... Avant-propos ...

Cette étude a été réalisée en partie au laboratoire de Monsieur Bouché, maître de recherches à l'I.N.R.A. de Dijon, en partie au laboratoire de Madame Autissier, professeur de chimie analytique à la faculté de pharmacie de Dijon, sur un sujet proposé par Monsieur Bouché.

Je remercie vivement toutes les personnes qui ont aidé, directement ou indirectement, à l'élaboration de ce mémoire.

SOMMAIRE

INTRODUCTION..... 1

PREMIERE PARTIE..... 4

I. LOMBRICIENS..... 5

1.1 Généralités..... 5

1.2 Rôle agronomique..... 5

1.3 Prédatisme des lombriciens..... 6

II. CONTAMINANTS ETUDIES..... 7

2.1 Cadmium..... 7

2.1.1 ORIGINE..... 7

2.1.2 CADMIUM DANS LA BIOSPHERE..... 7

a) Généralités..... 7

b) Cadmium dans les sols et les plantes..... 8

c) Cadmium et lombriciens..... 8

2.2 Plomb..... 9

2.2.1 ORIGINE..... 9

2.2.2 PLOMB DANS LA BIOSPHERE..... 10

a) Effets du plomb sur l'homme..... 11

b) Plomb dans les sols..... 11

c) Plomb et chaînon lombricien..... 12

2.3 Mercure..... 12

2.3.1 ORIGINE..... 12

2.3.2 MERCURE DANS LA BIOSPHERE..... 14

a) Mercure dans le réseau trophique..... 14

b) Mercure dans les sols..... 14

c) Mercure et lombriciens..... 15

2.4 Lindane..... 15

2.4.1 LINDANE DANS LES SOLS..... 15

2.4.2 LINDANE ET VEGETAUX..... 16

2.4.3 ACCUMULATION SUBLETALE PAR LES ANIMAUX..... 16

2.4.4 DOSES LETALES..... 16

DEUXIEME PARTIE..... 18

A - Expérience de laboratoire..... 20

I. ELEVAGES..... 20

1.1 Artisol..... 20

1.2 Lombriciens..... 21

1.3 Essais en sols naturels..... 21

1.4 Contaminants..... 23

1.5 Conditions d'élevage..... 24

1.6 Alimentation..... 24

1.7 Conduite de l'expérimentation..... 25

II. ANALYSE DES TENEURS EN CONTAMINANT..... 26

2.1 Préparation des échantillons..... 26

2.1.1 CAS DU PLOMB ET DU CADMIUM..... 26

2.1.2 CAS DU MERCURE..... 26

2.1.3 CAS DU LINDANE..... 27

2.2 Analyse des contaminants..... 27

2.2.1 PRINCIPE DE LA SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (PINTA ET AL., 1971)..... 27

2.2.2 PRATIQUE DE LA S.A.A..... 29

a) Cas du plomb et du cadmium..... 29

b) Cas du mercure..... 30

2.2.3 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE.. 30

2.2.4 PRATIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE..... 31

2.2.5 MODES DE CALCUL..... 31

B - Prélèvements au terrain..... 33

I. CONTAMINATION INDUSTRIELLE DE SAINT-CYPRIEN..... 33

1.1 Généralités..... 33

1.2 Interprétation des résultats en notre possession..... 33

1.3 Prélèvements..... 37

II. UNE CONTAMINATION AGRICOLE..... 39

TROISIEME PARTIE..... 41

A - Expérience de laboratoire..... 43

I. BIOACCUMULATION AU COURS DU TEMPS..... 43

1.1 Résultats 43
1.2 Phénomènes pouvant expliquer ces résultats 50
1.2.1 PHENOMENES LIES A L'ANIMAL 50
1.2.2 PHENOMENES LIES AU SOL 50
1.3 Autre expression des mêmes résultats 52
II. EXPERIENCE "MODE D'APPORT DU CONTAMINANT" 52
III. EXPERIENCE "INFLUENCE DU SOL" 59
IV. CONCLUSION PARTIELLE 59
B - Prélèvements au terrain 60
I. RESULTATS DE ST-CYPRIEN 60
1.1 Résultats bruts 60
1.2 Interprétation 60
1.2.1 PLOMB 60
1.2.2 CADMIUM 62
1.2.3 INTERACTION 62
II. CONTAMINATION AGRICOLE 64
2.1 Résultats bruts 64
2.2 Interprétation 64
III. CONCLUSION PARTIELLE 66
CONCLUSION 67
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 68

INTRODUCTION

Par ses activités multiples et sa volonté d'augmenter sans cesse ses profits, l'homme émet un certain nombre de substances présentant des risques pour son environnement. Ces substances sont soit produites à des fins directement économiques pour être épandues, soit constituées des résidus d'une autre activité économique.

Bien qu'elles puissent avoir des effets bénéfiques, ces substances sont susceptibles de présenter un danger pour l'équilibre biologique du milieu. Elles sont des contaminants.

Le danger qu'elles présentent est fonction de nombreux facteurs, dont le niveau quantitatif de l'émission. Une substance à faible dose peut avoir un impact bénéfique et être néfaste à forte dose. Le meilleur exemple de ce phénomène est celui des oligoéléments, nécessaires à un certain seuil et induisant carences et toxicités lorsque l'on s'en écarte.

Les contaminants agricoles peuvent servir à deux fins : la destruction de maladies, d'insectes, d'adventices des cultures, ce sont des pesticides ; la nutrition de ces cultures, ce sont les macro et oligoéléments. Nous pouvons utiliser une substance selon ces deux objectifs : le cuivre est à la fois oligoélément et fongicide.

Les contaminants non agricoles sont le plus souvent des déchets rejetés dans la biosphère, après leur utilisation par l'industrie ou les consommateurs.

Un contaminant peut être à la fois agricole et industriel ; le mercure est utilisé comme pesticide sous forme organo-mercurielle et rejeté sous forme de métal par l'industrie.

Les contaminants sont dangereux vis-à-vis des êtres vivants selon deux modes d'action. Ils ont une action de toxicité, laquelle conduit à la mort de l'être vivant. La dose létale, épandue en une ou plusieurs fois,

conduit à la disparition du matériel végétal ou animal et au retour du contaminant au sol. Ils ont une action de bioaccumulation et de transfert au maillon suivant des chaînes alimentaires, ceci à des doses sublétales. Ce transfert s'accompagne souvent d'une concentration du contaminant, la dose sublétale d'un niveau trophique pouvant se transformer en dose létale à un niveau supérieur.

Le danger de bioaccumulation d'un contaminant par un être vivant ne peut se quantifier qu'au champ, par la teneur en contaminant de l'être considéré, laquelle est due à la teneur du sol, pondérée par la disponibilité biologique de la substance qui varie en fonction de la matière organique, des argiles, de la dynamique de l'eau...

La quantification de la bioaccumulation est donc fonction des conditions spatio-temporelles de l'étude et ne peut être reproduite. En outre, les techniques actuelles d'extraction de métaux lourds dans les sols ne donnent qu'une fraction de la quantité totale (entre 50 et 70 %), fraction variant selon le métal.

Face à cette non reproductibilité des résultats issus des prélèvements de terrain, nous essayons au laboratoire de mettre au point une bioaccumulation standardisée dans un milieu contrôlé. Les résultats des expériences de laboratoire présentent l'avantage d'être reproductibles et l'inconvénient de ne pas pouvoir être généralisés au champ.

L'observateur est donc incapable de généraliser des résultats à toutes les situations de la nature, que ce soit à partir des prélèvements de terrain ou d'expériences de laboratoire.

Par contre, il doit pouvoir se servir d'un maillon de la chaîne alimentaire, les lombriciens par exemple, comme bioéchantillon du danger d'un contaminant dès qu'il aura isolé au laboratoire les mécanismes de bioaccumulation. Toutefois, en confrontant les résultats et sur la base de l'expérience acquise, une substance serait dite dangereuse à partir d'un certain niveau de contamination, des lombriciens dans une situation donnée, quels que soient la quantité de contaminants présente dans le sol et les phénomènes de biodisponibilité dus au sol. Nous ne pouvons nous servir des lombriciens comme bioéchantillons que parceque nous sommes capables

d'en extraire les contaminants dans leur totalité.

Il nous faut donc, d'une part approcher les mécanismes de bioaccumulation en milieu standardisé, d'autre part comparer les résultats dans ce milieu à ceux dans la nature, pour pouvoir qualifier le danger d'un contaminant.

Les mécanismes de contamination ont d'abord été approchés en milieu semi-artificiel, c'est-à-dire en sol naturel dans des conditions de laboratoire (Bouché et Fayolle, 1980 ; Fayolle, 1979). La nécessité d'un milieu complètement artificiel et standardisé a été mise en évidence (Bouché, 1979). La découverte de ce milieu (Ferrière, Fayolle et Bouché, sous presse) a permis à Christian Courvoisier (1979) et à Sylvie Jay (1979), élèves de l'E.N.I.T.A., d'étudier la bioaccumulation de contaminants à court terme. Le présent travail aborde les problèmes de bioaccumulation à long terme en milieu contrôlé et de bioéchantillonnage au terrain.

PREMIÈRE PARTIE

PRESENTATION DES LOMBRICIENS ET DES CONTAMINANTS ETUDIES

I. LOMBRICIENS

1.1 Généralités
1.2 Rôle agronomique
1.3 Prédatisme des lombriciens

II. CONTAMINANTS ETUDIES

2.1 Cadmium
2.1.1 Origine
2.1.2 Cadmium dans la biosphère
2.2 Plomb
2.2.1 Origine
2.2.2 Plomb dans la biosphère
2.3 Mercure
2.3.1 Origine
2.3.2 Mercure dans la biosphère
2.4 Lindane
2.4.1 Lindane dans les sols
2.4.2 Lindane et végétaux
2.4.3 Accumulation sublétale par les animaux
2.4.4 Doses létales

PRESENTATION DES LOMBRICIENS ET DES CONTAMINANTS ETUDIES

Les contaminants étudiés sont au nombre de quatre. Ce sont trois métaux lourds, le cadmium, le plomb et le mercure et un insecticide, le lindane. Avant d'aborder l'étude elle-même, il nous paraît indispensable de présenter brièvement ces contaminants et les lombriciens.

I. LOMBRICIENS

Ce paragraphe, présentant les lombriciens, leur rôle agronomique et la prédation qu'ils subissent, répond aux deux questions suivantes :

- pourquoi ne faut-il pas que les lombriciens disparaissent de l'espace rural ?
- pourquoi leur contamination présente-t-elle un danger pour les chaînes alimentaires ?

1.1 Généralités

Si l'importance des vers de terre a été reconnue depuis longtemps (Darwin, 1881), la science n'étudie les lombriciens que depuis peu. Pourtant leur biomasse, comprise entre cinq cent kilogrammes et deux tonnes par hectare dans les sols cultivés, représente 60 à 80 % de la zoomasse et est du même ordre de grandeur que celle des micro-organismes (Bouché, 1972). Leur importance quantitative ne correspond pas à leur importance dans le cycle énergétique des écosystèmes. Dans l'écosystème prairial, seul 1 % de l'énergie fixée par photosynthèse est utilisé par les vers de terre (Macfadyen, 1961). Cette énergie puisée par les vers de terre est dégradée pour assurer leur croissance et leur reproduction, en un certain nombre de réactions physico-chimiques ayant des conséquences importantes sur le milieu.

1.2 Rôle agronomique

En prélevant le sol avec leur aliment, les lombriciens assurent un mélange de la matière organique et de la matière minérale dans leur tube digestif (Bouché, 1972).

Par géophagie, les espèces anéciques et endogées creusent des ga-

leries et ainsi régulent la porosité des sols (Bouché, 1972).

Par leur action synergique avec les micro-organismes, les vers de terre augmentent les processus microbiologiques des sols. Ils agissent sur le cycle de l'azote en augmentant la vitesse de minéralisation en favorisant la nitrification et la fixation d'azote atmosphérique (Bouché, 1972).

Par toutes ces actions, dont la liste ci-dessus n'est pas exhaustive, les vers de terre favorisent les processus d'humification et la création d'une structure favorable aux cultures. Ils effectuent un véritable labour biologique que l'agriculteur doit ménager. Si à court terme la destruction des vers de terre n'induit pas de problèmes culturaux (la dégradation de la structure est lente et la mort des lombriciens peut même favoriser immédiatement les cultures par apport d'azote et de matière organique) ; il n'en est pas de même à long terme. La structure se dégrade et ne peut être reconstituée qu'au prix de pratiques culturales toujours plus importantes et coûteuses.

1.3 *Prédatisme des lombriciens*

A côté de l'effet létal, la contamination de l'espace rural conduit les lombriciens à bioaccumuler les contaminants. Parcequ'ils sont la source d'aliments de nombreux prédateurs, ces contaminants sont transmis et parfois concentrés le long des chaînes biologiques.

Parmi les animaux prélevant dans la biomasse lombricienne, se trouvent les poissons dulçaquicoles (Bouché, 1972), les batraciens (grenouilles, crapauds, salamandres (Bachelier, 1963)), les mammifères (sangliers (Bouché, 1972), taupes (Plisko, 1961 ; Richarson, 1938), blaireaux (Bouché, comm. pers.), musaraignes (Richarson, 1938)), les chilopodes et les arthropodes (Satchell, 1955), les oiseaux.

Les oiseaux se nourrissant tout ou en partie de lombriciens sont la buse et la chevêche (Frochot, 1967), le milan royal et la cigogne noire (indiqués par le centre d'étude ornithologique de Bourgogne), de nombreux passereaux (grives, merles, rouges-gorges, étourneaux) et des corvidés (Bouché, 1972).

Les besoins journaliers de la mouette rieuse ont été évalués entre 150 et 200 g de poids frais couvrant 92,3 % de ses besoins énergétiques, pendant quatre mois (Cuendet, 1979).

Ces chiffres montrent le danger d'une contamination des lombriciens pour les chaînes alimentaires. Il est regrettable qu'il existe très peu d'études quantitatives de la prédation subie par les lombriciens.

II. CONTAMINANTS ETUDIES

2.1 Cadmium

2.1.1 ORIGINE

Présent dans la croute terrestre sous forme minérale à une concentration moyenne de 0,18 ppm (Lagerwerff, 1972), sa présence dans l'atmosphère est principalement due aux contaminations industrielles et agricoles.

Les producteurs de zinc, plomb, cuivre, les fonderies, les soudures, le grillage de minerai, la galvanisation et les acieries sont sources de 2000 tonnes de cadmium par an. Les industries produisant plastiques, batteries, colorants, alliages et engrais en émettent 20 tonnes par an (Nat. air poll. Cont. adm., 1970). Une quantité importante de cadmium provient de la combustion d'hydrocarbures par l'industrie et l'automobile (Gullvag, 1978). Aux U.S.A., l'émission totale de cadmium a été évaluée en 1968 entre 2 500 tonnes et 4 000 tonnes (Van Hook, 1974).

2.1.2 CADMIUM DANS LA BIOSPHERE

a) Généralités

Dans l'atmosphère, les concentrations les plus élevées ont été relevées dans les grandes villes (jusqu'à 0,350 µg par m^3 d'air) (Kopp et Kroner, 1970).

Les teneurs de cadmium dans les eaux vont jusqu'à 50 µg/l (Lagerwerff, 1972). Aux U.S.A., la teneur limite des eaux potables de 10 µg/l est souvent dépassée (Kopp et Kroner, 1970). Dans les eaux de mer, les concentrations de cadmium vont de 0,075 à 0,32 µg/l (Nat. air poll. contr.

adm., 1969).

De l'atmosphère, le cadmium arrive dans les sols par les précipitations. Il s'y ajoute celui provenant des phosphates, superphosphates et pesticides (Ross et Stewart, 1969). Les superphosphates contiennent de 50 à 170 ppm de cadmium (Barrows, 1966).

Aujourd'hui nous commençons à épandre des boues d'épuration qui contiennent de nombreux métaux lourds en particulier cadmium, zinc, cuivre et plomb.

Une application de boues de 5 tonnes par hectare (en matière sèche) serait à l'origine de 90 % de l'apport de cadmium, 8 % provenant de l'atmosphère et 2 % des fertilisants minéraux (Hansel et Tjell, 1978).

Les milieux à forte teneur en cadmium sont dangereux pour la vie humaine. Les conséquences physiologiques d'une intoxication au cadmium sont : emphysèmes, anémie, protéinurie, insuffisance rénale, hypertension, maladies cardio-vasculaires, cancers (Fasset, 1972). Il provoque de plus une déminéralisation osseuse (Tsuchiga, 1969) ou syndrome de "Itaï-Itaï".

b) Cadmium dans les sols et les plantes

Le cadmium est fixé dans les sols par les argiles (la fixation est fonction de leur structure), les sesquinoxides, les acides humiques, la fixation augmentant avec le pH (Van Hook, 1974). Mais la matière organique associée au cadmium semble se déstabiliser (Gomez et Juste, 1981).

L'absorption du cadmium par les plantes est fonction du type de sol si l'on tient compte du cadmium total mais indépendant du type de sol si l'on tient compte du cadmium échangeable (Dugast et Boudene, 1980).

La solubilité du sel de cadmium intervient aussi sur l'absorption du métal par les végétaux qui absorbent plus le chlorure, soluble, que le monoxyde insoluble (Van Hook, 1974).

c) Cadmium et lombriciens

La D.L. 50 d'*Eisenia fetida*, calculée sur artisol est de 813 ppm, *A. chlorotica* étant beaucoup plus fragile (Jay, 1979). Le sulfate de cadmium inhibe la reproduction à des concentrations inférieures à 0,1 ppm

(Newman et Buikema, 1975).

Les facteurs de concentration dans l'organisme des lombriciens varient entre 12,6 et 22,5 (Van Hook, 1974 ; Gish et Christensen, 1973) pour les espèces concentrant le cadmium, certaines espèces telle *E. tetraedra* ne le concentrant pas (Ireland, 1979).

2.2. Plomb

2.2.1 ORIGINE

La quantité de plomb provenant de sources naturelles est évaluée à 24 500 tonnes par an. L'érosion éolienne y participe pour 65,3 %, les feux de forêts pour 2 %, les particules volcaniques pour 26,1 %, les éxudats végétaux et d'hydrocarbures pour 6,5 % (Nriagu, 1979).

Depuis le XIXème siècle, l'homme a émis dans l'atmosphère 19,6 millions de tonnes de particules de plomb. Les activités sources de plomb sont :

Activités		Emission 10^6 kg/an	%
Mines de métaux non ferreux		8,2	1,8
Production primaire de métaux non ferreux	Cu	27	6
	Pb	31	6,9
	Ni	2,5	0,6
	Zn	16	3,6
Production secondaire de métaux non ferreux		0,8	0,2
Production de fer et d'acier		50	11,1
Applications industrielles		7,4	1,6
Combustion de charbon		14	3,1
Combustion d'huile et d'essence		273	61
Combustion de bois		4,5	1
Incinération d'ordures		8,9	2
Engrais phosphatés		0,1	0,02
Autres		5,9	1,3

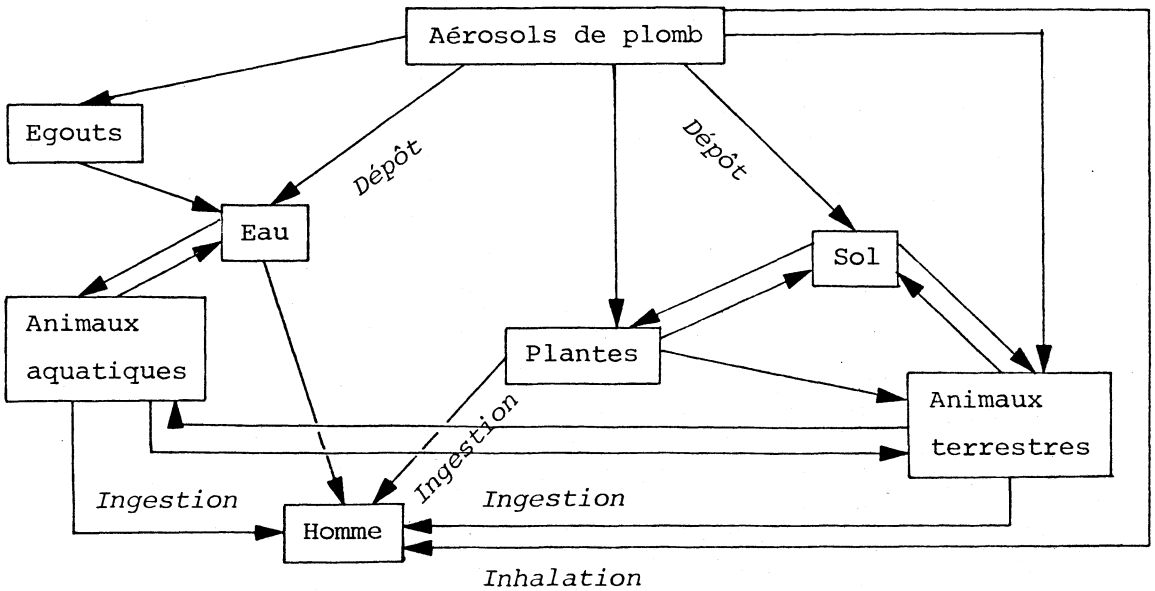
Sources et quantités de plomb émis en 1975 (Nriagu, 1979)

Plus de la moitié des particules atmosphériques de plomb provient de la combustion d'hydrocarbures car l'alkyl de plomb est un additif anti-détonnant de l'essence automobile ; une automobile rejette 1 kg de plomb par an (Ramade, 1977).

