920	4.303	6.205	9.925	14.089	31.598
3	.765	0.978	1.638	2.353	3.182	4.176	5.841	7.453	12.941
4	.741	.941	1.533	2.132	2.776	3.495	4.604	5.598	8.610
5	.727	.920	1.476	2.015	2.571	3.163	4.032	4.773	6.859
6	.718	.906	1.440	1.943	2.447	2.969	3.707	4.317	5.959
7	.711	.896	1.415	1.895	2.365	2.841	3.499	4.029	5.405
8	.706	.889	1.397	1.860	2.306	2.752	3.355	3.832	5.041
9	.703	.883	1.383	1.833	2.262	2.685	3.250	3.690	4.781
10	.700	.879	1.372	1.812	2.228	2.634	3.169	3.581	4.587
11	.697	.876	1.363	1.796	2.201	2.593	3.106	3.497	4.437
12	.695	.873	1.356	1.782	2.179	2.560	3.055	3.428	4.318
13	.694	.870	1.350	1.771	2.160	2.533	3.012	3.372	4.221
14	.692	.868	1.345	1.761	2.145	2.510	2.977	3.326	4.140
15	.691	.866	1.341	1.753	2.131	2.490	2.947	3.286	4.073
16	.690	.865	1.337	1.746	2.120	2.473	2.921	3.252	4.015
17	.689	.863	1.333	1.740	2.110	2.458	2.898	3.222	3.965
18	.688	.862	1.330	1.734	2.101	2,445	2.878	3.197	3.922
19	.688	.861	1.328	1.729	2.093	2.433	2.861	3.174	3.883
20	.687	.860	1.325	1.725	2.086	2.423	2.845	3.153	3.850
21	.686	.859	1.323	1.721	2.080	2.414	2.831	3.135	3.819
22	.686	.858	1.321	1.717	2.074	2.406	2.819	3.119	3.792
23	.685	.858	1.319	1.714	2.069	2.398	2.807	3.104	3.767
24	.685	.857	1.318	1.711	2.064	2.391	2.797	3.090	3.745
25	.684	.856	1.316	1.708	2.060	2.385	2.787	3.078	3.725
26	.684	.856	1.315	1.706	2.056	2.379	2.779	3.067	3.707
27	.684	.855	1.314	1.703	2.052	2.373	2.771	3.056	3.690
28	.683	.855	1.313	1.701	2.048	2.368	2.763	3.047	3.674
29	.683	.854	1.311	1.699	2.045	2.364	2.756	3.038	3.659
30	.683	.854	1.310	1.697	2.042	2.360	2.750	3.030	3.646
35	.682	.852	1.306	1.690	2.030	2.342	2.724	2.996	3.591
40	.681	.851	1.303	1.684	2.021	2.329	2.704	2.971	3.551
45	.680	.850	1.301	1.680	2.014	2.319	2.690	2.952	3.520
50	.680	.849	1.299	1.676	2.008	2.310	2.678	2.937	3.496
55	.679	.849	1.297	1.673	2.004	2.304	2.669	2.925	3.476
60	.679	.848	1.296	1.671	2.000	2.299	2.660	2.915	3.460
70	.678	.847	1.294	1.667	1.994	2.290	2.648	2.899	3.435
80	.678	.847	1.293	1.665	1.989	2.284	2.638	2.887	3.416
90	.678	.846	1.291	1.662	1.986	2.279	2.631	2.878	3.402
100	.677	.846	1.290	1.661	1.982	2.276	2.625	2.871	3.390
120	.677	.845	1.289	1.658	1.980	2.270	2.617	2.860	3.373
∞	.6745	.8416	1.2816	1.6448	1.9600	2.2414	2.5758	2.8070	3.2905

* Une partie de cette table est reproduite, avec l'autorisation de R.A. Fisher, de *Statistical Methods for Research Workers*, publiée par Oliver and Boyd, Edimbourg (1925-1950) ; de Maxine Merrington « *Table of percentage Points of the t Distribution* » Biometrika, 32 : 300 (1942) et de Bernard Ostle « *Statistics in Research* », Iowa State University Press (1954).