La composition chimique des particules atmosphériques de plomb est peu connue. Dans l'atmosphère urbaine, il est essentiellement sous forme de $(NH_4)_2SO_4PbSO_4$, avec $PbSO_4$ et PbBrCl comme constituants mineurs (Biggins et Harrison, 1978). Près des sources ponctuelles (fonderies, groupes générateurs, incinérateurs, ...) il est essentiellement sous forme d'oxydes, sulfates, sulfites et silicates (Nriagu, 1978). Près des points de forte concentration automobile, la forme alkyl domine (Harrison et Perry, 1977). En milieu urbain, l'alkyl de plomb représente entre 1 et 4 % du plomb total (Harrison et Perry, 1977) et en milieu rural entre 1 et 33 % car une fraction importante du plomb organique provient de la méthylation naturelle du plomb dans les sols (Harrison et Laxen, 1978).

2.2.2 PLOMB DANS LA BIOSPHERE

A partir de l'atmosphère, les aérosols de plomb sont disséminés dans les eaux et les sols et fixés par le réseau trophique. S'ajoutent au plomb provenant de l'atmosphère les impuretés des engrais et des pesticides : 7 à 92 ppm de plomb dans les superphosphates (Barrows, 1966).



Fixation des aérosols de plomb
par le réseau trophique d'après W.H.O., 1977

a) Effets du plomb sur l'homme

Des individus adultes normalement exposés renferment, principalement dans leurs os, 100 à 400 mg de plomb. Lorsqu'ils renferment une quantité supérieure de plomb, ils présentent les symptômes du saturnisme qui sont : le dérèglement du système nerveux (encéphalopathie chronique et aiguë), du système hématopoïétique, des reins et de la synthèse des globules rouges (anémie) (Goyer et Chisolm, 1972).

b) Plomb dans les sols

A cause de sa bivalence et de sa forte adsorption, la concentration des sols en plomb est plus élevée dans les horizons superficiels. La tendance des plantes à remonter le métal des horizons profonds par leur absorption radiculaire et à le déposer, accentue ce phénomène (Lagerwerff, 1972).

Le plomb fraîchement précipité, associé à des halogènes, est relativement soluble (Singer et Hanson, 1969), puis il se convertit en une matrice moins soluble en perdant les ions hydrogène et en s'associant à des ions SO_4^{--}, CO_3^{--}, PO_4^{---} et à la matière organique (Schnitzer, 1968), en particulier la solubilité des chélates est très faible.

La stabilité du complexe plomb - matière organique est fonction du pH comme l'indique le tableau suivant.

pH = 3,5								
Métal	Cu	Fe	Ni	Pb	Co	Zn	Mn	Mg
log K	5,78	5,06	3,47	3,09	2,04	1,73	1,47	1,23
pH = 5,0								
Métal	Cu	Pb	Fe	Ni	Mn	Co	Zn	Mg
log K	8,69	6,13	5,77	4,14	3,78	3,69	2,34	2,09

Valeurs de la constante de stabilité (log K)
des complexes organo-métalliques
D'après Schnitzer et Skinner, 1966-1967

L'augmentation du pH et de la quantité de calcium diminue la capacité physiologique des plantes à absorber le plomb, le calcium favorisant la formation du complexe organo-métallique (Van Hook, 1974).

c) Plomb et chaînon lombricien

Les lombriciens sont très tolérants vis-à-vis du plomb. Ils supportent de fortes doses (10 000 ppm sur artisol) sans mortalité (Jay, 1979). Ils peuvent renfermer jusqu'à 7 600 ppm en milieu fortement contaminé (3 600 ppm (Ireland et Richard, 1977 ; Ireland, 1975)). Cette fixation de plomb s'effectue principalement dans les chloragocytes et dans les épithéliums glandulaires, épidermiques et intestinaux (Gullvag, 1978 ; Ireland, 1975 ; 1976 ; Ireland et Richard, 1977 ; Wielgus et al., 1976).

Comme pour les végétaux, il existe une corrélation négative entre l'absorption du plomb par les lombriciens et la teneur en calcium du sol. Cette corrélation existe aussi pour le cuivre (Ireland et Wooton, 1976 ; Ireland, 1979). La fixation du plomb par les vers de terre est fonction de l'espèce : *D. rubida* concentre plus que *L. rubellus* et *E. tetraedra* plus que *D. venata* (Ireland et Richard, 1977 ; Ireland, 1979).

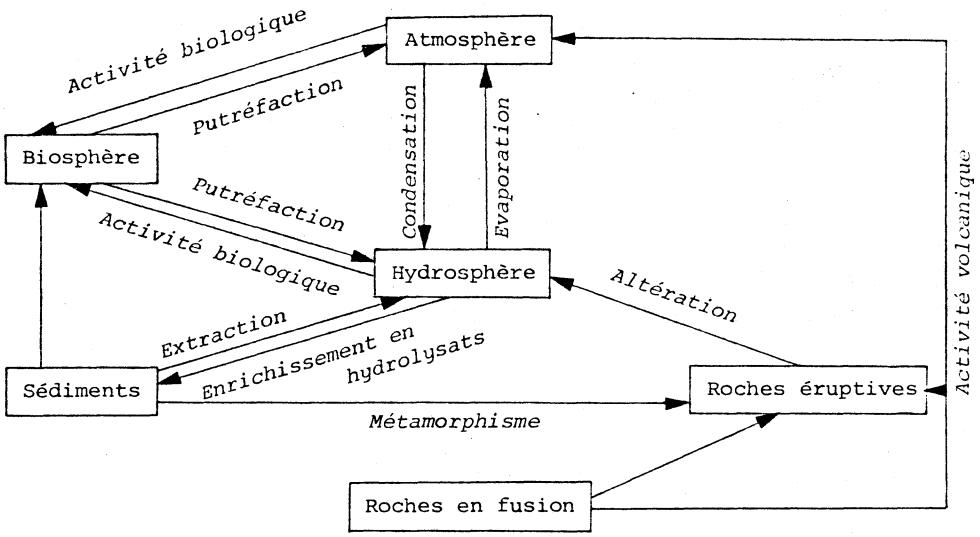
La contamination s'effectue au moins en partie par l'aliment. En effet des vers nourris par des bactéries polluées ont une teneur en plomb supérieure à celle de vers nourris par des bactéries saines (Patrick et Loutit, 1976).

2.3 *Mercure*

2.3.1 ORIGINE

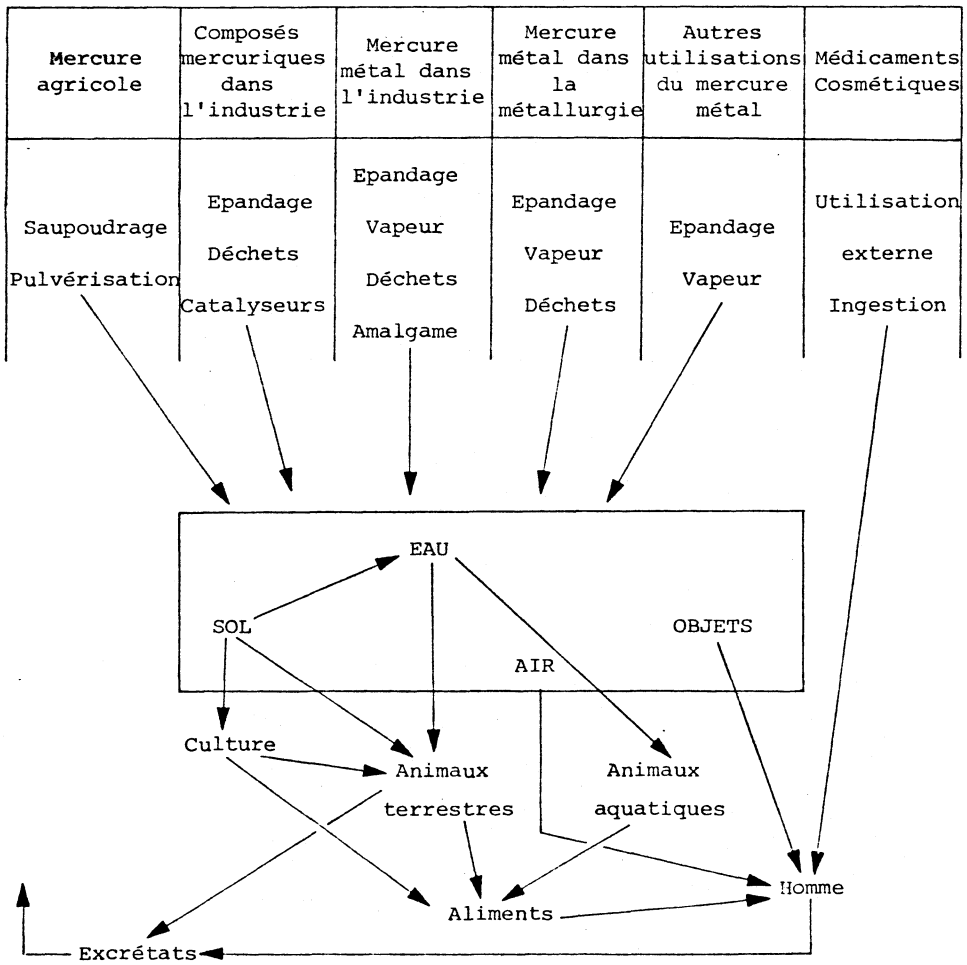
Deux cent trente tonnes de mercure sont libérées annuellement dans les océans par des processus géochimiques et 36 000 tonnes par évaporation naturelle (Lagerwerff, 1972) constituant une "pollution géochimique" (Joensuu, 1971). Le cycle écologique du mercure est représenté page 13.

La production mondiale de mercure est de plus de 7 000 tonnes par an dont 25 à 50 % sont répandus dans l'environnement (Klein et Goldberg, 1970). S'y ajoutent 3 000 tonnes dues à la combustion de charbon et de pétrole (Joensuu, 1971) : le charbon russe renferme 0,28 ppm et le pétrole américain de 1,9 à 21 ppm de mercure (Ramade, 1977).



Cycle écologique du mercure (D'après Rankama et Sahama, 1950)

L'impact de l'homme sur le cycle écologique du mercure peut se schématiser ainsi :



Impact de l'homme sur le cycle écologique du mercure

(D'après Lee)

2.3.2 MERCURE DANS LA BIOSPHERE

Le mercure métal est transformé en diméthyl mercure selon l'équation :

$$HgO \rightleftharpoons Hg^{++} \rightleftharpoons CH_3Hg^{+} \rightleftharpoons (CH_3)_2Hg$$

Jernelöv (1969) a mis en évidence la participation de bactéries benthiques à cette transformation. Le diméthyl mercure, très volatile, passe beaucoup plus facilement dans l'atmosphère que le mercure métal.

L'ion NO_3^- est un antagoniste de *Methanobacterium omelianskii*, bactérie participant à la méthylation du mercure, laquelle peut donc être prévenue (Barker, 1941). L'aération du sol est aussi un facteur prépondérant de cette méthylation, les bactéries étant anaérobies (Yamana, 1957).

a) Mercure dans le réseau trophique

Une relation étroite existe entre la teneur en mercure d'un être vivant et son niveau trophique. En Suède en 1960, faisans et perdrix se nourrissant de graines traitées par des fongicides organomercuriels renfermaient 6 ppm de mercure, des oiseaux strictement carnivores en renfermaient jusqu'à 60 ppm (Otterlind et Lenerstedt, 1966).

Cette concentration du mercure le long de la chaîne alimentaire provoque des accidents spectaculaires (Minamata). En effet, le mercure agit sur la division cellulaire en remplaçant des groupes -SH sur des protéines (Wojtalik, 1971) et est responsable de processus mitotiques anormaux (Skerfuing et al., 1970), ce qui se traduit par la déficience de la synthèse de l'hémoglobine (Wada et al., 1969), le développement anormal des foetus (Löfroth, 1969), la déficience du système nerveux central (Ramade, 1974).

b) Mercure dans les sols

La rétention du mercure est due à son adsorption sur la matière organique (Anderssen et Wiklander, 1965) et minérale et à la formation de composés organomercuriels. La faible solubilité des phosphates, carbonates et sulfites de mercure participe aussi à sa faible rétention dans les sols (Lagerwerff, 1972). L'accumulation du mercure dans les sols est en relation avec la quantité de carbone et de soufre organique (Lagerwerff, 1972). L'humus contenant du soufre est susceptible de transformer le mercure en une forme soluble. En condition de pH élevé, HgS insoluble peut être conver-

ti en Hg_2S soluble.

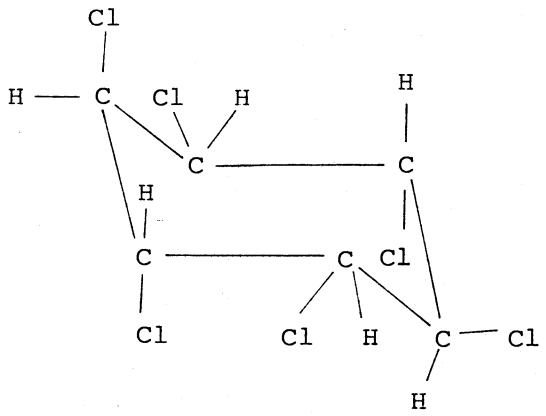
c) Mercure et lombriciens

La dose létale 50 % se situe à 150 ppm du poids sec pour *E. fetida*, entre 10 et 50 ppm pour *A. chlorotica* (établie sur artisol par Sylvie Jay).

Dans un sol contaminé à 3,8 ppm, *L. terrestris* renferme 8,6 ppm de mercure, par rapport au poids sec, la proportion de méthyl mercure augmentant à l'approche de la source de contamination (Bull et Roberts, 1977), ce qui indique que les processus de méthylation ne se produisent pas que dans les écosystèmes aquatiques.

2.4 *Lindane*

Stéréoisomère gamma de l'hexachlorocyclohexane, le lindane est utilisé pour ses propriétés insecticides. Il agit par contact, ingestion, inhalation (index phytosanitaire, 1980).



Le Lindane

2.4.1 LINDANE DANS LES SOLS

La persistance du lindane dans les sols est fonction du type de sol considéré. Les facteurs agissant sur la rétention du lindane sont le pourcentage de matière organique (Edwards et al., 1957) et le pourcentage d'argile (Swanson et al., 1954) qui augmentent la persistance du lindane en augmentant dans les sols ainsi que la capacité de rétention des argiles (Edwards et al., 1957) et la quantité de magnésium (Swanson et al., 1954).

La température, l'humidité, le végétal cultivé et les techniques culturales influencent la rétention des insecticides en général mais ces influences n'ont pas été démontrées dans le cas particulier du lindane.

Enfin, les avis sont partagés quant à l'influence du pH, Down (1951), Swanson et al. (1954), Fleming et Maines (1953) et Bollen (1958) soutiennent que le pH n'affecte par la persistance des insecticides dans les sols alors que Chawla et Chopra (1967), Hermanson et Forbes (1966) et Champion et Olsen (1971) soutiennent le contraire. Edwards (1973) pense que la persistance des insecticides en fonction du pH est différente selon leur catégorie en particulier que les organo-phosphorés sont plus sensibles au pH que les organo-chlorés.

Outre le fait que l'excès de lindane met en danger la vie des micro-organismes et des invertébrés du sol (Edwards, 1973), il compromet la fertilité des sols et la croissances des végétaux (Edwards, 1973). De plus il s'incorpore au réseau trophique.

2.4.2 LINDANE ET VEGETAUX

Après un traitement de 90 g/kg de semences,des radis contiennent 0,8 ppm à 28 jours et des navets de 51 jours 0,5 ppm de lindane (Purokoski, 1967).

2.4.3 ACCUMULATION SUBLETALE PAR LES ANIMAUX

Des poulets nourris avec un aliment contaminé à 10 ppm concentrent le lindane dans leurs graisses dont la teneur est de 21 ppm (Ware et Naber, 1961). Après vaporisation de lindane dans des poulaillers, des résidus ont été dosés dans les oeufs et les poussins (Holmes et al., 1969).

Les vers de terre concentrent eux aussi le lindane. Selon le type de sol et la catégorie écologique des lombriciens, le facteur de concentration varie entre 1,5 et 5 (Thompson, 1973).

2.4.4 DOSES LETALES

Dans les écosystèmes aquatiques, le lindane agit sur le phytoplancton qui présente une baisse d'activité de 29 % exposé 48 H à 1 ppm (Lowe, 1964), la CL 50 à 96 H de l'huitre est de 0,45 ppm, celle de la crevette à 48 H de 4.10^{-4} ppm (Lowe, 1964).

Une ppm baisse de 20 % le taux d'éclosion d'oeufs de truites en provoquant des anomalies morphogénétiques et est fatale aux alevins de poissons marins (Ramade, 1977).

La dose létale d'*E. fetida* calculée sur artisol est de 311 ppm (Courvoisier, 1979). Celle du rat, animal d'expérience qui approche la toxicologie humaine, est de 88 mg/kg de poids vif (Index phytosanitaire, 1980). Ce chiffre est à mettre en relation avec les teneurs relevées dans nos aliments (végétaux, poulets, ...).

DEUXIÈME PARTIE

MATERIEL ET METHODES

A - Expérience de laboratoire

I. ELEVAGES

1.1 Artisol
1.2 Lombriciens
1.3 Essais en sols naturels
1.4 Contaminants
1.5 Conditions d'élevage
1.6 Alimentation
1.7 Conduite de l'expérimentation

II. ANALYSE DES TENEURS EN CONTAMINANT

2.1 Préparation des échantillons
- 2.1.1 Cas du plomb et du cadmium
- 2.1.2 Cas du mercure
- 2.1.3 Cas du lindane

2.2 Analyse des contaminants
- 2.2.1 Principe de la spectrophotométrie d'absorption atomique
- 2.2.2 Pratique de la S.A.A.
- 2.2.3 Principe de la chromatographie en phase gazeuse
- 2.2.4 Pratique de la chromatographie
- 2.2.5 Modes de calcul

B - Prélèvements au terrain

I. CONTAMINATION INDUSTRIELLE DE SAINT-CYPRIEN

1.1 Généralités

1.2 Interprétation des résultats en notre possession

1.3 Prélèvements

II. UNE CONTAMINATION AGRICOLE

MATERIEL ET METHODES

A - Expérience de laboratoire

L'expérience de laboratoire a consisté à établir le rapport de bioaccumulation de lombriciens avec le temps dans un milieu contaminé dont nous contrôlons au maximum les facteurs. Ce milieu est l' "artisol", déjà utilisé pour des tests de toxicité et de bioaccumulation à court terme (voir introduction). Nous avons de plus tenté de savoir si le contaminant agit par son incorporation au substrat ou à l'aliment. Nous avons voulu aussi comparer l'artisol à trois sols typiques : un sol sableux, un sol limoneux, un sol argileux.

I. ELEVAGES

1.1 Artisol

Le sol artificiel ou "artisol" est composé d'une silice déshydratée nommée lévilite. Elle se présente sous forme de poudre, les particules ayant un diamètre de 5.10^{-6} mm. Après l'avoir séchée à l'étuve, nous ajoutons 240 % d'eau permutée. Cette quantité d'eau, établie empiriquement, s'est avérée correspondre au pF optimum de vie des lombriciens : 2,5 (Mazaud, 1979).

Après avoir mélangé à la main l'eau et la lévilite, nous ajoutons des billes de verre de diamètre 20 ± 1,5 mm en proportion de 452 % du mélange. Ces billes créent la porosité de l'artisol et permettent la circulation de l'air et des vers. Les boîtes d'élevage, en plastique, sont donc composées de : 90 g de lévilite sèche, 215 g d'eau, 1425 g de billes de verre.

Le mercure, le cadmium et le plomb sont incorporés à l'artisol en solution aqueuse, le lindane insoluble dans l'eau, directement à la lévilite. L'incorporation du lindane à la lévilite est effectuée au "turbula", agitateur tridimensionnel. Cet appareil permet d'effectuer un mélange homogène et surtout reproductible.

L'artisol est un immense progrès quant à notre maîtrise des fac-

teurs liés au sol. Il subsiste cependant quelques imperfections qui nous empêchent de maîtriser totalement tous les phénomènes.

Les billes de verre sont supposées chimiquement inertes ; or elles sont colorées et nous ne savons pas si le colorant ne peut pas migrer dans le milieu. Il peut aussi se produire des phénomènes d'adsorption sur la périphérie des billes. Le mélange de l'eau contaminée et de la lévilite s'effectue à la main. Il est possible que le contaminant chromatographie dans la lévilite lors du versement de l'eau, induisant une hétérogénéité de la contamination. Nous avons essayé de mélanger l'eau et la lévilite au turbula mais cela s'est avéré impossible.

Les boîtes d'élevage sont en plastique, matériau qui n'est pas chimiquement inerte.

Pour parfaire l'artisol, il faut donc trouver un récipient en un matériau chimiquement inerte et facilement manipulable et mécaniser le mélange. La mécanisation ne rend pas le mélange parfaitement homogène mais le rend reproductible.

1.2 Lombriciens

L'animal utilisé pour nos expériences est *Eisenia fetida andrei*. Espèce rare en milieu naturel, elle s'est adaptée aux tas de fumier et aux composts et est donc facilement récoltable. Espèce corticole épigée, elle ne rentre pas en diapause, ce qui la rend plus disponible qu'une espèce anécique ou endogée.

Eisenia fetida andrei se comporte dans l'artisol comme une espèce anécique. En effet elle explore la totalité du milieu contaminé.

Les animaux utilisés doivent être adultes, d'un poids supérieur à 300 mg et en "bonne santé". Ce critère est purement subjectif.

1.3 Essais en sols naturels

Nous avons voulu comparer les effets des propriétés physico-chimiques des sols. A cette fin, nous avons remplacé, dans les boîtes d'élevage, la lévilite par trois sols tamisés à 2 mm : un sol sableux de la plai-

ne de Saône, un sol limoneux de Cîteaux et un sol argileux de Darois. La composition des boîtes d'élevage est : 90 g de sol, 1425 g de billes et le volume d'eau nécessaire pour que le pF du sol soit égal à 2,5.

Ce volume d'eau est déterminé par une expérience préliminaire. Nous avons dû abandonner une partie des essais en sols naturels à cause des problèmes posés par cette détermination.

Nous avons d'abord calculé l'humidité des sols à pF 2,5 par pression sur membrane. Les résultats exprimés en pourcentage d'eau du poids sec sont :

- sol sableux : 4 %
- sol limoneux : 12 %
- sol argileux : 23 %

Nous avons mis les animaux en élevage dans les sols ainsi constitués et il s'est avéré qu'ils décédaient dans les sols sableux et limoneux.

Nous avons alors redéterminé l'humidité des sols par pression osmotique. Parceque l'appareil était utilisé par le laboratoire d'agronomie, nous avons déterminé l'humidité à pF 3. Les résultats sont :

- sol sableux : 6,3 %
- sol limoneux : 13,2 %
- sol argileux : 16,9 %

Compte tenu de la différence de pF ces résultats expliquent la mortalité observée en sols sableux et limoneux.

Ne pouvant recommencer l'expérience avec ces deux sols faute de temps, nous n'avons conservé que le sol argileux dont les caractéristiques sont données dans le paragraphe "Résultat de l'analyse du sol argileux".

Nous voulions aussi connaître l'influence de la contamination de la phase aqueuse. En effet, les concentrations de contaminants varient par rapport à la quantité d'eau du sol, puisque cette quantité d'eau, à pF constant, augmente du sol sableux au sol argileux alors que la quantité de contaminant est fixe. Nous avions donc préparé un sol sableux avec la dose de contaminant du sol argileux, exprimée par rapport au poids d'eau.

Cette expérience n'a pas abouti pour les mêmes raisons que la précédente.

Résultat de l'analyse granulométrique du sol "argileux"

		‰
Particules comprises entre	0,000 et 0,002 mm	284
	0,002 et 0,020 mm	425
	0,020 et 0,050 mm	220
	0,050 et 0,200 mm	40
	0,200 et 2,000 mm	31
Carbone organique, méthode Anne		7,8
Matière organique		13,4
Azote Kjeldahl		1,17
Rapport C/N	6,66	
pH eau	8	

1.4 *Contaminants*

Les métaux lourds sont incorporés en solution aqueuse sous forme de nitrate de plomb ($Pb(NO_3)_2$), de chlorure de cadmium ($CdCl_2$) et de chlorure de mercure ($HgCl_2$).

Les doses exprimées par rapport à la lévilite sèche sont de 1 ppm de cadmium et de mercure, 200 ppm de plomb. Elles ont été choisies selon plusieurs critères : elles sont analogues à des teneurs relevées dans la nature. Elles sont assez faibles pour ne pas induire de changements de comportement des lombriciens, à plus forte raison de mortalité.

Le lindane est incorporé directement à la lévilite à la dose de 10 ppm de principe actif. Il se présente sous forme de poudre, garantie à 90 % de lindane par le fabricant. Son nom commercial est lindafor 90 et il est fabriqué par Pépro.

1.5 *Conditions d'élevage*

Nous mettons en élevage 8 animaux par boîte. Ils sont auparavant lavés, séchés et pesés. Le couvercle de la boîte est percé pour favoriser l'aération.

Théoriquement, l'aération du milieu d'élevage est forcée par de l'air sous pression, à 100 % d'humidité. Pour des raisons pratiques, nous n'avons pas mis en place cette aération forcée. Il est possible que cette carence ait favorisé la mort de certains animaux.

Les boîtes sont placées dans des bacs "feralco" et baignent dans de l'eau qui sature l'air ambiant.

La salle d'élevage est maintenue à une température de 15 °C et à l'obscurité.

1.6 *Alimentation*

L'aliment choisi est du son de meunerie, tamisé entre 1 et 2 mm, stérilisé à 60 °C pendant 3 heures et conservé au dessicateur.

La quantité distribuée est 500 mg de son sec par boîte et par semaine, soit 62,5 mg par ver.

Dans l'expérience de bioaccumulation au cours du temps, l'aliment est contaminé à la même dose que le sol, c'est-à-dire respectivement à 1 ; 1 ; 200 et 10 ppm, exprimé par rapport au son sec, de cadmium, mercure, plomb et lindane. L'accroissement de la dose totale est de 5‰ par semaine, il est négligé. Les métaux lourds sont incorporés dans la phase aqueuse humidifiant le son, le lindane est mélangé à sec au turbula.

Afin de connaître l'influence de la contamination due à l'aliment nous avons constitué, par contaminant, une boîte de sol sain dans laquelle la totalité du contaminant est apportée par l'aliment. Les doses de contaminants sont, exprimées en ppm de son sec, respectivement de 15 ; 15 ; 3000 et 150 ppm de cadmium, mercure, plomb et lindane. Enfin est préparée une boîte de sol contaminé dans laquelle l'aliment apporté n'est pas contaminé.

Il est malheureusement apparu un biais dans cette expérience "aliment". Des mucors se sont développés sur le son, empêchant une consommation normale de l'aliment par les animaux. Le biais étant introduit, nous n'avons pas voulu augmenter son effet et avons continué à nourrir les animaux en supposant que leur niveau d'alimentation est resté suffisant pour leur survie.

Nous avons essayé de trouver des solutions au problème du développement des mucors sur l'aliment.

Dans une expérience parallèle, nous avons incorporé à l'aliment des fongicides, à la dose de 10 % de leur PPDS (la PPDS est la Plus Petite Dose Significative et est égale à la dose létale 5 %). Nous avons choisi quatre fongicides autres que des benzimidazoles qui agissent sur la cholinestérase et induisent des changements de comportement. Les quatre fongicides choisis sont le dazomet, à 5 ppm, le thiramme, à 10 ppm, le zirame, à 10 ppm et le cuivre à 20 ppm. A ces doses, exprimées par rapport au poids sec de son, seul le zirame empêche le développement de mucors.

Nous n'avons pas voulu augmenter les doses de peur de provoquer la mort d'animaux, une synergie entre le fongicide et le contaminant étudié ou un changement de comportement des animaux, en particulier alimentaire. En effet, même à la dose de 5 ppm, la consommation de son contaminé est faible ou nulle.

Le problème de l'alimentation est crucial ; nous apportons dans un milieu dont nous contrôlons au maximum les facteurs (température, humidité, aération...) un élément incontrôlé, ce qui va à l'encontre de nos objectifs. Il faut donc trouver un aliment standardisé qui ne favorise pas le développement de micro-organismes.

1.7 *Conduite de l'expérimentation*

Une boîte est prélevée par semaine et par contaminant, les animaux lavés, égouttés, pesés et congelés en vue de leur analyse ultérieure. Les prélèvements des expériences "sol" et "aliment" s'effectuent avec le dernier prélèvement de l'expérience "bioaccumulation au cours du temps", au bout de 12 semaines.

Pour des raisons de calendrier d'utilisation du chromatographe en phase gazeuse, la bioaccumulation au cours du temps du lindane a été étudiée sur 11 semaines.

II. ANALYSE DES TENEURS EN CONTAMINANT

2.1 Préparation des échantillons

Les vers sont décongelés, ouverts longitudinalement d'arrière en avant, face ventrale. Un rinçage à l'eau permutée assure l'élimination du contenu du tube digestif qui fausserait les résultats. Les vers sont alors égouttés, répartis en deux échantillons qui sont pesés.

2.1.1 CAS DU PLOMB ET DU CADMIUM

Les échantillons sont desséchés à l'étuve pendant 24 heures à 105 °C. La matière sèche est minéralisée après pesée. La minéralisation s'effectue à chaud (au bain de sable) par les acides chlorhydrique et nitrique concentrés (0,5 ml de chaque) avec 2,5 ml d'eau distillée. Nous ajoutons quelques billes de verre qui évitent les projections. Pendant la minéralisation, nous conservons le volume constant en ajoutant de l'eau distillée au minéralisat. La minéralisation est terminée lorsque le minéralisat est jaune clair et limpide. Après filtration sur filtre sans cendre,l'échantillon est ramené à un volume connu (10 ml en général) par adjonction d'eau distillée.

2.1.2 CAS DU MERCURE

La minéralisation s'effectue sur la matière fraîche, la dessication à l'étuve risquant de vaporiser une partie du mercure. L'acide sulfurique concentré (5 ml) commence la minéralisation pendant une demi-heure au bain-marie bouillant. Après passage au bain de glace et à la température ambiante (1/2 h) nous recommençons l'opération. Après refroidissement, 5 ml de permanganate de potassium à 6 % sont ajoutés, le mélange chauffé au bain-marie jusqu'à ébullition, refroidi, transvasé dans une fiole jaugée et nous y ajoutons 5 ml de chlorhydrate d'hydroxylamine à 10 % qui décolorent le minéralisat, lequel est ramené à 50 ml en complétant par de l'eau distillée. Le mercure se trouve alors sous forme de sulfate mercurique.

2.1.3 CAS DU LINDANE

Nous utilisons deux solvants. L'acétone, miscible à l'eau et l'hexane dans lequel le lindane est soluble.

L'échantillon de vers décongelés est broyé à l'"ultraturax" avec 10 cm^3 de chaque solvant pendant une demi à une minute. Nous filtrons le mélange sur un Büchner muni d'un papier filtre et d'une couche d'hyflosupercel d'environ 1 cm. L'opération (broyage et filtration) est recommencée avec l'échantillon recueilli, le filtre et l'hyflosupercel. Les deux filtrats sont transvasés dans une ampoule à décanter, nous y ajoutons environ 100 cm^3 d'eau salée à 2 %. Après une légère agitation, nous recueillons la phase hexane surnageante en la filtrant par de la laine de verre et du sulfate de soude anhydre. A la phase aqueuse préalablement prélevée, nous ajoutons 20 ml d'hexane. Après une agitation vigoureuse d'une minute, le second extrait hexanique est ajouté au premier selon le même procédé. L'ajustement à un volume connu (100 ml) s'effectue avec de l'hexane.

2.2 *Analyse des contaminants*

Les métaux lourds sont dosés au spectrophotomètre d'absorption atomique, le lindane au chromatographe en phase gazeuse.

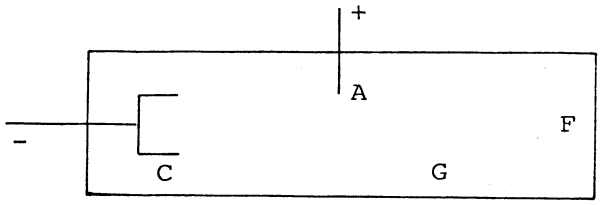
2.2.1 PRINCIPE DE LA SPECTROPHOTOMETRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE (PINTA ET AL., 1971)

Le fondement de la spectrophotométrie d'absorption atomique est la loi de Kirchhoff établie en 1859 : << tout corps chimique peut absorber les radiations qu'il émet lui-même dans des conditions déterminées >>.

L'élément à doser se présente sous forme d'une combinaison chimique. Cette combinaison doit être dissociée pour amener l'élément sous forme d'un gaz d'atomes libres. La dissociation peut être thermique et s'effectue alors dans une flamme ou un four, ou chimique. Après la dissociation, pratiquement tous les atomes sont dans leur état électronique fondamental. Ces atomes absorbent individuellement, photon par photon, les radiations émises par une cathode creuse et passent à un état électronique supérieur. La cathode creuse émet la raie d'émission dont la longueur d'onde coïncide exactement à celle de la raie à absorber puisque l'élément est introduit

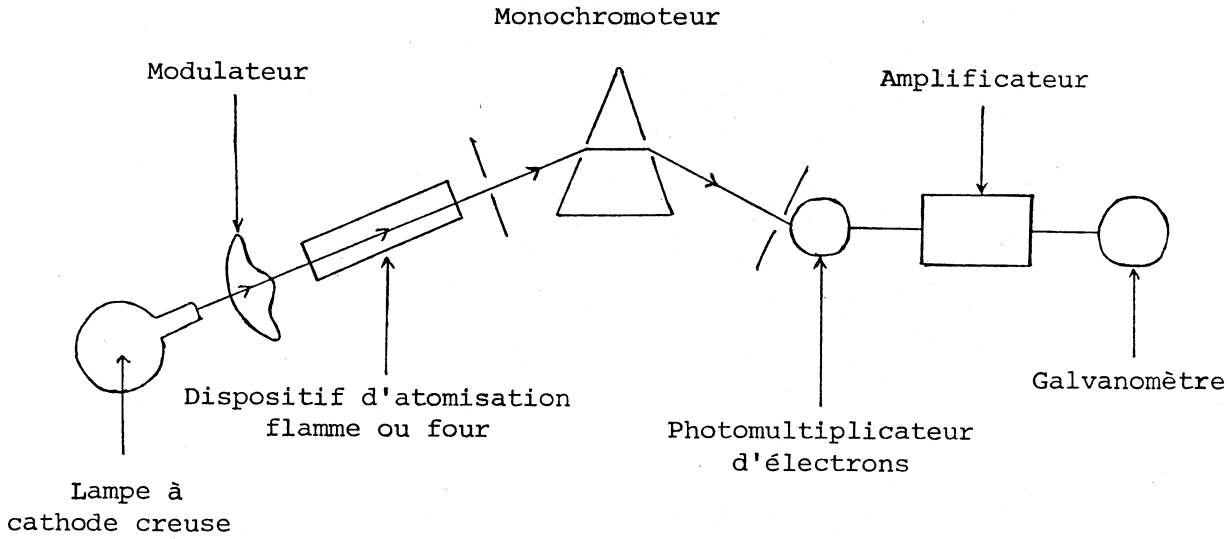
dans la cathode même.

Une tension suffisante entre l'anode et la cathode provoque une décharge dans le gaz porteur qui bombarde la cathode et pulvérise l'élément qui se gazéifie. Les atomes du gaz, eux-mêmes bombardés par des ions ou des électrons passent à un état excité. Ils émettent les raies caractéristiques de leur spectre en retournant à l'état fondamental.



A : Anode
C : Cathode creuse
F : Fenêtre transparente
G : Gaz porteur (hélium, néon ou argon)

Schéma d'une cathode creuse scellée



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

Les atomes de l'élément à doser étant passés à un état électronique supérieur, il y a absorption de l'énergie incidente. En mesurant l'énergie non absorbée, on déduit la quantité de l'élément à doser. Le système récepteur est un photomultiplicateur d'électrons associé à un amplificateur. Le système de lecture est un galvanomètre qui peut être relié à un enregistreur.

Une lampe au deutérium permet de corriger la mesure de l'influence des absorptions non spécifiques. Le modulateur envoie alternativement le faisceau issu de la cathode creuse et le faisceau issu de la lampe au deutérium. Les deux faisceaux sont ensemble décomposés par le sélecteur de radiations. Le faisceau issu de la cathode creuse est atténué par l'absorption totale alors que le faisceau issu de la lampe au deutérium n'est atténué que par les absorptions non spécifiques, car sa largeur spectrale est très grande. La différence mesure les absorptions spécifiques recherchées.

2.2.2 PRATIQUE DE LA S.A.A.

a) Cas du plomb et du cadmium

Vingt microlitres de l'échantillon sont introduits dans le four (Perkin-Elmer). Ont été préalablement fixées sur un programmateur de la même marque les caractéristiques suivantes :

		Température	Temps de montée en température	Temps de température
Volatilisation du solvant	Cd	100	10	30
	Pb		1	
Calcination	Cd	350	10	30
	Pb	500	1	
Atomisation	Cd	1900	0	10
	Pb	1100		

Les autres réglages optiques sont :

	Longueur d'onde (nm)	Ouverture de la fente	Temps d'intégration	Mode opératoire
Pb	253,7	5 - 6	4 s	Integrate Memory continuous
Cd	228,8	10 - 11	4 s	Integrate Memory continuous

b) Cas du mercure

L'atomisation du mercure est chimique. Dix millilitres de l'échantillon sont dilués dans autant d'eau distillée en présence de trois millilitres d'acide sulfurique à 45 % (V/V). Le mélange s'effectue dans la cuve de réaction où arrive, grâce à une pompe péristaltique, du borhydrure de sodium à 3 % stabilisé par de la lessive de soude. Le borhydrure de sodium et l'acide sulfurique réagissent pour former de l'hydrogène naissant.

$$2NaBH_4 + H_2SO_4 + 10H_2O \longrightarrow 2H_3BO_5 + Na_2SO_4 + 24H$$

L'hydrogène réduit le sulfate mercurique :

$$Hg^{++}SO_4^{--} + 2H \longrightarrow Hg + H_2SO_4$$

Les atomes de mercure sont entraînés par de l'argon dans une cellule à quartz où ils absorbent l'énergie issue de la cathode creuse.

Les réglages optiques sont :

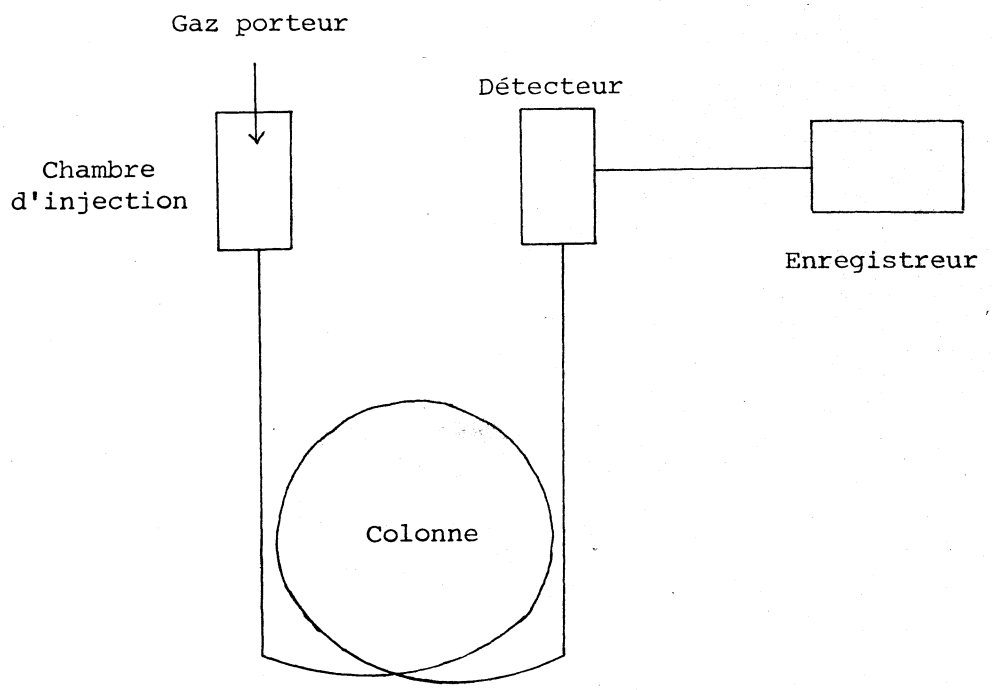
- longueur d'onde : 253,65 nm
- ouverture de la fente : 7
- mode opératoire : mesure en continu

2.2.3 PRINCIPE DE LA CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

La substance à chromatographier est introduite dans l'injecteur avec son solvant où le tout se vaporise.

Le gaz porteur entraîne les produits vaporisés vers le détecteur à travers une colonne remplie d'une phase stationnaire. Les produits injectés arrivent au détecteur séparés, le temps de passage dans la colonne dépendant de leur affinité pour la phase stationnaire.

Le détecteur est constitué d'une cathode radio-active émettant des particules qui arrachent les électrons périphériques des atomes des gaz présents dans la chambre du détecteur. Ces électrons sont captés par l'anode et induisent un courant électrique. L'anode est reliée à un galvanomètre et à un enregistreur.



Principe de la chromatographie en phase gazeuse

2.2.4 PRATIQUE DE LA CHROMATOGRAPHIE

Cinq millilitres d'hexane contenant le lindane dissous sont introduits dans l'injecteur chauffé à 220 °C. Le mélange de méthane-argon (gaz porteur) traverse la colonne (type O.V. 210) chauffée à 180 °C. Le détecteur est à 300 °C. Le système d'enregistrement permet de visualiser les pics de toutes les substances présentes. Il indique aussi l'instant de sortie des substances, ce qui permet de les identifier et la surface du pic, en unités arbitraires.

2.2.5 MODES DE CALCUL

Dans tous les cas, avant de doser les échantillons, nous dosons une gamme d'étalonnage de concentration connue. Cette gamme permet de connaître la réponse de l'appareil pour les réglages effectués. A partir des 4 ou 5 points de la gamme sera établie la courbe d'étalonnage, une droite, grâce à laquelle nous déterminerons la concentration de nos échantillons.

Chaque échantillon est dosé deux fois, la différence entre les valeurs trouvées étant dues aux variations de volume d'échantillon intro-

duit. Si les valeurs diffèrent significativement, nous effectuons une troisième détermination. La concentration de l'échantillon est la moyenne arithmétique des 2 ou 3 valeurs déterminées.

La concentration des vers, exprimée en ppm du poids sec est déterminée par la formule :

$$C_e = \frac{C_s \; V \; f}{MS}$$

C_e : concentration des vers de l'échantillon (ppm)
V : volume de la solution dosée (ml)
C_s : concentration dans la solution (ppm ou γ/ml)
f : facteur de dilution
MS : matière sèche de l'échantillon (g).

Dans le cas du lindane et du mercure, l'extraction du contaminant s'effectuant sur la matière fraîche, nous ramenons au poids sec par le coefficient 0,15.

La fixation de métaux lourds, exprimée en nanomoles par gramme de poids frais est :

$$F = \frac{C_s \; V \; f}{MM \; MF} \; 10^3$$

MM : masse molaire du métal (g)
MF : masse de la matière fraîche après dissection (g).

Nous avions réparti les animaux de chaque milieu d'élevage en 2 échantillons, les variations entre eux étant dues aux variations de teneur des animaux et aux variations dues aux manipulations antérieures aux dosages (en particulier la minéralisation).

Pratiquement, nous n'avons pas toujours obtenu deux valeurs car dans certains cas, nous disposions de trop peu de matière fraîche pour fabriquer deux échantillons, dans d'autres cas des erreurs de manipulation dues à l'inexpérience ont conduit à l'élimination d'un de ces deux échantillons.

B - Prélèvements au terrain

I. CONTAMINATION INDUSTRIELLE DE SAINT-CYPRIEN

1.1 Généralités

Autour de l'établissement Bourgier-Otto Lazar (St-Cyprien, Loire) de nombreux moutons sont morts, présentant des symptomes de saturnisme. L'autopsie de ces animaux a mis en évidence << des lésions non spécifiques du tube digestif, ces lésions pouvant être attribuées à l'ingestion d'un produit caustique ou à un phénomène infectieux >>. L'analyse toxicologique a trouvé dans le foie et les reins de deux animaux respectivement 25 et 70 ppm de plomb pour l'un, 140 et 800 ppm pour l'autre. L'intoxication au plomb était confirmée.

Devant ces résultats, les agriculteurs (éleveurs, maraîchers) et leurs syndicats se sont inquiétés et ont provoqué la mise en place d'autres protocoles d'analyse. Les résultats sont résumés dans les trois "plans-tableaux" suivants.

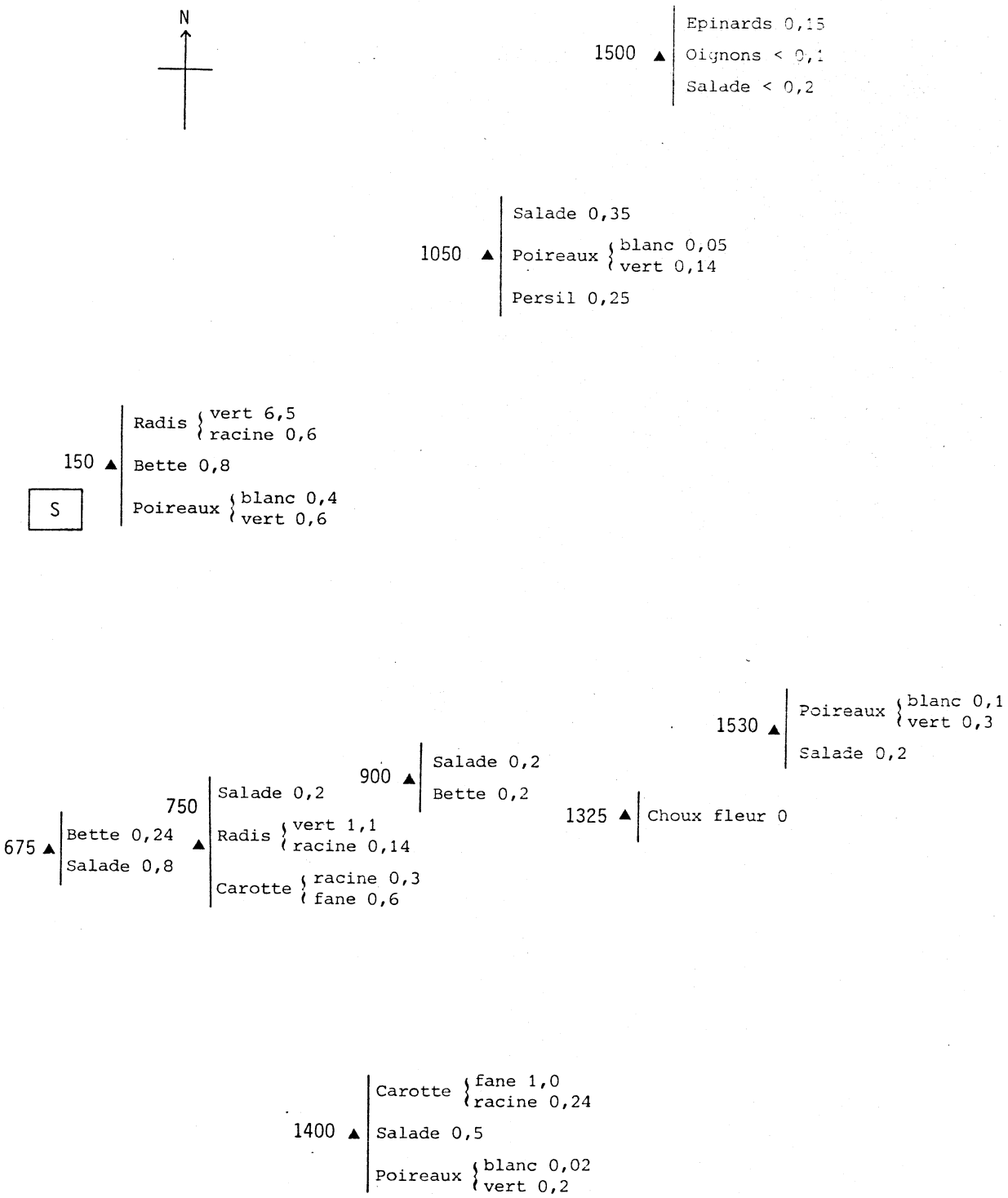
1.2 Interprétation des résultats en notre possession

Les résultats semblent être difficilement comparables de laboratoire à laboratoire et pour un même laboratoire pour deux dates de prélèvements (comparaison de T_1 et T_2, H_1 et H_2).

En tenant compte de ces deux restrictions, nous pouvons tirer certaines conclusions.

La contamination va décroissant en s'éloignant de la source et devient négligeable au delà de 1500 m. Elle est dépendante des vents dominants (nord et nord-ouest). La teneur en plomb est plus importante au sud de l'usine qu'au nord, mais dans un rayon assez faible : une centaine de mètres. La différence s'atténue ensuite. Ce phénomène est moins sensible que nous ne le pensions.

Les parties aériennes des végétaux sont beaucoup plus contaminées que les parties souterraines, jusqu'à dix fois plus, confirmant la contamination essentiellement atmosphérique.

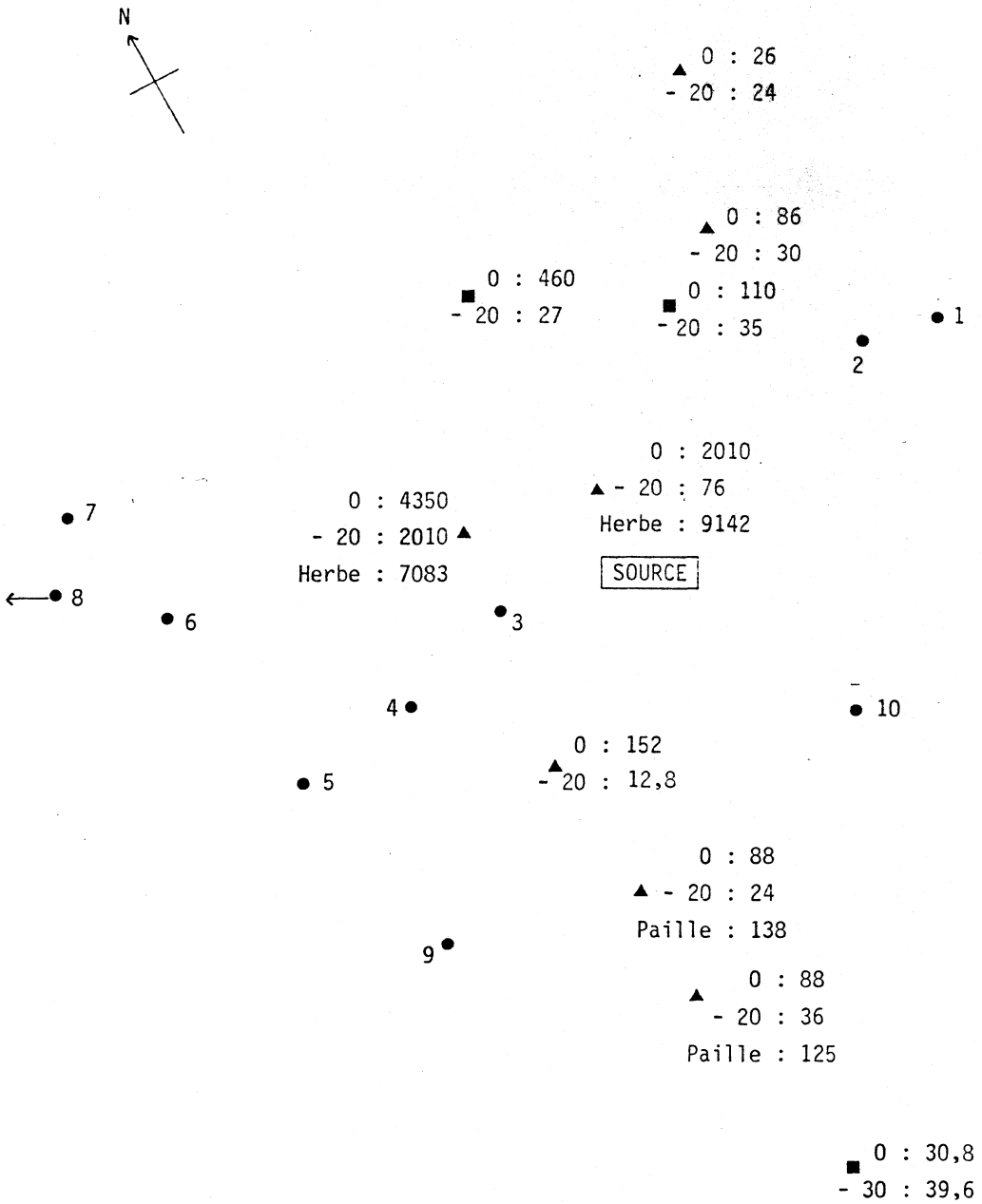


Teneur en plomb des légumes (ppm/MS)
déterminée par le Ministère de l'Agriculture

S : Source

Echelle : ⟷ 100 m

X▲ : Prélèvement à X mètres de la source de contamination



Teneur en plomb du sol (ppm)

Prélèvements et analyses effectués par le laboratoire d'analyses et de recherches médicales et industrielles de Saint-Etienne

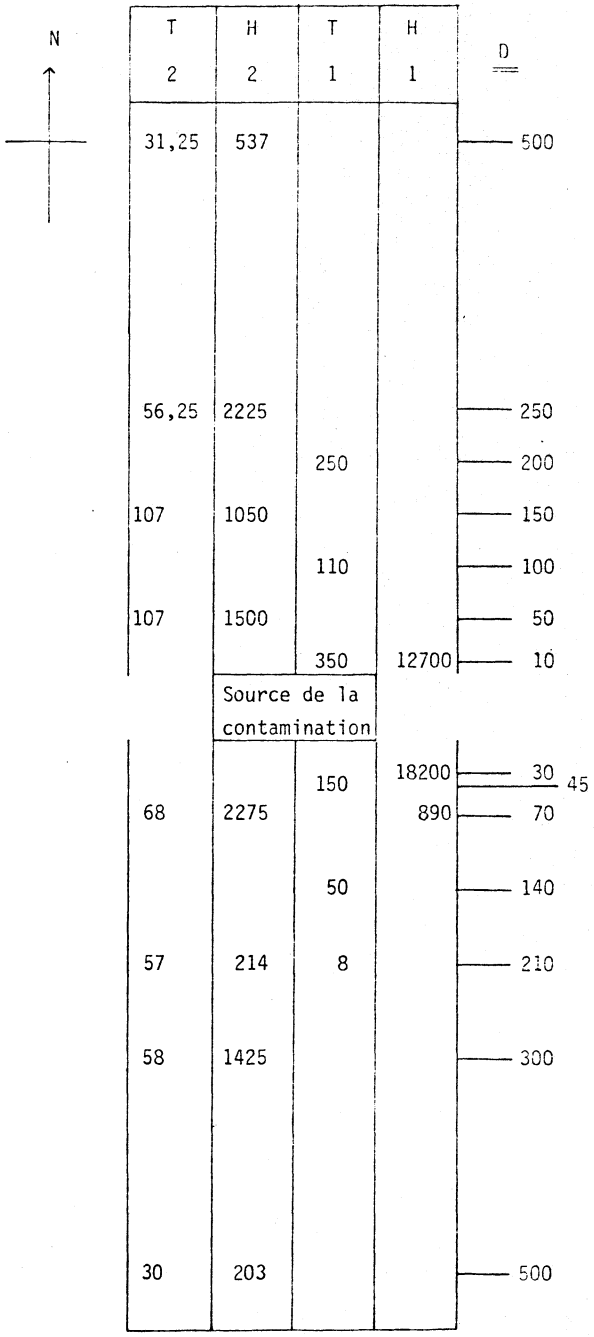
▲ : le 28.10.1980

■ : le 17.11.1980

▲ $^{\alpha}_{\beta}$: teneur en plomb du sol ; α,β : profondeur du prélèvement (cm)

Echelle : 1/2100 ⟷ : 21 m

● : de 1 à 10, numérotation de nos prélèvements



Dosages effectués par l'ENV de Lyon
(teneur en ppm/MS)

T : Terre

H : Herbe

1 : le 11.4.1980

2 : le 24.4.1980

D : distance à la source

Les primeurs semblent moins sensibles à la contamination au plomb que l'herbe fourragère.

L'absorption du plomb par les moutons s'effectue principalement par l'herbe mais aussi par l'eau (0,12 mg/litre). Une importante proportion de plomb est recyclée ; les fèces des moutons renferment jusqu'à 50 ppm de plomb.

Il est impossible de connaître exactement le facteur de concentration des végétaux car les prélèvements de terre et de végétaux ne sont pas effectués au même endroit. Là où c'est le cas, le facteur de concentration entre le sol et l'herbe varie de 4 à 40.

Ce rapport entre la concentration du sol et celle du végétal n'a pas beaucoup de signification car nous ne connaissons pas la part de la contamination due au sol et celle due aux retombées atmosphériques interceptées par la partie aérienne du végétal. Nous connaîtrions ces parts respectives en effectuant des analyses séparées de la partie aérienne et de la partie souterraine, en négligeant les migrations de contaminants à l'intérieur du végétal, migrations qui existent (Dugast et Boudène, 1980).

La contamination par le cadmium a été négligée. Nous savons seulement que l'eau à proximité de l'usine en contient 0,17 mg/l, teneur du même ordre de grandeur que le plomb.

1.3 *Prélèvements*

Les prélèvements sont effectués à la bêche et nous recueillons un échantillon du sol et la faune lombricienne présente. Celle-ci est conservée dans des flacons d'eau formolée à 4 %. Les lombriciens ne se déplaçant pratiquement pas dans le plan horizontal, ce mode de prélèvement permet d'obtenir un échantillon de la faune lombricienne et son milieu.

La quantité de vers de terre obtenue est faible en raison de la contamination qui a certainement décimé les peuplements ; de la date de prélèvement tardive (9 juin), certains animaux sont déjà entrés en léthargie ; de la grande quantité d'eau dans le sol qui ne favorise pas des peuplements importants.

Dix points ont été prospectés (voir plan "Teneur en plomb du sol").

Les échantillons de terre sont analysés au laboratoire de Monsieur Juste (I.N.R.A. Bordeaux).

Nous déterminons, pour chaque espèce de lombricien, la catégorie d'âge à laquelle l'individu appartient : larve, sub-adulte ou adulte.

La teneur des vers est déterminée au spectrophotomètre d'absorption atomique selon le procédé décrit au § A-2.2.1. Lorsque la masse de matière fraîche est suffisante, nous minéralisons deux échantillons. Autrement nous ne disposons que d'une valeur pour chaque contaminant : plomb et cadmium.

Les caractéristiques des points de prélèvements sont résumés dans le tableau suivant.

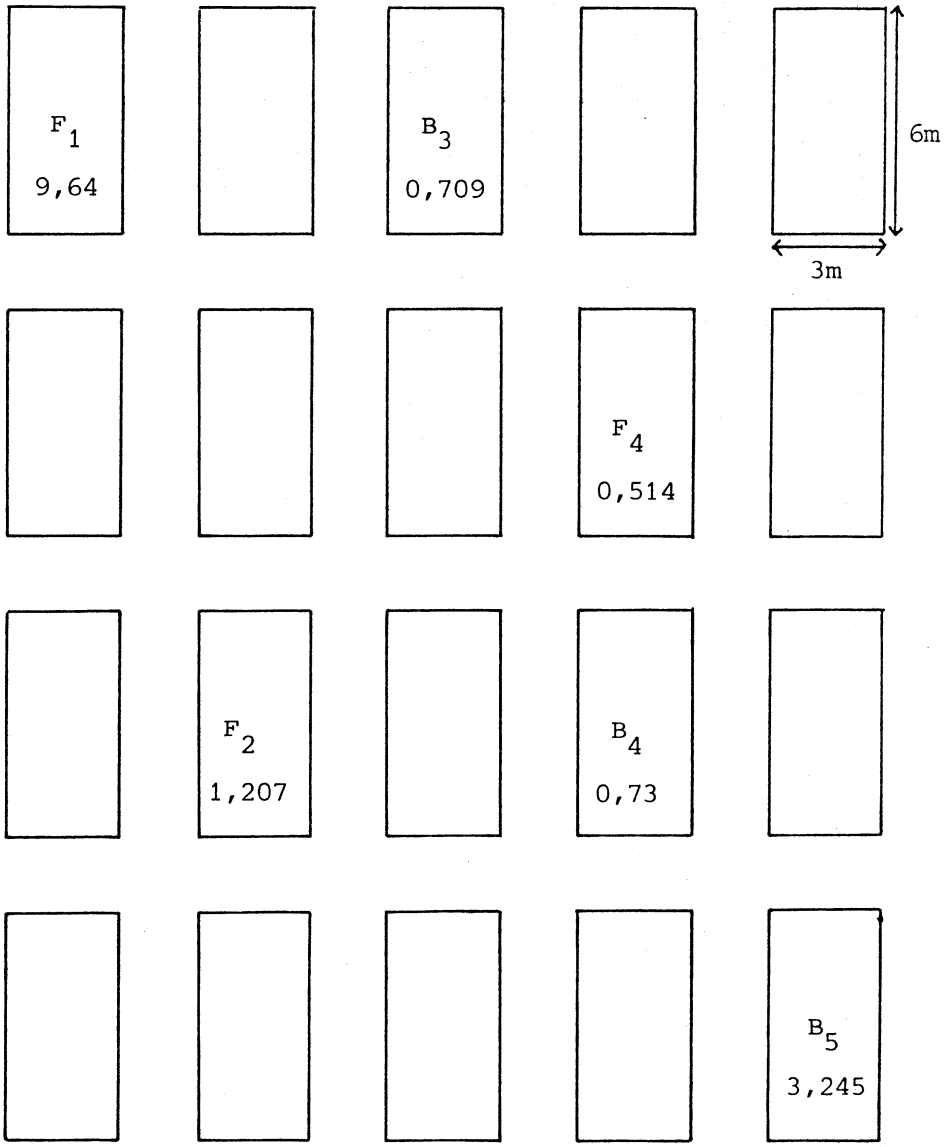
Prélèvement	Orientation	Distance à la source de pollution (m)	Végétation	Biomasse (1) lombricienne prélevée (g)
1	Est	150	Herbe	9,726
2	Est	125	Allée herbeuse	10,053
3	Ouest	40	Terrain nu Bord de jardin	1,375
4	Ouest	85	Herbe et genêts	0
5	Ouest	125	Herbe et genêts	6,931
6	Nord-ouest	160	Herbe. Bord de champ d'avoine	10,037
7	Nord-ouest	220	Prairie	9,008
8	Nord-ouest	250	Bord de chemin herbeux	4,729
9	Sud-ouest	140	Haut de raie de labour herbeux	10,725
10	Sud-est	125	Haut de raie de labour herbeux	4,768

(1) : biomasse exprimée en grammes de matière fraîche.

II. UNE CONTAMINATION AGRICOLE

Sur trois parcelles a été épandu du fumier, sur trois autres des boues d'épuration. Des échantillons de vers ont été récoltés et analysés, toujours selon les mêmes méthodes et pour les mêmes contaminants : plomb et cadmium. Le végétal cultivé sur ces parcelles est du maïs.

Le dispositif expérimental est le suivant :



F : Fumier

B : Boues

X : Biomasse prélevée

Depuis 1976, les parcelles F (fumier) ont reçu 50 tonnes de matière sèche par hectare.

Les parcelles B (boues) ont reçu depuis la même date 10 tonnes par an et par hectare de matière sèche de boues soit au total 50 tonnes par hectare de matière sèche.

L'apport de boues est l'équivalent d'un apport total de 37 kg par hectare de plomb et de 99 kg de cadmium.

La teneur des sols est déterminée par une extraction à l'acide chlorhydrique N/10 à froid, extraction incomplète. Seulement une fraction des métaux présents dans le sol, variable avec la nature du métal, est extraite. Cette fraction représente 50 à 70 % de la quantité totale de métal.

TROISIÈME PARTIE

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

A - Expérience de laboratoire

I. BIOACCUMULATION AU COURS DU TEMPS

1.1 Résultats

1.2 Phénomènes pouvant expliquer ces résultats

1.2.1 Phénomènes liés à l'animal

1.2.2 Phénomènes liés au sol

1.3 Autre expression des mêmes résultats

II. EXPERIENCE "MODE D'APPORT DU CONTAMINANT"

III. EXPERIENCE "INFLUENCE DU SOL"

IV. CONCLUSION PARTIELLE

B - Prélèvements au terrain

I. RESULTATS DE ST-CYPRIEN

1.1 Résultats bruts

1.2 Interprétation

1.2.1 Plomb

1.2.2 Cadmium

1.2.3 Interaction

II. CONTAMINATION AGRICOLE

2.1 Résultats bruts

2.2 Interprétation

III. CONCLUSION PARTIELLE

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

A - Expérience de laboratoire

I. BIOACCUMULATION AU COURS DU TEMPS

1.1 Résultats

Les résultats de la bioaccumulation sont consignés dans le tableau A et les 4 graphes suivants (p. 44, 45, 46, 47, 48).

Il faut d'abord noter les écarts parfois importants des deux valeurs d'un même échantillon.

Les valeurs isolées sont plus sujettes à caution, en particulier les semaines 6 et 7 du lindane, les semaines 8 et 10 du mercure qui s'insèrent mal dans l'allure générale de la courbe.

Le cadmium et le mercure sont concentrés par les animaux : le rapport de la concentration des vers et du sol est supérieur à 1. Le plomb ne l'est pas : le rapport est à peu près égal à 0,1. Le lindane l'est fortement dans les premiers temps, le rapport croît jusqu'à 25, et subit ensuite une déconcentration importante : le rapport décroît jusqu'à 0,3.

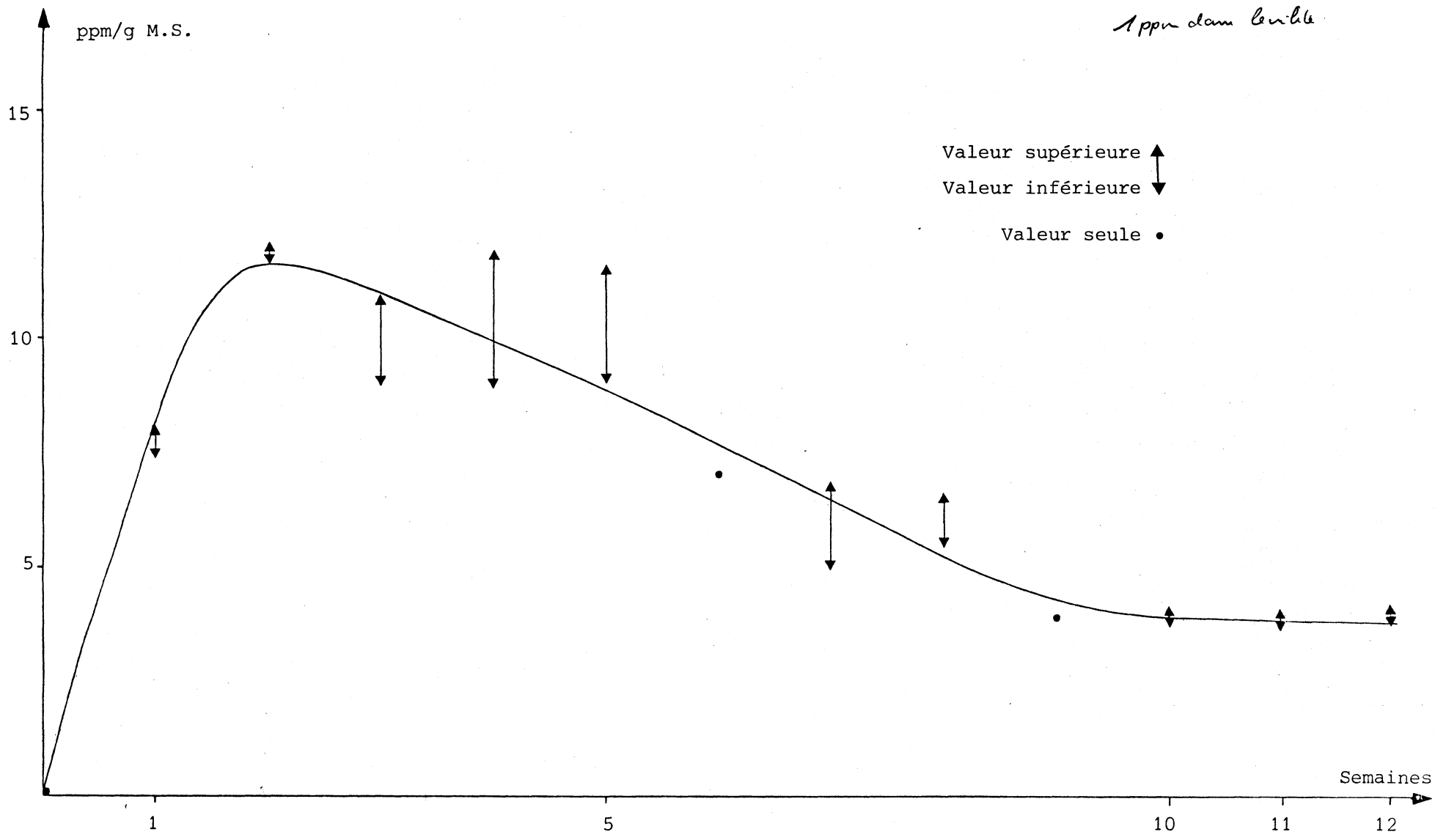
Les courbes présentent une phase ascendante pendant les deux premières semaines, un maximum à 2 semaines, une phase de décroissance différente selon le contaminant. Celle du lindane présente une forte pente alors que celle du cadmium en présente une faible. Pour ces deux contaminants, la phase de décroissance s'arrête vers la huitième semaine. Les phases de décroissance du mercure et du plomb sont beaucoup plus courtes : respectivement de la deuxième à la quatrième semaine et de la deuxième à la troisième.

Nous nous sommes demandé si, après cette phase descendante, il existe un plateau, c'est-à-dire une portion de la courbe que l'on puisse considérer comme une droite horizontale.

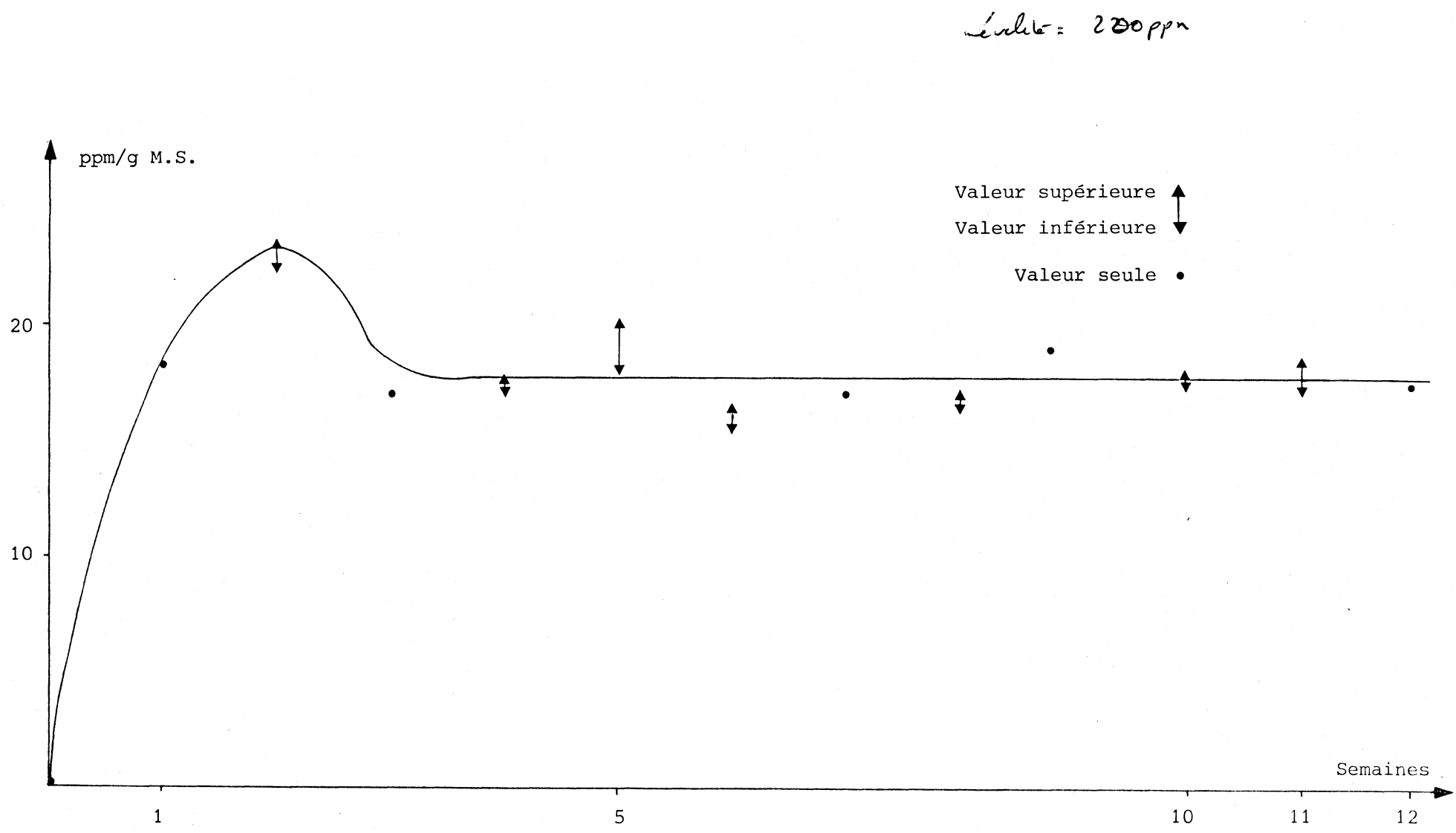
Pour cela, nous avons calculé l'intervalle de confiance de la pente de la droite composée des valeurs des dernières semaines d'un contaminant donné.

S \ C	Lindane	Cadmium	Plomb	Mercure
1	176,70 170,60	8,00 7,53	18,35	5,39 7,17
2	265,70 242,30	11,82 12,03	23,52 22,50	7,14 6,47
3	212,50 180,00	10,91 9,04	17,03	5,51 4,28
4	110,00 121,00	11,84 9,52	17,61 17,19	3,29 4,29
5	69,70 83,50	11,06 9,19	20,08 18,03	3,95
6	91,50	7,05	16,51 15,72	4,24 3,21
7	70,80	5,05 6,81	18,23	3,23 3,48
8	3,56 3,00	5,49 6,63	17,57 16,00	1,45
9	2,40 3,98	5,39	19,13	4,62 3,07
10	3,19 3,22	3,88 3,92	17,62 17,96	1,35
11	12,30 10,30	3,89 3,96	18,47 17,18	1,94 2,11
12		4,08 4,15	17,52	1,76 3,03
TEMOIN	0,5	0	0	0,45

TABLEAU A : Expérience de bioaccumulation au cours du temps.
(teneur de l'échantillon en ppm du poids sec)

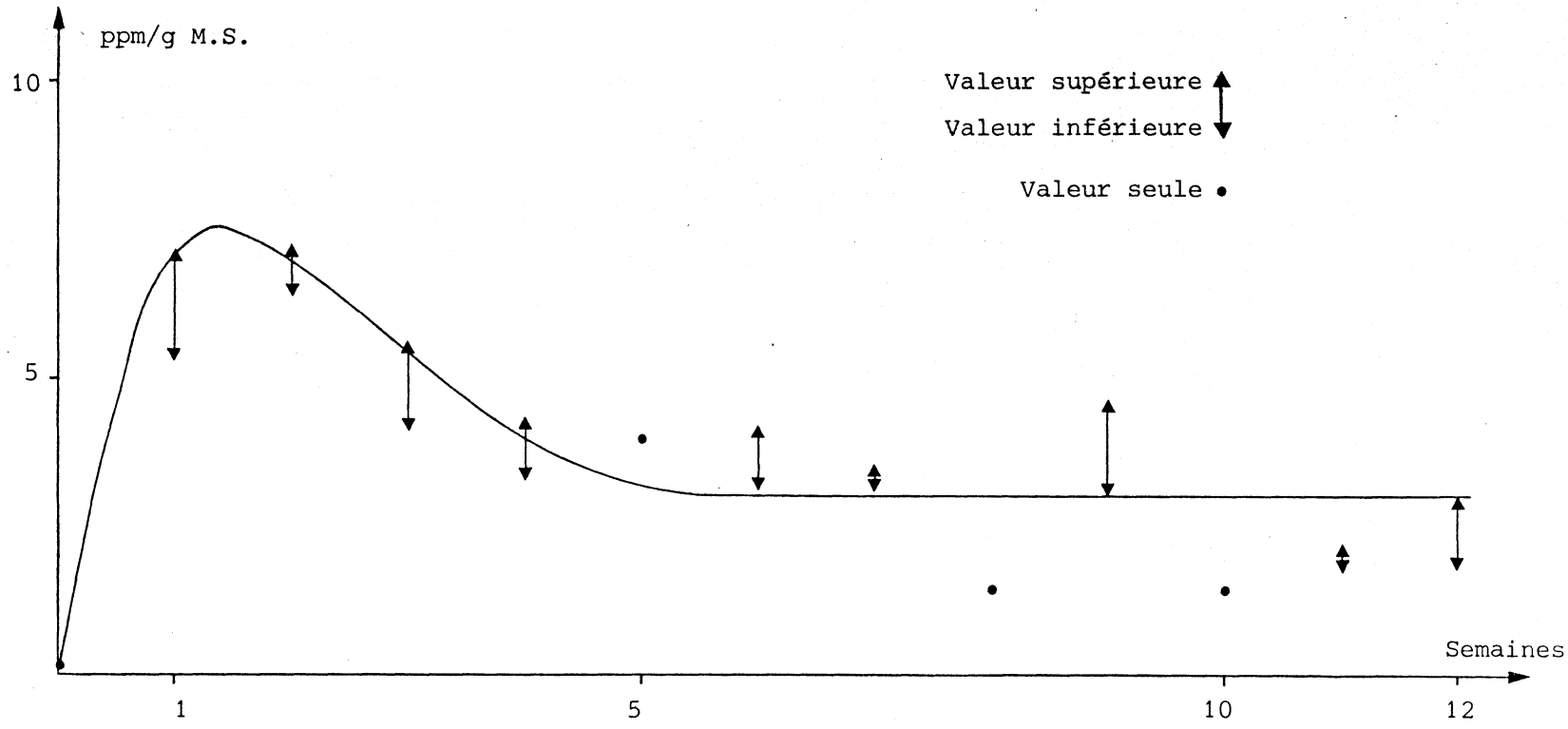


Bioaccumulation du cadmium

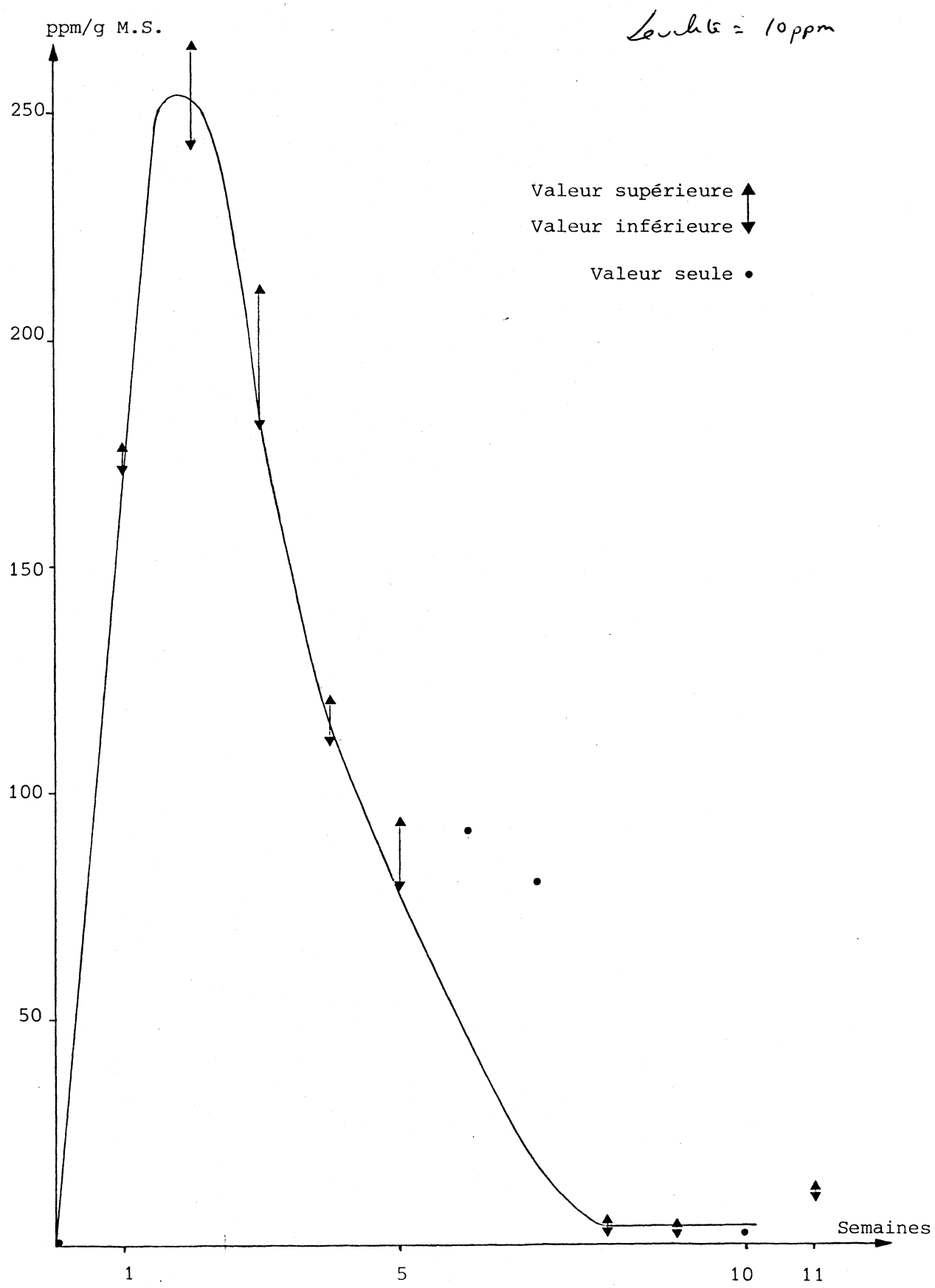


Bioaccumulation du plomb

1 ppm des lentilles



Bioaccumulation du mercure



Bioaccumulation du lindane

Soit "b" la pente de la droite de régression, "b" est compris entre les 2 valeurs b_1 et b_2 :

$$b_1 = b - t_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{SCEy - SPE^2/SCEx}{(n - 2)\ SCEx}}$$

$$b_2 = b + t_{1-\alpha/2} \sqrt{\frac{SCEy - SPE^2/SCEx}{(n - 2)\ SCEx}}$$

SCEy : somme des carrés des écarts des y = $n\sigma^2 y$

SCEx : somme des carrés des écarts des x = $n\sigma^2 x$

SPE : somme des produits des écarts = $\Sigma xy - (\Sigma x \Sigma y / n)$

$\sigma^2 x$: variance des x

$\sigma^2 y$: variance des y

$t_{1-\alpha/2}$: valeur de la student au niveau α.

Si la valeur "zéro" est comprise dans cet intervalle de confiance, calculée au niveau 5 %, nous considérons la droite comme horizontale.

Les résultats sont résumés dans le tableau suivant :

Contaminant	Semaines X à Y X et Y inclus	Intervalle de confiance Valeur inf.	Valeur sup.
Cadmium	9 à 12	- 0,713	0,179
Lindane	8 à 10	- 0,282	0,207
Plomb	3 à 12	- 0,1847	0,2567
Mercure	5 à 12	- 0,540	0,0006

Le faible nombre de données explique l'importance de ces intervalles de confiance.

Lorsque l'on effectue les mêmes calculs de la semaine (X - 1) à la semaine Y, l'intervalle de confiance ne comprend plus zéro. C'est ainsi que nous avons déterminé le point de départ du plateau.

La dernière valeur du lindane n'a pas été incluse dans le calcul car alors la pente de la droite est positive. Nous ne pouvons déterminer si effectivement la contamination réaugmente à partir d'un seul point.

L'existence d'un plateau après la phase descendante est confirmée. La différence de date de la mise en place de ce plateau est notable, le cadmium et le lindane au bout de deux mois, le mercure et le plomb d'un seul.

1.2 *Phénomènes pouvant expliquer ces résultats*

1.2.1 PHENOMENES LIES A L'ANIMAL

La régulation osmotique des lombriciens est imparfaite. Ils absorbent activement des ions Cl présents dans l'eau à une concentration très inférieure à celle qu'ils atteignent dans le sang et le liquide coelomique et ensuite le rapport des concentrations s'inverse lorsque la concentration extérieure augmente (Avel, 1959).

Le foie des vertébrés synthétise une métallothionéine (protéine cytoplasmique riche en cystéine), mise en évidence pour le cadmium (Pulido et al., 1966) et le mercure (Nordberg et al., 1971) et pas pour le plomb. Il est probable que les cellules chloragogènes du tube digestif jouent ce rôle (Ireland et Richard, 1977).

Nous avons pensé qu'au fur et à mesure de leur contamination, les animaux pouvaient avoir diminué leur métabolisme, entraînant une baisse de contaminant fixé. Si cette diminution existe, elle doit induire une baisse de poids des animaux au cours du temps. Or l'étude de la variation de poids des animaux ne confirme ni n'infirme cette hypothèse, cette variation semblant aléatoire (tableau B, p. 51).

1.2.2 PHENOMENES LIES AU SOL

Il est vraissemblable qu'il se crée une dynamique du contaminant dans la lévilite qui aboutit à un équilibre.

Les contaminants peuvent s'adsorber sur les particules de silice et être plus difficilement absorbables.

Un complexe métallo-minéral peut se créer selon l'équation générale :

$$SiO_2 + H_2O + \left|\begin{array}{l} Pb(NO_3) \\ HgCl_2 \\ CdCl_2 \end{array}\right. \longrightarrow \underbrace{SiO_2, \left|\begin{array}{l} PbO \\ HgO, \\ CdO \end{array}\right. H_2O}_{\text{Silicate métallique hydraté}} + \left|\begin{array}{l} HCl \\ \\ HNO_3 \end{array}\right.$$

S \ C	CADMIUM		PLOMB		MERCURE		LINDANE	
	PI	Δ	PI	Δ	PI	Δ	PI	Δ
1	425	+ 31	541	- 33	403	- 83	527	- 55
2	531	- 108	429	+ 27	390	+ 39	433	- 11
3	473	- 150	501	- 8	366	+ 29	468	- 13
4	438	- 30	495	+ 91	380	- 35	428	- 25
5	421	+ 38	414	+ 139	500	+ 74	514	- 10
6	421	- 59	427	+ 96	490	+ 3	469	- 105
7	408	+ 22	398	+ 93	387	+ 45	480	- 82
8	404	+ 99	415	+ 134	400	+ 232	449	+ 37
9	489	- 121	315	+ 189	454	- 12	413	+ 6
10	458	+ 134	407	- 6	417	- 16	551	- 23
11	446	+ 16	383	+ 78	359	- 99	455	- 55
12	402	+ 237	360	+ 142	444	+ 15		

TABLEAU B : Variation de poids des animaux pendant l'élevage.

PI : Poids Initial (en mg), moyenne des 8 vers

Δ : variation de poids (en mg), moyenne des 8 vers.

Les micro-organismes (champignons, bactéries) qui se développent dans le milieu fixent une certaine quantité de contaminant et transforment sa forme chimique.

Ces phénomènes, dont la liste ci-dessus n'est sans doute pas exhaustive, créent un équilibre entre le sol, l'animal et le contaminant. Cet équilibre met un certain temps à s'établir, expliquant la phase transitoire avant le plateau.

La teneur en contaminant des animaux, relevée à un instant donné, indique la résultante, à cet instant, des deux phénomènes physiologiques concomittants : l'absorption et l'excrétion. Il est certain que la réponse de l'animal est en retard par rapport aux changements de composition du milieu. Ce temps de latence est une explication possible au pic de la deuxième semaine.

Certaines données auraient pu être recueillies dans le cadre de cette étude si nous avions pu imaginer à son début les problèmes d'interprétation. Nous aurions dû fabriquer un témoin sans lombriciens pour étudier le comportement des contaminants dans le sol. Un dosage de la teneur des micro-organismes aurait pu être envisagé, ainsi que le dosage d'organes.

La caractérisation des métallothionéines ne paraissant pas très difficile, il aurait été intéressant de savoir si les lombriciens les synthétisent effectivement.

1.3 *Autre expression des mêmes résultats*

Nous avons l'habitude d'exprimer une contamination en ppm par rapport à la matière sèche. Or un contaminant n'agit pas tant par sa masse que par le nombre de particules élémentaires actives. Nous avons donc exprimé les résultats obtenus en nanomoles de contaminant incorporées par gramme de matière fraîche. L'expression des résultats sous cette forme permet de comparer les trois contaminants métalliques (tableau C p. 53 et diagramme p. 54).

La quantité de métaux lourds disponible pour les 8 vers est, par boîte, de 86 876 nanomoles de plomb, 448 nanomoles de mercure et 800 nanomoles de cadmium.

Les rapports de la quantité de contaminant absorbé par les vers à la quantité disponible dans le milieu sont semblables pour le cadmium et le mercure, celui du plomb est différent.

Les dynamiques d'absorption du cadmium et du mercure sont également semblables, et différentes de celle du plomb.

Ces deux constatations peuvent s'expliquer par le fait que le milieu est saturé en plomb et pas en cadmium et mercure.

II. EXPERIENCE "MODE D'APPORT DU CONTAMINANT"

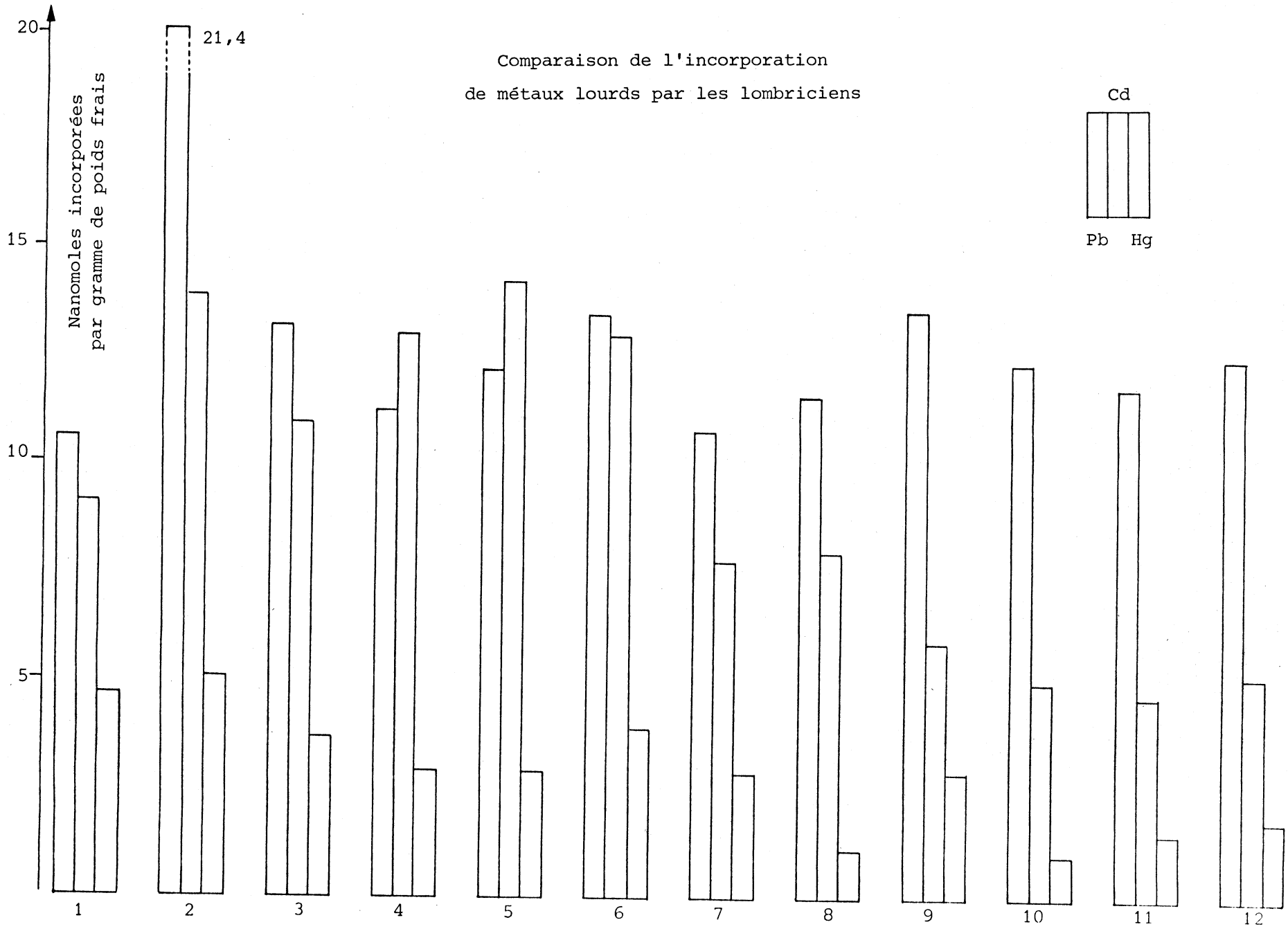
Rappel : les trois modes d'apport de contaminant sont, à dose identique, apport par le sol seul, apport par l'aliment seul, apport par le sol et l'aliment ensemble.

C / S	Plomb MM = 207,19		Cadmium MM = 112,4		Mercure MM = 200,59	
	I	M	I	M	I	M
1	10,62	10,62	9,41 8,93	9,17	4,03 5,35	4,62
2	18,45 24,36	21,41	14,38 13,40	13,89	5,34 4,84	5,09
3	13,18	13,18	13,55 10,36	11,96	4,13 3,20	3,67
4	11,40 11,16	11,26	15,80 10,20	13,00	2,47 3,40	2,94
5	12,93 11,38	12,16	15,81 12,72	14,26	2,95	2,95
6	13,96 13,03	13,50	11,99	11,99	4,90 2,92	3,91
7	10,07	10,07	6,95 8,63	7,79	2,42 3,35	2,89
8	13,23 10,04	11,63	6,32 7,69	7,00	1,09	1,09
9	13,68	13,68	5,92	5,92	3,46 2,29	2,88
10	12,65 12,88	12,77	4,68 5,36	5,02	1,01	1,01
11	12,58 11,05	11,82	4,62 4,72	4,67	1,45 1,58	1,52
12	12,53	12,53	5,01 5,37	5,19	1,31 2,39	1,85

TABLEAU C : Incorporation des contaminants par les lombriciens.

I: Incorporation en nanomoles/g M.F.

M : Moyenne


Comparaison de l'incorporation
de métaux lourds par les lombriciens
Nanomoles incorporées
par gramme de poids frais
20
15
10
5
21,4
Cd
Pb
Hg
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Les résultats sont indiqués dans le tableau D (p. 56) et sont représentés sous forme de diagramme (p. 57).

Nous nous sommes demandés quelles valeurs pouvaient être considérées comme égales et lesquelles pouvaient être considérées comme différentes.

L'analyse de variance à 1 facteur contrôlé avec trois populations (les trois modes d'apport) conclut (cf. détail p. 58) :

- au niveau 1 %, il n'y a pas de différence, quelque soit le contaminant ;
- au niveau 5 % (le risque de première espèce est plus important), le mode de contamination n'agit pas sur la teneur en plomb et en mercure des vers. Par contre, il agit sur la teneur en cadmium et en lindane.

A cause du très faible nombre de données (5 ou 6) la puissance du test est faible. Plus clairement, quand l'analyse de variance indique une différence, nous sommes sûrs de son existence, mais quand elle n'indique pas de différence, nous ne sommes pas certains de cette inexistence.

La preuve en est que lorsque nous recommençons l'analyse avec 2 populations seulement (la puissance est encore plus faible) dans le cas du cadmium et du lindane, elle indique que deux à deux, les populations sont identiques.

En plus de cette restriction d'ordre mathématique, il existe une restriction d'ordre méthodologique.

Quand l'artisol est contaminé, les vers ingérant la lévilite sont contaminés à la fois par contact (par le contaminant du sol) et par absorption (par le contaminant de l'aliment et du sol).

Bien que les animaux explorent le milieu, rien n'indique qu'ils l'explorent totalement. Ils ne sont pas contaminés par la dose totale présente dans l'artisol.

Quand seul l'aliment est contaminé, les vers absorbant théoriquement tout l'aliment, ils sont mis en présence de la totalité du contaminant et ne sont contaminés que par absorption. Nous avons vu que pratique-

ment, ce ne fut pas le cas à cause du développement des mucors. La quantité totale d'aliment absorbée est inconnue.

Compte tenu de ces restrictions (mathématiques et méthodologiques), il est difficile de conclure quant à une influence du mode d'apport du contaminant.

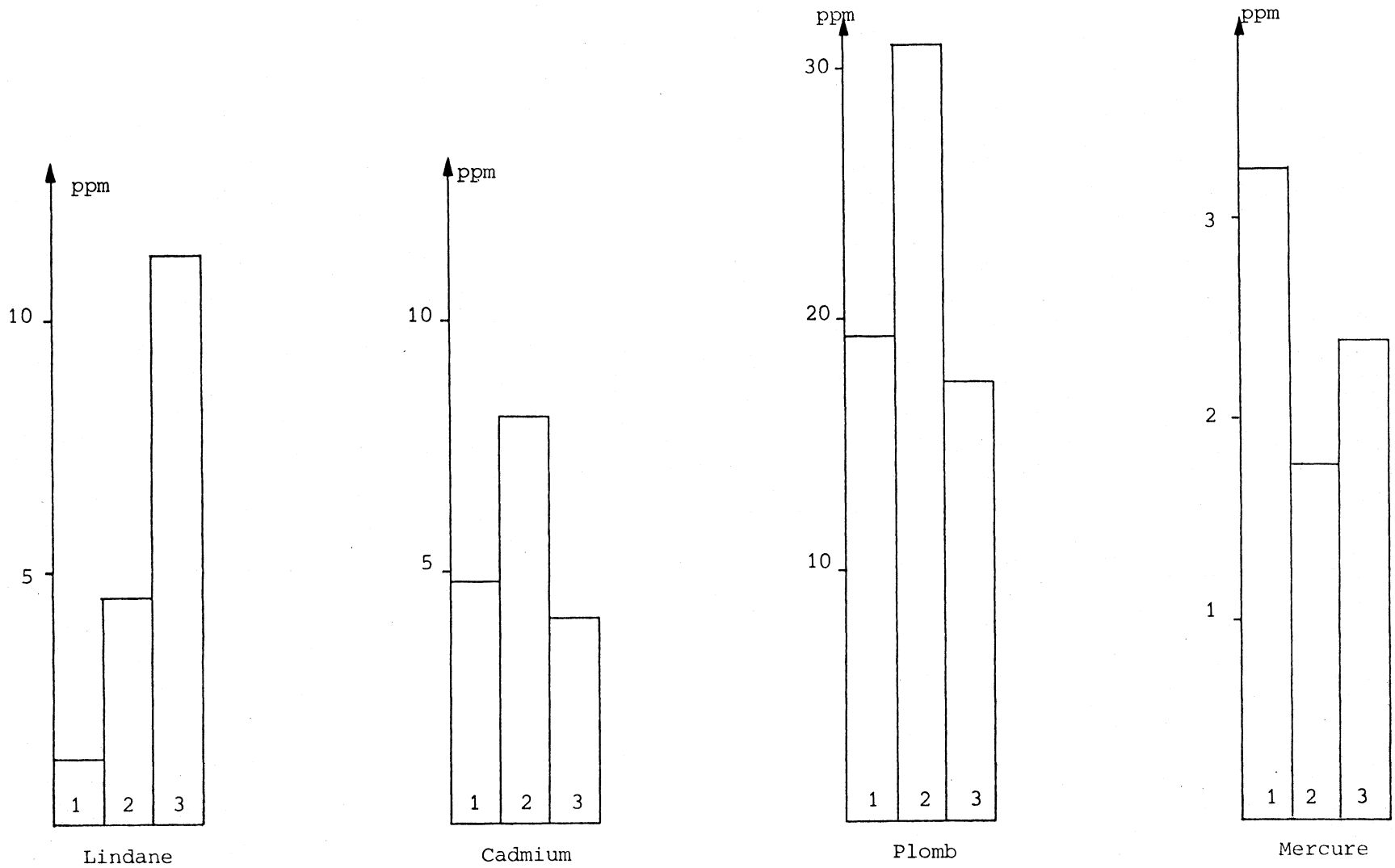
CONTAMINANT \ MODE D'APPORT		SOL	ALIMENT	ALIMENT + SOL
LINDANE	1	10	150	10
	2	9.10^{-4}	9.10^{-4}	$9,54.10^{-4}$
	3	1,60 0,91	4,48	12,30 10,30
CADMIUM	1	1	15	1
	2	9.10^{-5}	9.10^{-5}	$9,54.10^{-5}$
	3	4,60 5,10	8,78 7,47	4,08 4,15
PLOMB	1	200	3000	200
	2	18.10^{-3}	18.10^{-3}	$19,11.10^{-3}$
	3	17,94 20,63	29,52 32,75	17,52
MERCURE	1	1	15	1
	2	9.10^{-5}	9.10^{-5}	$9,54.10^{-5}$
	3	2,86 3,58	1,67 1,85	1,76 3,03

TABLEAU D : Influence du mode d'apport du contaminant.

1 : Taux apporté (en ppm)

2 : Quantité totale apportée (en g)

3 : Teneur des vers (en ppm de matière sèche).



Comparaison des différents modes d'apport du contaminant.

1 : sol ; 2 : aliment ; 3 : aliment + sol.

SDV	SC	DDL	MSC	F_{cal}	$F_{th\ 5\ \%}$	$F_{th\ 1\ \%}$
Entre les populations	0,9546	2	0,4773	1,765	9,55	30,8
Dans les populations	1,0692	3	0,2704		MERCURE	
Totale	9,0238	5	0,40476			

SDV	SC	DDL	MSC	F_{cal}	$F_{th\ 5\ \%}$	$F_{th\ 1\ \%}$
Entre les populations	109,58	2	54,79	12,48	19	99
Dans les populations	8,7754	2	4,387		PLOMB	
Totale	118,3554	4	29,589			

SDV	SC	DDL	MSC	F_{cal}	$F_{th\ 5\ \%}$	$F_{th\ 1\ \%}$
Entre les populations	17,21	2	8,605	25,86	9,55	30,8
Dans les populations	0,998	3	0,3327		CADMIUM	
Totale	18,208	5	3,6416			

SDV	SC	DDL	MSC	F_{cal}	$F_{th\ 5\ \%}$	$F_{th\ 1\ \%}$
Entre les populations	52,649	2	26,324	23,52	19	99
Dans les populations	2,238	2	1,119		LINDANE	
Totale	54,887	4	13,721			

Détail des analyses de variance.

SDV : Source De Variation ; SC : Somme des Carrés ; DDL : Degrés de Liberté ; MSC : Moyenne des Sommes des Carrés ; F_{cal} : Valeur Calculée de la Fischer-Snédécor ; $F_{th\ \alpha}$: valeur théorique de la Fischer-Snédécor au niveau α.

III. EXPERIENCE "INFLUENCE DU SOL"

Le trop faible nombre de données empêche toute interprétation mathématique.

Le tableau E indique que le plomb et le mercure ont un comportement équivalent vis-à-vis des vers de terre dans l'argile et l'artisol, le lindane et le cadmium un comportement différent.

SOL \ C	Lindane	Cadmium	Plomb	Mercure
Artisol	12,30 10,30 M = 11,30	4,08 4,15 M = 4,11	17,52	1,76 3,03 M = 2,39
Argile	235	8,97 9,20 M = 9,09	20,89	2,61 3,48 M = 3,09

TABLEAU E : Teneur des vers (en ppm de M.S.) selon le type de sol.

Il faut interpréter ces résultats avec prudence. Le régime hydrique des deux sols est différent. Dans le sol argileux, la quantité d'eau incorporée est suffisante pour permettre la survie des animaux, mais nous avons vu que nous n'étions pas à pF 2,5. L'état de relative sécheresse a pu ralentir le métabolisme des lombriciens dans le sol argileux.

L'importante différence de contamination par le lindane dans le sol argileux peut s'expliquer par l'insolubilité du lindane dans l'eau.

La force de succion exercée sur l'eau par le sol s'exerce aussi sur le contaminant lorsque celui-ci est en solution. La disponibilité d'un contaminant soluble dans l'eau varierait avec le pF, alors que celle d'un contaminant insoluble en serait indépendante.

IV. CONCLUSION PARTIELLE

L'expérience de laboratoire nous a donc montré que la contamination des lombriciens s'effectue en trois phases, que le niveau de contamination influe sur la dynamique d'absorption ainsi que le type de sol où vivent les lombriciens et le mode d'apport du contaminant.

Cette expérimentation nous a surtout appris que, malgré les précautions prises, notre maîtrise de l'artisol est insuffisante. Les phénomènes physiques, chimiques et biologiques peuvent être négligés dans de courtes expériences, mais dans des expériences de longue durée, leur méconnaissance nous empêche de tirer tous les enseignements des résultats.

B - Prélèvements au terrain

I. RESULTATS DE ST-CYPRIEN

1.1 Résultats bruts

Les teneurs des vers et des échantillons de sol prélevés à St-Cyprien sont exprimés dans le tableau F (p. 61).

1.2 Interprétation

L'importante variation des teneurs en plomb du sol ne permet pas de dégager des tendances à partir de moyennes et le faible nombre de données d'effectuer une analyse de variance.

Certaines tendances peuvent néanmoins être mises en évidence par l'étude valeur par valeur.

1.2.1 PLOMB

Les teneurs du sol sont plus faibles lorsqu'on s'éloigne de la source de contamination (297 ppm à 40 m, 25 ppm à 250 m). A distance égale le sol est plus contaminé à l'est et au sud qu'à l'ouest et au nord. Ce phénomène est évidemment dû à la direction des vents dominants.

Lorsque la comparaison est possible (prélèvements N° 5 et 7), nous observons que la teneur de *N. caliginosus meridionalis* est inférieure à celle de *L. centralis*. Cette différence de teneur reflète la différence de moeurs car *L. centralis*, anécique ou épigé, consomme plus de litière que *N. caliginosus meridionalis*, anécique ou endogé.

L. castaneus, qui vit dans la litière et qui la consomme, a une teneur en plomb plus élevée que *N. caliginosus* au premier prélèvement et

P	O	D	Teneur Pb	Teneur Cd	*Nicodrilus caliginosus*			*Lumbricus*					*Octolasium cyaneum*		Métal
					~~Anim. conf.~~	*meridionalis*		Lumb ~~Anim~~. conf.	*centralis*		*castaneus*	*terrestris*			
					Larve	Sub-adulte	Adulte	Larve	Sub-adulte	Adulte	Adulte	~~Larve~~ coeur 6	Larve	Adulte	
5	O 2	125	20	Traces	65,45	- 9	58,18			22,70 26,52					Cd
					114,54		183,64			311,59 462,96					Pb
7	NO 3	220	20	Traces	56,30 57,89	50,08	26,50	108,55		17,19 18,08					Cd
					92,59 108,97	37,70	43,33	94,55		132,81 164,53					Pb
8	NO 3	250	25	Traces								20,09 16,56	44,82 29,55	48,37	Cd
												59,52 55,62	33,53 20,45	25,75	Pb
4	O 2	85	37	Traces											Cd
															Pb
6	NO 3	160	43	Traces			43,13						41,37	26,26 27,13	Cd
							113,75						25,21	73,60 99,40	Pb
9	SO 4	140	55	Traces	48,14	21,79	37,03 45,00	36,92 30,78	29,49 33,46						Cd
					33,14	18,19	197,00 195,00	36,67 47,01	218,98 171,07						Pb
1	E 1	150	60	Traces	36,59 38,80	23,91	31,00 30,59	32,23 31,46			63,07				Cd
					22,18 21,04	34,88	16,24 16,58	55,11 59,43			65,38				Pb
2	E 1	125	67	Traces				26,36		32,79 35,69					Cd
								323,86		385,25 292,61					Pb
10	SE 5	125	223	Traces	31,82 25,10		75,15	36,22			56,82				Cd
					454,55 352,94		590,91	439,96			249,65				Pb
3	O 2	40 ~~297~~	297	Traces	176,00		29,54								Cd
					393,30		423,08								Pb

TABLEAU F : Analyses des prélèvements de St-Cyprien.

(Teneurs en plomb et en cadmium exprimées en ppm de M.S.)

2 chiffres = 2 mesures

P : Point de prélèvement ; O : Orientation ; D : Distance (en m) ; Anim. conf. : Animaux confondus.

inférieure au dixième.

La constance du facteur de concentration (f = teneur de l'animal/ teneur du sol) de *L. castaneus* (f ≃ 1 aux deux prélèvements où il est présent) et la variation de celui de *N. caliginosus meridionalis* (égal à 0,27 au prélèvement N° 1 et à 1,5 au prélèvement N° 3) peuvent expliquer ce phénomène.

Les différences de teneur observées entre les larves et les adultes semblent incohérentes sauf pour *L. centralis*, dont la teneur des larves est inférieure ou égale à celle des adultes, ce qui correspond à leur comportement alimentaire ; en effet les larves de *L. centralis* ne consomment pas les feuilles de la litière, lesquelles sont les plus contaminées, alors que les larves de *N. caliginosus*, *L. castaneus* et *O. cyaneum* ont des moeurs peu différentes de celles des adultes.

1.2.2 CADMIUM

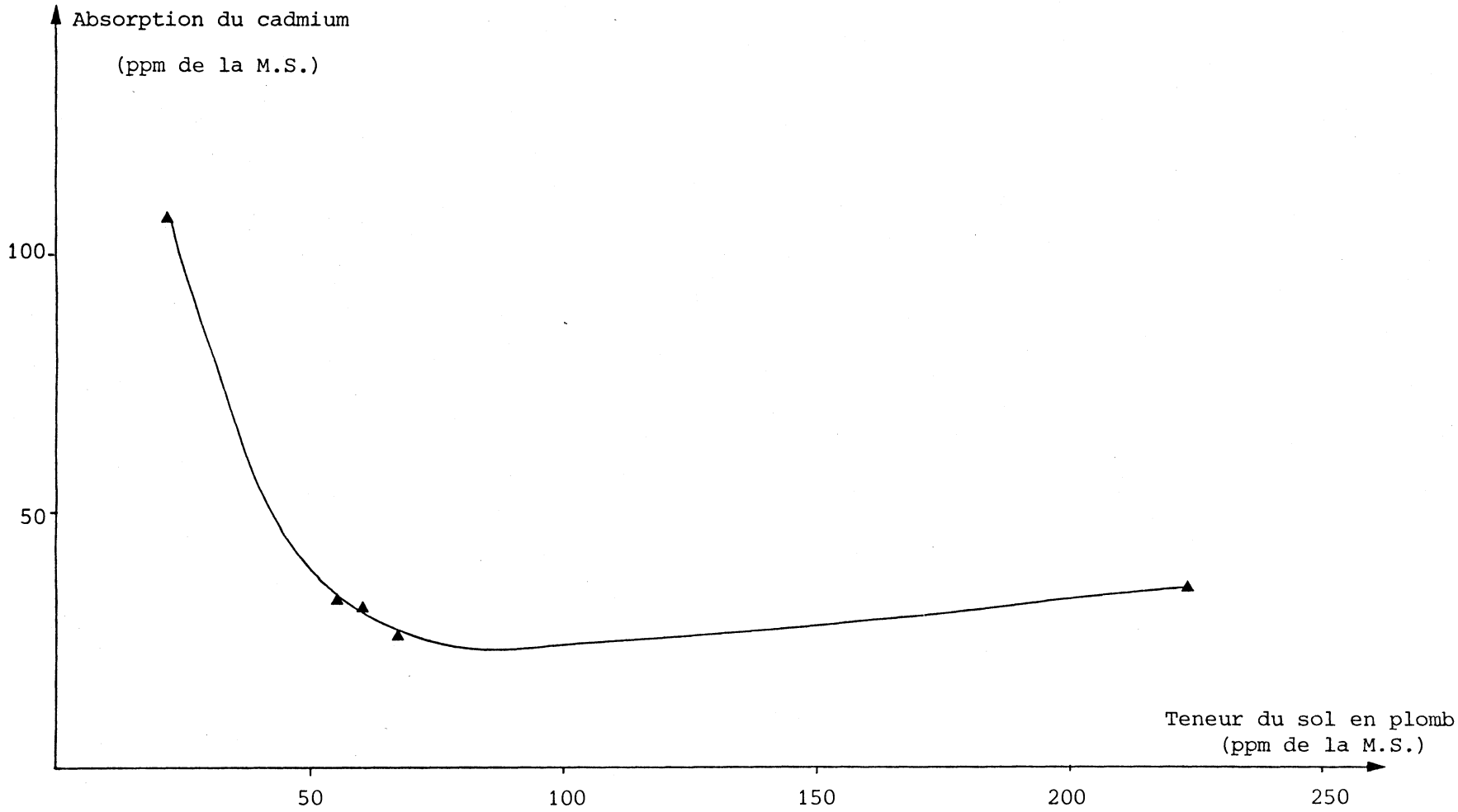
Les fortes teneurs des animaux en cadmium (jusqu'à 176 ppm) sont difficilement explicables, alors qu'il n'en a été extrait des sols que des traces. Cette extraction a été effectuée à l'eau régale et est incomplète mais cette explication n'est pas suffisante.

La distinction des catégories écologiques des lombriciens par leur teneur en cadmium n'est pas possible comme pour le plomb. Une fixation plus faible du cadmium sur les feuilles des végétaux qui constitueront la litière et une répartition plus homogène dans le profil peut en être la cause.

1.2.3 INTERACTION

La forte concentration de cadmium par les lombriciens dans des sols peu contaminés peut être due à une interaction du plomb sur l'absorption du cadmium.

Lorsque nous disposons de suffisamment de valeurs, au moins 5 par stade et par espèce, nous avons étudié l'absorption du cadmium en fonction de la quantité de plomb présent dans le sol. L'évolution la plus nette est celle des larves de *Lumbricus*, animaux confondus, voir courbe (p.63), mais le calcul de la régression montre que la relation est peu corrélée.



Absorption de cadmium des larves de *Lumbricus*.

Le coefficient de corrélation est au maximum égal à 0,6 pour une relation de type logarithmique. L'évolution des autres catégories d'animaux (*N. caliginosus meridionalis* adultes et *N. caliginosus* animaux confondus, larves) est moins nette et la corrélation encore plus faible.

II. CONTAMINATION AGRICOLE

2.1 Résultats bruts

Les résultats des analyses des teneurs des lombriciens prélevés dans des parcelles où ont été épandus du fumier et des boues d'épuration sont indiqués dans le tableau G (p. 65).

2.2 Interprétation

Les teneurs d'*A. atlantica* adulte dans les parcelles B3, B4 et B5, en plomb et cadmium, ainsi que celles des larves d'*Allolobophora* (animaux confondus) dans les parcelles F1 et F4 nous indiquent qu'il existe un effet des parcelles qui n'est pas révélé par les résultats des analyses de sol.

Les larves et les subadultes *Allolobophora* explorent la superficie du sol, alors que *Scherotheca* et *Lumbricus* sont des anéciques et explorent aussi bien la litière que le sol. La comparaison des teneurs en plomb et cadmium de ces deux catégories d'animaux ne donne pas de résultats très probants.

Nous pouvons néanmoins en tirer quelques enseignements. La teneur moyenne en plomb des anéciques (8,94 ppm) est moins importante que celle des épigés (15,34 ppm) car la litière est plus riche en métaux lourds que les horizons profonds. La teneur d'*A. atlantica* adulte n'a pas été prise en compte car son appartenance à une catégorie écologique n'est pas précise.

A cause du faible nombre de données et de leur dispersion, il est impossible d'établir la même relation pour le cadmium. Nous pouvons cependant remarquer les fortes teneurs en cadmium des vers provenant des parcelles où a été épandu du fumier (jusqu'à 240 ppm).

			BOUES				FUMIER	
			3	4	5	1	2	4
Allolobophora atlantica	Adulte	Pb	14,63	23,24	83,78 57,75	4,16		
		Cd	33,26	586,76	171,22 122,64	18,66		
	Subadulte	Pb				9,80		
		Cd				238,66		
Anim. conf.	Larve	Pb			27,00	15,17		21,05
		Cd			327,03	166,89		45,26
Scherotheca savignyi	Subadulte	Pb				6,69 8,53		
		Cd				40,45 54,11		
Lumbricus friendi	Adulte	Pb					8,68	
		Cd					68,13	
Anim. conf.	Larve	Pb				11,87		
		Cd				87,50		

P \ C	Cd ppm	Pb ppm	Cd ppm	Pb ppm
0 - 20	13,8	13,8	0,6	10,2
20 - 40	3,6	9,7	0,3	10
40 - 60	1,6	5,8	0,1	7,5
60 - 80	0,2	3,2	Traces	4,4

TABLEAU G : Teneur (en ppm) du plomb et du cadmium des parcelles "boues" et "fumier".

En raisonnant sur les moyennes, ce qui est contestable, nous nous apercevons que les teneurs des vers en cadmium dans les parcelles boues sont plus importantes que dans les parcelles fumier : elles sont respectivement de 248,18 et 90 ppm, ce qui s'explique par la plus forte teneur du sol. Par contre, les facteurs de concentration (f = moyenne des teneurs des vers / teneur du sol dans les 20 premiers cm) s'inversent : f = 18 dans les parcelles boues et f = 150 dans les parcelles fumier, inversion interprétée par le fait que les animaux tendent à se saturer lorsque la concentration du sol augmente.

La teneur moyenne en plomb des vers issus des parcelles boues (41,28 ppm) est plus importante que celle des vers issus des parcelles fumier. Le faible écart des teneurs des sols n'explique pas cette forte différence qui peut être due à l'effet des parcelles, à la différence du type de matière organique apportée, ou à un effet synergique de l'absorption du cadmium sur l'absorption du plomb. Cette hypothétique synergie serait en contradiction avec les résultats de J.J. Chisolm (1980) qui a noté une baisse d'absorption du plomb lorsque l'absorption du cadmium augmente. Mais cette étude ne concerne pas spécifiquement les lombriciens.

III. CONCLUSION PARTIELLE

Malgré le faible nombre de données, nous avons pu dégager certains phénomènes. Il est évident qu'ils demandent à être approfondis et vérifiés sur des échantillons plus importants permettant d'effectuer des calculs statistiques et d'obtenir plus de certitudes. Ces phénomènes sont:

- une importante contamination des lombriciens par le cadmium, même lorsqu'il est peu présent dans les sols ;
- une interaction plomb-cadmium, interaction manifestement différente selon l'âge et l'espèce des animaux et selon le niveau relatif de contamination des 2 métaux lourds ;
- l'importance de la catégorie écologique des animaux et de leur comportement alimentaire.

CONCLUSION

Nous ne pouvons pas, à la lumière des quelques résultats ci-dessus, affirmer que le meilleur bioéchantillon d'une contamination soit constitué par la faune lombricienne. Il est probable que le bioéchantillon parfait reste à trouver.

A cause de la multitude des facteurs mis en cause, facteurs physiques, chimiques et biologiques, la nécessité d'un bioéchantillon est néanmoins mise en évidence.

La faune lombricienne est toujours présente dans un sol (lorsqu'elle n'a pas été décimée) ; les différentes catégories permettent de différencier les horizons ; nous sommes capables d'extraire la totalité des contaminants de la matière organique lombricienne. Ces constatations militent en faveur du bioéchantillon lombricien.

Ce travail est une contribution à la mise en place de ce bioéchantillon. Une plus grande maîtrise de l'expérimentation au laboratoire (artisol, aliment) permettra d'approfondir nos connaissances des phénomènes physiologiques d'absorption des contaminants.

Un plus grand nombre de prélèvements de terrain permettra de dégager les certitudes quant aux tendances mises en évidence dans la troisième partie. Nous pourrons alors établir les relations entre les résultats des expériences de laboratoire et ceux des prélèvements au terrain.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDERSSEN, A., & L. WIKLANDER, 1965 - Something about mercury in nature. Grundfoerbattring, 18, 171-177 (cité in Lagerwerf, 1972).

ANONYME, 1969 - Nat. air poll. contr. adm., public. Health service, U.S. dept. of Hew. Preliminary air pollution survey of cadmium and its compounds, Litton systems, contract N° PH 226825. Pub. N° APTD 69-32, p. 81.

ANONYME, 1970 - Nat. air poll. contr. adm., public. Health service, U.S. dept. of Hew. National inventory of sources and emissions of cadmium, nickel and asbertos in 1968, I.W.E., Contract N° OPA 2269131, p.44.

ANONYME, 1977 - W.H.O. Environmental health criteria. 3. Lead. World Health Organization, Geneva (cité in Nriagu, 1980).

ANONYME, 1980 - A.C.T.A., index phytosanitaire.

AVEL, M., 1959 - Classe des annélides oligochètes. In P.P. Grassé "Traité de zoologie", éd. Masson et Cie, Paris, 5, 1, 224-470.

BACHELIER, G., 1963 - La vie animale dans les sols. Ed. O.R.S.T.O.M., Paris, 1-279.

BARKER, H.A., 1941 - Studies on the methane fermentation. V. j. biol. chem., 137, 153-167 (cité in Lagerwerff, 1972).

BARROWS, H.L., 1966 - Soil pollution and its influence on plant quality. J. soil water conserv., 21, 6, 211-216. (cité in Ramade, 1974).

BIGGINS, P.D.E., & R.M. HARRISON, 1978 - Nature, 272, 531 (cité in Nriagu, 1980).

BOLLEN, W.B., J.E. ROBERTS & H.E. MORRISON, 1958 - J. econ. ent., 51, 214 (cité in Edwards, 1973).

BOUCHE, M.B., 1972 - Lombriciens de France. Ecologie et systématique. Ed. I.N.R.A., Ann. zool. - écol. anim., N.S., 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.

BOUCHE, M.B., & L. FAYOLLE, 1980 - Contamination chimique du chaînon trophique lombricien : problèmes méthodologiques et conséquences. C.R. 3ème coll. contam. chaînes biol., Paris. Ed. Minist. environ., coll. recherche environm., 14, 109-113.

BROSSEAU, J., 1976 - Contribution à l'étude de la toxicité du manganèse au niveau subcellulaire. D.E.A. Nutrition et alimentation, E.N.S.B.A.N.A.

BULL, K.R., R.D. ROBERTS, M.J. INSKIP & G.T. GOODMAN, 1977 - Mercury concentrations in soil, grass, earthworms and small mammals near an industrial emission source. Environ. pollut., 12, 2, 135-140.

CHAMPION, D.F., & S.R. OLSEN, 1971 - Soil sci. soc. am. proc., 35, 887 (cité in Edwards, 1973).

CHAWLA, R.P., & S.L. CHOPRA, 1967 - J. res. punjab. agric. univ., 4, 96 (cité in Edwards, 1973).

CHISOLM, J.J., 1980 - Lead and other metals a hypothesis of interaction. In R.L. Singhal & J.A. Thomas "Lead toxicity", ed. urban and schwarzenberg, Baltimore - Munich, 461-482.

COURVOISIER, C., 1979 - Mise au point d'un test pesticides vis-à-vis des lombriciens. Mémoire-thèse E.N.I.T.A., 1979, 1-105.

CUENDET, G., 1979 - Etude du comportement alimentaire de la mouette rieuse (*Larus ribibundus* L.) et de son influence sur les peuplements lombriciens. Thèse de doctorat, fac. sci. de l'univ. Lausanne, 1979, 1-111.

DARWIN, C.R., 1881 - The formation of vegetable mould through the action of worms with observations on their habits. Ed. John Murray and Co, London, 1-326 (cité in Bouché, 1972).

DEYSSON, G., & E. CLAIN, 1980 - Etude de la cytotoxicité des sels de cadmium ; comparaison avec celle des sels de plomb et de mercure. C.R. 3ème coll. contam. chaînes biol., Paris. Ed. Minist. environ., coll. recherche environm., 14, 281-285.

DOWNS, W.G., 1951 - Science, N.Y., 114, 259 (cité in Edwards, 1973).

DUGAST, P., & C. BOUDENE, 1980 - Contribution à l'étude de la contamination des chaînes alimentaires par les métaux lourds provenant de la combustion de matières plastiques. C.R. 3ème coll. contam. chaînes biol.,

Paris. Ed. Minist. environ., coll. recherche environm., 14, 263-267.

EDWARDS, C.A., S.D. BECK & E.P. LICHTENSTEIN, 1957 - J. econ. ent., 50, 622 (cité in Edwards, 1973).

EDWARDS, C.A., 1973 - Pesticide residues in soil and water. In C.A. Edwards "Environmental pollution by pesticides", ed. Plenum press, London and New York, 409-458.

FASSET, D.W., 1972 - Cadmium. In D.H.K Lee "Metallic contaminants and human health", ed. Academic Press, New York and London, 97-124.

FAYOLLE, L., 1979 - Conséquences de l'apport de contaminants sur les lombriciens. III. Essais de laboratoire. Doc. pédozool., 1, 1, 34-65.

FAUCHERRE, J., A.M. PINART & A. DUTOT, 1980 - Contamination des eaux, des sols et des végétaux par le plomb, le cadmium et le zinc. C.R. 3ème coll. contam. chaînes biol., Paris. Ed. Minist. environ., coll. recherche environm., 14, 273-279.

FERRIERE, G., M.B. BOUCHE & L. FAYOLLE, sous presse - Un nouvel outil, essentiel pour l'écophysiologie et l'écotoxicologie : l'élevage des lombriciens en sol artificiel. Pedobiologia.

FINLAYSON, D.G., & H.R. Mac CARTHY, 1973 - Pesticide residues in plants. In C.A. Edwards "Environmental pollution by pesticides", ed. Plenum Press, London and New York, 57-86.

FLEMING, W.E., & W.W. MAINES, 1953 - J. econ. ent., 46, 466 (cité in Edwards, 1973).

FROCHOT, B., 1967 - Réflexions sur les rapports entre prédateurs et proies chez les rapaces. II. L'influence des proies sur les rapaces. La terre et la vie, 21, 1, 5-62.

GISH, C.D., & R.E. CHRISTENSEN, 1973 - Cadmium, nickel, lead and zinc in earthworms from roadside soil. Environ. sci. techn., 7, 11, 1060-1062.

GOLDWATER, L.J., & T.W. CLARKSON, 1972 - Mercury. In D.H.K. Lee "Metallic contaminants and human health", ed. Academic Press, New York and London, 17-55.

GOMEZ, A., & C. JUSTE, 1981 - Mobilité du cadmium, du mercure, du nickel et du plomb associés à des acides humiques ou à des anions minéraux dans des colonnes de sable. In "Migrations organo-minérales dans les

sols tempérés", éd. C.N.R.S., Paris, 291-296.

GOYER, R.A., & J.J. CHISOLM, 1972 - Lead. In D.H.K. Lee "Metallic contaminants and human health", ed. Academic Press, New York and London, 57-95.

GULLVAG, B.M., 1978 - Subcellular localization of polluting metals in roadside earthworms exposed to traffic exhaust gases. Cytobios, 22, 87-88, 141-153.

HANSEL, J.A., & J.C. TJELL, 1978 - Guidelines and sludge utilization practice in Scandinavia. Proc. conf. "Utilization of sewage sludge on land", pap. 20, session 4, Oxford, 10-13/4/1978. Water res. center Medmenham, 23 p. (cité in Pommel, 1979).

HARRISON, R.M., & R. PERRY, 1977 - Atmosph. environ., 11, 847 (cité in Nriagu, 1980).

HARRISON, R.M., & D.P.H. LAXEN, 1978 - Nature, 275, 738 (cité in Nriagu, 1980).

HERMANSON, H.P., & C. FORBES, 1966 - Soil sci. soc. amer. proc., 30, 748 (cité in Edwards, 1973).

HOLMES, D.C., J.H. SIMMONS & J.O.G. TATTON, 1969 - J. sci. food agric., 20, 293 (cité in Stickel, 1973).

IRELAND, M.P., 1975 - Distribution of lead, zinc and calcium in *Dendrobaena rubida* (Oligochaeta) living in soil contaminated by base metal mining in Wales. Comp. biochem. physiol., 52, 4B, 551-555.

IRELAND, M.P., 1976 - Excretion of lead, zinc and calcium by the earthworm *Dendrobaena rubida* living in soil contaminated with zinc and lead. Soil biol. biochem., 8, 5, 347-350.

IRELAND, M.P., 1979 - Metal accumulation by the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena venata* and *Eiseniella tetraedra* living in heavy metal polluted sites. Environment. pollut., 19, 3, 201-206.

IRELAND, M.P., & K.S. RICHARDS, 1977 - The occurence and localization of heavy metals and glycogen in the earthworms *Lumbricus rubellus* and *Dendrobaena rubida* from a heavy metal site. Histochem., 51, 2/3, 153-166.

IRELAND, M.P., & R.J. WOOTON, 1976 - Variations in the lead, zinc and cal-

cium content of *Dendrobaena rubida* (Oligochaeta) in a base metal mining area. Environ. pollut., 10, 3, 201-208.

JAY, S., 1979 - Etude de l'écotoxicité de quelques métaux lourds sur le chaînon lombricien. Mémoire-thèse E.N.I.T.A., 1979, 1-91.

JERNOLOV, A., 1969 - Conversion of mercury fallout. In C.C. Thomas "Chemical fallout", chap. 4 (cité in Ramade, 1977).

JOENSUU, O.I., 1971 - Fossil fuels as a source of mercury pollution. Science, 172, 1027-1028 (cité in Lagerwerff, 1972).

KLEIN, D.H., & E.D. GOLDBERG, 1970 - Mercury in marine environment. Environ. sci. technol., 4, 765-768 (cité in Lagerwerff, 1972).

KOPP, J.F., & R.C. KRONER, 1970 - Trace metals in waters of the United States. Fed. water poll. contr. admin., U.S. dept. of the interior, Cincinnati, Ohio (cité in Lagerwerff, 1972).

LAGERWERFF, J.V., 1972 - Lead, mercury and cadmium as environmental contaminants. In J.J. Mortvedt, P.M. Giordano & W.L. Lindsay "Micronutrients in agriculture", ed. Soil sci. soc. amer., inc. Madison, Wisconsin, U.S.A., 593-636.

LEE, D.H.K. - Cité in Goldwater, 1972.

LÖFROTH, G., 1969 - Methylmercury. Ecological res. comm., Swedish nature sci. res. counc., bull. 4, 29 (cité in Lagerwerff, 1972).

LÖWE, 1964 - Cité in Ramade, 1974.

MacFADYEN, A., 1961 - Metabolism of soil invertebrates in relation to soil fertility. Ann. appl. biol., 49, 215-218.

MAZAUD, D., 1979 - Evaluation de méthodes de marquage permettant le repérage des lombriciens au terrain ; premières applications. Thèse docteur ingénieur, sci. agron., I.N.A. Paris Grignon, Paris, 1-178 + annexes 1-80.

NEWMAN, J.P., & A.L. BUIKEMA, 1975 - The effect of heavy metals on the reproduction of *Aeolosoma headleyi* annelida. ASB bull., 22, 2, 71.

NORDBERG, G.F., M. NORDBERG, M. PISCATOR et O. VESTERBERG, 1972 - Separation of two forms rabbit metallothionein by isoelectric forming. Biochem. j., 126, 491-498 (cité in Brosseau, 1976).

NRIAGU, J.O., 1978 - The biogeochemistry of lead in the environment. Part 1A, p. 137. Ed. Nriagu, Esevier, Amsterdam (cité in Nriagu, 1980).

NRIAGU, J.O., 1979 - Global inventory of natural and anthropogenic emissions of trace metals to the atmosphere. Nature, 279, 409 (cité in Nriagu, 1980).

NRIAGU, J.O., 1980 - Lead in the atmosphere and its effect on lead in humans. In R.L. Singhal and J.A. Thomas "Lead toxicity", ed. Urban and Schwarzenberg, Baltimore-Munich, 461-503.

OTTERLIND & LENERSTEDT, 1966 - Cité in Ramade, 1977.

PATRICK, F.M., & M. LOUTIT, 1976 - Passage of metals in effluents through bacteria to higher organisms. Water res. 10, 4, 333-335.

PINTA, M., et al., 1971 - Spectrométrie d'absorption atomique. Application à l'analyse chimique. Ed. Masson et Cie, O.R.S.T.O.M., Paris, 1, 1-285.

PLISKO, J.D., 1961 - Analysa materialow dżdżownic (*Lumbricidae*) zmagazynowanych przez kreta (*Talpa europaea* L.) (Analyse der Materialen von Regenwürmern (Lumbricidae) aus den Magazinen eines Maulwurfs (*Talpa europaea* L.)). Fragm. faunist., 9, 7, 61-73 (cité in Bouché, 1972).

POMMEL, B., 1979 - La valorisation agricole des déchets. II. Les boues résiduaires urbaines. Ed. I.N.R.A., centre de Bordeaux, 1-70.

PULIDO, P., J.H.R. KAGI & B.L. VALLEE, 1966 - Isolation and some properties of human metallothionein. Biochem.j., 5, 1768-1777 (cité in Brosseau, 1976).

PURUKOSKI, P., 1967 - Investigations on pesticide residues 1963-1966. Publ. State inst. agric. chem., Helsinski, 1 (cité in Finlayson & MacCarthy, 1973).

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

RAMADE, F., 1977 - Ecotoxicologie. Ed. Masson, Paris-New York-Barcelone-Milan, 1-205.

RANDAKAMA, K., & T.G. SAHAMA, 1950 - Geochemistry. Ed. Chicago university Press (cité in Goldwater & Clarkson, 1972).

RICHARDSON, H.C., 1938 - J. agric. sci., 28, 73-121 (cité in Bachelier, 1963).

RUSS, R.G., & D.K.K. STEWART, 1969 - Cadmium residues in apple fruit and foliage following a cover spray of cadmium chloride. Can. j. plant sci., 49, 49-52 (cité in Lagerwerff, 1972).

RUSSEL, B.J., J.P. SHELTON & A. WALSH, 1957 - An atomic absorption spectrophotometer and the application to the analysis of solutions. Spectrochim. Acta, 8, 317-328 (cité in Pinta, 1971).

SATCHELL, J.E., 1955 - Some aspects of earthworm ecology. In "Soil ecology", éd. Butterworths, London, 180-201 (cité in Bouché, 1972).

SCNITZER, M., 1968 - Reaction between organic matter and inorganic soil constituants. Int. cong. soil sci., trans 9th (Adelaide, Aust.), 1, 635-644 (cité in Lagerwerff, 1972).

SCNITZER, M., & S.I.M. SKINNER, 1966 - Organo-metallic interactions in soils. 5. Stability constants of Cu^{++}, Fe^{++} and Zn^{++} - fulvic acid. Soil sci., 102, 361-365 (cité in Stevenson & Ardakani, 1972).

SCNITZER, M., & S.I.M. SKINNER, 1967 - Organo-metallic interactions in soils. 7. Stability constants of Pb^{++}, Ni^{++}, Mn^{++}, Co^{++}, Ca^{++} and Mg^{++} fulvic acid complexes. Soil sci., 103, 247-252.

SINGER, M., &L. HANSON, 1969 - Lead accumulation in soils near highways in the twin cities metropolitan area. Soil sci. soc. amer. proc., 32, 152-153 (cité in Lagerwerff, 1972).

SKERFUING, S., K. HANSSON & J. LINDSTEN, 1970 - Chromosome breakage in human subjects exposed to methyl mercury through fish consumption. Arch. environ. health, 21, 133 (cité in Lagerwerff, 1972).

STEVENSON, F.J., & M.S. ARDAKANI, 1972 - Organic matter reactions involving micronutrients in soils. In J.J. Mortvedt, P.M. Giordano & W.L. Lindsay "Micronutrients in agriculture", soil sci. soc. amer., Madison, Wisconsin, U.S.A., 79-114.

STICKEL, L.F., 1973 - Pesticide residues in birds and mammals. In C.A. Edwards "Environmental pollution by pesticides", éd. Plenum Press, London and New-York, 254-312.

SWANSON, C.L.W., F.C. THORP & R.B. FRIEND, 1954 - Soil sci., 78, 379 (cité in Edwards, 1973).

THOMPSON, A.R., 1973 - Pesticide residues in soil invertebrates. In C.A.

Edwards "Environmental pollution by pesticides", éd. Plenum Press, London and New-York, 87-133.

TSUCHIGA, K., 1969 - Keio. j. med., 18, 181 (cité in Deysson & Clain, 1980).

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

WADA, O., K. TOYOKAMA, T. SUZUKI, S. SUZUKI, Y. YANO & K. NAKAU, 1969 - Response to a low concentration of mercury vapor relation to human porphyrin metabolims. Arch. environ. health, 19, 485-488 (cité in Lagerwerff, 1972).

WARE, G.W., & E.C. NABER, 1961 - J. econ. entomol., 54, 675 (cité in Stickel, 1973).

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

WOJTALIK, T.A., 1971 - The accumulation of mercury and its compounds. J. water pollut. contr. fed., 43, 1280-1292 (cité in Lagerwerff, 1972).

YAMANA, I., 1957 - Nitrate reduction and denitrification in flooded soil. Soil plant food (Tokyo), 3, 100-103 (cité in Lagerwerff, 1972).